

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**

**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**“FERTILIDAD EN OVEJAS DOHNE MERINO POR INSEMINACIÓN  
ARTIFICIAL CON SEMEN REFRIGERADO, DILUIDO EN TRIS  
Y TRILADYL DE 24 Y 48 HORAS EN LA ESTACIÓN  
EXPERIMENTAL AGRARIA-ILLPA-PUNO 2015”**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. Miguel Ángel Guillén Portugal**

**Para optar el Título Profesional de:**

**MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**TACNA - PERÚ**

**2016**

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**

**Facultad de Ciencias Agropecuarias**


**Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**TESIS**

**“FERTILIDAD EN OVEJAS DOHNE MERINO POR INSEMINACIÓN  
ARTIFICIAL CON SEMEN REFRIGERADO, DILUIDO EN TRIS  
Y TRILADYL DE 24 Y 48 HORAS EN LA ESTACIÓN  
EXPERIMENTAL AGRARIA-ILLPA-PUNO 2015”**

TESIS SUSTENTADA Y APROBADA EL 18 DE MARZO DEL 2016, POR  
EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR:

PRESIDENTE:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. HUGO FLORES AYBAR

SECRETARIO:

  
\_\_\_\_\_  
MSc. JUAN NICANOR CASTRO CANCINO

VOCAL:

  
\_\_\_\_\_  
MSc. LUIS ADOLFO RAMOS MAMANI

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
MSc. DANIEL GANDARILLAS ESPEZÚA

## *Dedicatoria*

*A mis padres y hermano, por su apoyo incondicional y constante, por la forma de educarme y construir las bases sobre las que edifico mi vida. Por ser el motivo, que me impulsa a seguir adelante y obtener lo que me propongo. Todo mi esfuerzo se ve reflejado en este trabajo y es un orgullo poderse los brindar. Muchas gracias familia, los quiero y los amo mucho.*

## AGRADECIMIENTOS

*A Dios, por haberme permitido concluir con éxito esta etapa de mi vida y protegerme en todo momento.*

*A mi madre Zoila, con todo mi amor y gratitud, quien siempre estuvo incondicionalmente dispuesta a ayudarme y me demostró que con perseverancia y sacrificio se puede lograr lo que uno se propone.*

*A mi padre Carlos, por todos sus consejos, por el apoyo total, por educarme siempre para una sociedad y haberse preocupado de mis necesidades en la realización de este trabajo.*

*A mi enamorada Sheyla, por su paciencia y comprensión, por soportarme y estar a mi lado en momentos difíciles, brindándome todo su amor y su apoyo.*

*Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), E.E.A.-ILLPA, por haberme abierto las puertas, por facilitarme el uso de sus instalaciones y materiales para culminar con éxito este trabajo.*

## AGRADECIMIENTOS

*Al Mg. Mario Lino Gonzales Castillo, por haberme permitido realizar este trabajo de investigación, por brindarme sus conocimientos, su ayuda y entera confianza al igual que su amistad.*

*Al Médico Veterinario y Zootecnista, Rubén Mamani Cato por su ayuda en la parte estadística y por impulsarme en todo momento a convertirme en un investigador.*

*Al Médico Veterinario y Zootecnista Oscar Cárdenas Minaya, por su amistad y su apoyo desinteresado en el transcurso del trabajo.*

*Al Médico Veterinario y Zootecnista Tito Limache, por sus críticas constructivas, consejos y por el tiempo brindado en la asesoría del trabajo de tesis.*

*A todas las personas que de alguna u otra manera, hicieron posible la culminación de este trabajo.*

## **CONTENIDO**

<b>DEDICATORIA</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iv</b>
<b>CONTENIDO</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xix</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	
1.1. Descripción del problema	3
1.2. Formulación del problema	5
1.3. Justificación	5

1.4. Objetivos	6
1.5. Formulación de hipótesis	7
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	
2.1 Base teórica	9
2.2. Antecedentes del estudio	49
2.3 Base conceptual	53
<b>CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
3.1 Lugar de investigación	56
3.2 Tipo de investigación	56
3.3 Población y muestra	56
3.4 Materiales y equipos	58
3.5 Metodología	62
3.6 Análisis de datos	72

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS**

4.1 Resultados de características seminales 73

4.2 Resultados de fertilidad 82

## **CAPÍTULO V: DISCUSIÓN**

**CONCLUSIONES** 106

**RECOMENDACIONES** 107

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 108

**ANEXOS** 114

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Valoración microscópica de motilidad masal en semen fresco de carnero	23
Tabla 2.	Calidad de movimiento: Tipos	24
Tabla 3.	Grupos de investigación	62
Tabla 4.	Volumen de eyaculado, según dilutor y hora	73
Tabla 5.	Porcentaje de motilidad masal, según dilutor y hora	73
Tabla 6.	Porcentaje de motilidad individual progresiva, según dilutor y hora	74
Tabla 7.	Porcentaje de PH seminal, según dilutor y hora	75
Tabla 8.	Porcentaje de concentración espermática según dilutor y hora	76
Tabla 9.	Porcentaje de integridad de membrana por prueba de HOST, según dilutor y hora	77

Tabla 10.	Porcentaje de vitalidad espermática, según dilutor y hora	78
Tabla 11.	Porcentaje de espermatozoides normales, según dilutor y hora	79
Tabla 12.	Porcentaje de anormalidades de la cabeza, según dilutor y hora de análisis.	80
Tabla 13.	Porcentaje de anormalidades de la cola, según dilutor y hora	81
Tabla 14.	Diagnóstico de fertilidad entre semen fresco y dilutor Tris a las 0 horas	82
Tabla 15.	Diagnóstico de fertilidad entre semen fresco y dilutor Triladyl a las 0 horas	83
Tabla 16.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 0 y 24 horas	84
Tabla 17.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 0 y 48 horas	85

Tabla 18.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 24 y 48 horas	86
Tabla 19.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Triladyl a las 0 y 24 horas	87
Tabla 20.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Trildyl a las 0 y 48 horas	88
Tabla 21.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Triladyl a las 24 y 48 horas	89
Tabla 22.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 24 y Triladyl a las 24 horas	90
Tabla 23.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 48 y Triladyl a las 48 horas	91
Tabla 24.	Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 0 y Triladyl a las 0 horas	92

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Conteo para concentración espermática

27

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Análisis de varianza para motilidad masal usando dilutor Tris	115
Anexo 2.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad masal usando dilutor Tris	115
Anexo 3.	Análisis de varianza para motilidad masal usando dilutor Triladyl	115
Anexo 4.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad masal usando dilutor Triladyl	115
Anexo 5.	Análisis de varianza para motilidad individual progresiva usando dilutor Tris	115
Anexo 6.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad individual progresiva usando dilutor Tris	116
Anexo 7.	Análisis de varianza para motilidad individual progresiva usando dilutor Triladyl	116

Anexo 8.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad individual progresiva usando dilutor Triladyl	116
Anexo 9.	Análisis de varianza para Test Hiposmótico con dilutor Tris	116
Anexo 10.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para Test Hiposmótico usando dilutor Tris	117
Anexo 11.	Análisis de varianza para Test Hiposmótico usando dilutor Triladyl	117
Anexo 12.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para Test Hiposmótico usando dilutor Triladyl	117
Anexo 13.	Análisis de varianza para porcentaje de vitalidad espermática con dilutor Tris	117
Anexo 14.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de vitalidad espermática usando dilutor Tris	118
Anexo 15.	Análisis de varianza para porcentaje de vitalidad espermática con dilutor Triladyl	118

Anexo 16.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de vitalidad espermática usando dilutor Triladyl	118
Anexo 17.	Análisis de varianza para porcentaje de espermatozoides normales con dilutor Tris	118
Anexo 18.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de espermatozoides normales usando dilutor Tris	119
Anexo 19.	Análisis de varianza para porcentaje de espermatozoides normales con dilutor Triladyl	119
Anexo 20.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de espermatozoides normales usando dilutor Triladyl	119
Anexo 21.	Análisis de varianza para porcentaje de cabezas anormales con dilutor Tris	119
Anexo 22.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de cabezas anormales usando dilutor Tris	120

Anexo 23.	Análisis de varianza para porcentaje de cabezas anormales con dilutor Triladyl	120
Anexo 24.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de cabezas anormales usando dilutor Triladyl	120
Anexo 25.	Análisis de varianza para porcentaje de colas anormales con dilutor Tris	120
Anexo 26.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de colas anormales usando dilutor Tris	121
Anexo 27.	Análisis de varianza para porcentaje de colas anormales con dilutor Triladyl	121
Anexo 28.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de colas anormales usando dilutor Triladyl	121
Anexo 29.	Análisis de varianza para porcentaje PH con dilutor Tris	121
Anexo 30.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de PH usando dilutor Tris	122

Anexo 31.	Análisis de varianza para porcentaje de PH con dilutor Triladyl	122
Anexo 32.	Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de PH usando dilutor Triladyl	122
Anexo 33.	Sobre resultados de fertilidad, inseminación con semen de 0, 24 y 48 horas	123
Anexo 34.	Sobre resumen de resultados de fertilidad	125
Anexo 35.	Registro de análisis de semen de carnero reproductor seleccionado	126
Anexo 36.	Registro de ovejas inseminadas artificialmente	128

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la Estación Experimental Agraria ILLPA, propiedad del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) en la ciudad de Puno; con el objetivo de evaluar la fertilidad resultante de la inseminación artificial cervical con semen ovino, diluido y refrigerado a 5°C con dos tipos de dilutores (Tris y Triladyl) a 24 y 48 horas, con una dilución de 1:2 (semen/dilutor), y  $250 \times 10^6$  millones de espermatozoides de dosis por inseminación, asimismo, evaluar las características seminales antes de cada inseminación. Ciento diecisiete ovejas primíparas y multíparas, raza Dohne merino, se dividieron e inseminaron al azar en 3 grupos de 39 animales cada uno: grupo control con semen fresco sin diluir (F=13) a 0 horas (no se inseminó a las 26 restantes ya que la mortalidad seminal era total a las 12 horas), semen diluido en Triladyl (TL=39) y semen diluido en Tris (T= 39) a 0, 24 y 48 horas. Se utilizaron pruebas de chi-cuadrado y Análisis de Varianza (ANVA). La fertilidad a 24 horas fue TL= 69,2 % (9/13) y T= 46,2 % (6/13); y la fertilidad a 48 horas fue de TL= 30,8 % (4/13) y T= 46,2 % (6/13), evidenciando que la fertilidad se ve afectada por el dilutor y tiempo de refrigeración a (5°C), mediante inseminación artificial con dosis de 250 millones de espermatozoides.

Palabras clave: Fertilidad, dilutor, refrigeración, inseminación, oveja.

## ABSTRACT

The present research work was carried out in the Agricultural Experimental Station of the National Institute property ILLPA of Agricultural Research (INIA) in the Puno city, with the objective of evaluating fertility resulting from the artificial insemination cervical with diluted semen and cooled to 5°C with two types of Extenders (Tris and Triladyl) at 24 and 48 hours, with a dilution of 1:2 (semen/extender), and  $250 \times 10^6$  million sperm doses for insemination, also, to evaluate the seminal characteristics before each insemination. One hundred and seventeen sheeps primiparous and multiparous Dohne Merino race, were divided and inseminated at random into 3 groups of 39 animals each: control group with fresh semen undiluted (F=13) to 0 hours (26 sheeps are not inseminated because the mortality was absolut at 12 hours), diluted semen in Triladyl (TL=39) and diluted semen in Tris (T= 39) to 0, 24 and 48 hours. Used chi-square test and analysis of variance (ANVA). Fertility in 24 hours was TL= 69.2 % (9/13) and T= 46.2 % (6/13) and fertility to 48 hours was TL= 30,8 % (4/13) and T= 46.2 % (6/13), evidencing that fertility is not affected by the extenders Tris and Triladyl and cooling time (5°C), through artificial insemination with doses of 250 million sperm.

Key words: Fertility, refrigeration, extender, insemination, sheep.

## INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial es una herramienta importante en la producción ganadera, que permite mejorar la calidad genética de la descendencia al seleccionar progenitores con características fenotípicas y genotípicas deseadas. Es un método de reproducción en el que se obtiene el semen del macho para introducirlo posteriormente en el aparato genital de la hembra, por medio instrumental.

La crianza del ganado ovino a lo largo del territorio nacional es de vital importancia para la economía de la población rural. En algunas comunidades, se sigue realizando el método reproductivo por monta natural, presentándose el problema de que los carneros puedan mostrar alguna enfermedad o alteración, asimismo, la situación se complica cuando los productores se ven en la necesidad de utilizar muestras seminales que son transportadas a largas distancias sin tener conocimiento en la manipulación y manejo de la misma.

Teniendo presente la importancia de esta especie en la zona altoandina y su impacto económico-social en estas comunidades, se da una iniciativa con el fin de seleccionar muestras seminales de la mejor

calidad, aumentado el número de ovejas inseminadas con un solo eyaculado con ayuda de dilutores, los cuales mantendrán sus características seminales, ampliando su tiempo de vida a bajas temperaturas.

Es así que, se realizó estudios para evaluar, analizar, seleccionar y conservar las mejores características genéticas en el material espermático, haciendo uso de diferentes parámetros evaluativos y asegurando su calidad para la inseminación.

Por tal motivo, el presente trabajo de investigación muestra la tasa de fertilidad, realizando una serie de evaluaciones seminales e inseminando artificialmente en distintos horarios de tiempo (24 y 48 horas), comparando dos dilutores, uno comercial (Triladyl) y elaborado por medios mecánicos (Tris).

# **CAPÍTULO I**

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **1.1. Descripción del problema**

Las ovejas son poliéstricas estacionales. El ciclo estral es determinado por la estación del año y es influenciado por el fotoperiodo corto (otoño, invierno) (Cueto & Gibbons, 2011). En la región sur, el porcentaje de parición anual en ovinos fue de 41,4 % en el año 2013, alcanzando la mayor actividad reproductiva en los meses de mayo – julio (MINAGRI, 2013).

Durante estos meses, los carneros utilizados como reproductores se ven sometidos a periodos de intensa actividad física, tolerando movimientos y viajes a diferentes predios que conllevan a condiciones de estrés (transporte, cambios del ambiente, de alimentación, etc.), de igual manera, riesgos físicos y sanitarios, que afectan la calidad seminal y como resultado se obtiene un bajo poder fecundante (Gil y Olivera, 2011).

Del mismo modo, se pierde gran cantidad de espermatozoides al momento de la monta natural, ya que la carga espermática excede la cantidad necesaria de espermios que se requiere para que la hembra quede preñada. También el carnero, con cada salto que realiza, disminuye la cantidad del eyaculado y su concentración espermática, reduciendo el porcentaje y las expectativas de fertilidad de la hembra (Sepúlveda, 2012).

Desde que se inició los primeros experimentos de I.A. en ovinos, se utilizó semen fresco con resultados satisfactorios; sin embargo, se desconocía la utilización de dilutores, que aparte de proteger el semen sin alterar sus características, aumentaba la dosis por inseminación, logrando abarcar una mayor cantidad de hembras por majada. Asimismo, el resultado de la dilución podía durar varias horas manteniendo la viabilidad de los espermatozoides a bajas temperaturas (5°C) (Aisen, 2009).

Estos claros inconvenientes hacen que la inseminación artificial con semen preservado (refrigerado) sea un método biotecnológico seguro y con mejores resultados genéticos, ya que favorece un uso más eficiente y prolongado del semen y de los carneros. Incluso, al permitir, que sean usados durante y fuera de estación, siendo la I.A. intracervical una técnica

sencilla y menos costosa de poder difundir el semen a distintas majadas (Naim *et al.*, 2004).

## **1.2. Formulación del problema**

¿Cómo influye el tiempo de refrigeración del semen en el porcentaje de fertilidad y qué diluyentes mantienen mejor las características seminales a 24 y 48 horas de refrigeración en la Estación Experimental Agraria ILLPA – INIA, durante el año 2015?

## **1.3. Justificación**

La importancia en el aspecto económico y social en la cadena productiva de ovinos en el Perú, con certeza, es la caja de ahorro del poblador rural andino dentro de su economía familiar. Parte de la costumbre, es ahorrar en especie animal, y el ovino tiene la preferencia por su rápida comercialización informal y consumo en carne, lana, pieles y abono principalmente (MINAGRI, 2013).

Sin embargo, en las últimas décadas, el sector ovino se ha desarrollado sin una política sectorial definida; la cadena productiva de ovinos se mantiene con producciones sin incrementar su nivel de mantenimiento y una crianza subsistencial sin tecnología de punta con prospectiva a conquistar mercados internacionales (MINAGRI, 2013).

El Ministerio de Agricultura y Riego, con la voluntad política hacia el sector de ovinos como la prioridad en el desarrollo de la sierra altoandina en el país, está priorizando la crianza de ovinos, orientándose hacia la reconversión genética con razas especializadas de acuerdo a la tendencia mundial, carne de cordero, leche y lanas finas (MINAGRI, 2013).

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de contribuir con el desarrollo productivo de la raza Dohne merino e introducirla por medio de la inseminación artificial a diferentes comunidades que se dedican a este rubro, solucionando problemas de infertilidad en la crianza extensiva, semi-intensiva e intensiva de la región.

#### **1.4. Objetivos**

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

- Determinar la fertilidad en ovejas Dohne merino y comparar los diluyentes Tris y Triladyl sobre las características seminales a 24 y 48 horas de refrigeración en la Estación Experimental Agraria ILLPA – INIA, durante el año 2015.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

- Determinar el porcentaje de fertilidad en relación dilutor - tiempo de refrigeración mediante la inseminación artificial en ovejas Dohne merino.
- Comparar los diluyentes Tris y Triladyl sobre las características seminales (motilidad masal, motilidad individual progresiva, pH, concentración, test de Host, vitalidad espermática y morfología) a 24 y 48 horas de refrigeración, en semen de carneros Dohne merino.

#### **1.5 Formulación de hipótesis**

- **Hipótesis 1:**

**Ho:** El tiempo de refrigeración del semen influye en el porcentaje de fertilidad mediante la inseminación artificial en ovejas Dohne merino en la Estación Experimental Agraria ILLPA – INIA, durante el año 2015.

**Ha:** El tiempo de refrigeración del semen no influye en el porcentaje de fertilidad mediante la inseminación artificial en ovejas Dohne merino en la Estación Experimental Agraria ILLPA – INIA, durante el año 2015.

- **Hipótesis 2:**

**Ho:** Los diluyentes Tris y Triladyl tienen diferentes efectos sobre las características seminales a 24 y 48 horas de refrigeración en carneros Dohne merino en la Estación Experimental Agraria ILLPA – INIA, durante el año 2015.

**Ha:** Los diluyentes Tris y Triladyl no tienen diferentes efectos sobre las características seminales a 24 y 48 horas de refrigeración en carneros Dohne merino en la Estación Experimental Agraria ILLPA – INIA, durante el año 2015.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1 Base teórica**

##### **2.1.1 Descripción de la especie (Raza Dohne merino)**

Es una raza rústica desarrollada en Sud África, se adapta a un amplio rango de condiciones climáticas y ambientales, desde sistemas intensivos de alta producción, hasta zonas extensivas en zonas áridas como el desierto del Karoo (INTA, 2003).

El Dohne Merino es naturalmente mocho, de cuerpo liso, doble propósito, productor de carne y lana blanca (22 micras). La buena producción de carne del Dohne y las propiedades de la lana del merino están, excepcionalmente, bien balanceadas (INTA, 2003).

- **Conformación general:**

La cabeza no posee cuernos, con cara notablemente destapada y libre de pelos visibles, ausente de pigmentación en pelos y sin

pigmentaciones excesiva en piel y mucosas; sin excesiva papada y con la cara cubierta de pelo suave y color crema. Debe tener un hocico ancho, mandíbula normal y dientes fuertes, nariz levemente aguileña con orificios anchos y ovalados; ojos grandes claros y orejas relativamente largas cubiertas de pelo corto, suave y color crema. Se permite la ocurrencia de tocos o cuernos sin inserción ósea, solo muy pequeños. Pescuezo relativamente largo, profundo, bien carnudo y bien fijado a la cabeza y a los hombros, que son anchos, firmes y se ajustan bien al lomo. Posee un pecho profundo y ancho que indica buena calidad de carne del cuarto delantero; lomo largo, ancho y recto, bien fijado a los hombros y al anca. Las costillas bien encorvadas mostrando buena profundidad; ancas chatas, anchas, largas y derechas, ajustadas bien al lomo. Las piernas son fuertes y anchas, cuartilla fuertes y pezuñas color ámbar. La cobertura debajo de las rodillas y codos es lana o pelo suave color crema. En machos, el escroto es relativamente corto, sin divisiones y con suficiente espacio para dos testículos de buen tamaño (más de 28 centímetros de circunferencia escrotal a los 365 días); en caso de hembras, la ubre deberá estar bien formada y tener dos tetillas de tamaño normal (INTA, 2003).

### **2.1.2 Manejo reproductivo**

La actividad reproductiva de la especie ovina es poliéstrica estacional, caracterizada por una época del año en que la gran mayoría de las hembras presenta cíclicamente estros o celos (estación sexual), y otra época del año en que un porcentaje variable de las mismas, según la raza, presenta inactividad sexual (anestro) (Gibbons y Cueto, 2007).

La mayor actividad reproductiva se presenta en el período otoño – invernal estimulada por el acortamiento del período diario de luz solar. Experiencias realizadas en la raza merino, demostraron que entre el 95% y 100% de las ovejas se encuentra ciclando entre los meses de marzo y julio, estos porcentajes disminuyen a valores de alrededor del 60% entre agosto y febrero (Naim *et al.*, 2004)

El celo o estro es el período fértil que se presenta en la oveja a intervalos regulares de 17 +/- 1 días, a menos que haya quedado preñada. Se denomina ciclo estral al periodo transcurrido entre celos (Gibbons y Cueto, 2007).

- **Hembras**

La dinámica folicular en el ovino es similar a la observada en el bovino, es decir en forma de ondas de desarrollo (Rubianes, 2000).

Durante la transición, desde el anestro estacional a la estación reproductiva, los ciclos interovulatorios son más largos o más cortos que lo normal y por tanto, tienen más o menos ondas foliculares (Rubianes, 2000).

Uno de los factores esenciales, es la nutrición de la oveja previo al encaste, ya que la función reproductiva en el ovino está muy relacionada con la condición corporal y la dinámica de evolución del peso vivo (Del Campo, 1993).

Antes de realizar la inseminación artificial, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos de nutrición, sanidad y reproductivos:

- Las hembras deben alcanzar 2,5 – 3 puntos de condición corporal un mes antes de la inseminación (máximo 5; mínimo, 0).
- Las ovejas deben estar libres de enfermedades y parásitos
- El destete de los corderos debe realizarse de 6 a 8 semanas antes de la inseminación.

Otro factor a considerar, es el comportamiento sexual de la oveja en celo, la cual no presenta signos muy notorios. Sin

embargo, su actitud cambia en presencia del macho y exhibe un fuerte impulso sexual, acercándose al macho, rodeándolo y emitiendo balidos característicos (Daza, 1997).

Por lo tanto, es necesaria la preparación de los machos celadores o retajos, ya que las ovejas necesitan colaboración del macho para que el ganadero pueda identificar el momento del celo. Se pueden utilizar como celadores machos vasectomizados, machos castrados y androgenizados o machos enteros con chaleco o mandil (Daza, 1997).

- **Machos**

Un factor a considerar, es la nutrición de los carneros que servirán de donantes de semen, sobre todo si la extracción se realizará fuera de estación reproductiva, ya que en esa época la producción de semen se encuentra muy deprimida (Sepúlveda, 2012).

Se recomienda realizar una inspección de los carneros (revisión pre-servicio) entre 30 a 45 días antes de iniciar el servicio, es decir, entre marzo y abril para los servicios de otoño. De esta manera, habrá tiempo suficiente para realizar los análisis que sean

necesarios, poder evaluar los resultados de campo y laboratorio, eliminar los animales con problemas y poder comprar, o buscar entre los propios, carneros de reemplazo sanos. El objetivo de la revisión pre-servicio es seleccionar carneros en buen estado de salud, fuertes y fértiles, en el número adecuado para cubrir las ovejas de servicio (Da Silva, 2014).

Se realiza lo siguiente:

- Revisión de lesiones de pezuñas, cabeza y miembros
- Boqueo (problemas de dentición, de mandíbula y saca de animales viejos).
- Revisión de ganglios submaxilares, retrofaringeos y parotídeos; pre-escapulares, pre-crurales.
- Posteriormente, con un suave movimiento de tracción hacia afuera, se trata de bajar ambos testículos, desde la zona inguinal, hasta tenerlos totalmente dentro de la bolsa escrotal. Buscar posible presencia de líquidos en la cavidad escrotal, temperatura o color anormal del escroto, heridas, lesiones de ectoparásitos, etc. A continuación; se palpan detenidamente y simultáneamente ambos testículos y epidídimos con ambas manos a fin de compararlos en los

diferentes aspectos de la evaluación: Revisión de bolsa escrotal, testículos y epidídimos. Se debe prestar especial atención a lo siguiente (Robles, 2004):

- El tamaño testicular y epididimario
- La forma del testículo y del epidídimo
- El tono o turgencia del tejido testicular
- La elasticidad del tejido testicular
- La temperatura
- La simetría
- El libre desplazamiento de los testículos y epidídimos dentro de la cavidad escrotal (Robles, 2004).

Continuamos con la revisión de los epidídimos, palpando en su recorrido primero, las cabezas; luego, cuerpos; y finalmente, colas, en busca de endurecimientos, aumento de tamaño, cambios significativos en la consistencia o ubicación, adherencias, etc. Luego se continúa palpando hacia arriba, recorriendo el cordón testicular en busca de lesiones como varicoceles, hernias inguinales, malformaciones, etc.

También se realiza la revisión de pene, por ejemplo: inflamación, fimosis, parafimosis, infantilismo, etc. (Robles, 2004).

### **2.1.3 Colección de semen**

#### **2.1.3.1 Métodos de colección de semen**

La aplicación de técnicas de reproducción asistida en rumiantes menores involucra, en varias metodologías, la recolección de semen y/o espermatozoides y una evaluación cualitativa y cuantitativa de material obtenido.

Los métodos más empleados para la obtención del material espermático en ovinos y caprinos es mediante vagina artificial y electroeyaculación (Aisen, 2009).

##### **a) Vagina artificial**

La vagina artificial (V.A.) es una imitación de la vagina de la hembra que mediante un estímulo térmico y mecánico, desencadena la eyaculación. A continuación, se detallan sus partes: cilindro externo o cuerpo (metal o PBC), funda de látex, escotilla de aire, bandas de sujeción, bolsita en forma de cono, tubo colector, cono o estuche protector y toalla o funda de protección (Aisen, 2009).

Para el armado, se coloca la funda de goma dentro del cilindro (metal o plástico), asegurando los extremos con una banda de

sujeción. Se incorpora una bolsita de plástico en forma de cono y en su extremo agudo, el tubo colector graduado por el lado donde no está la escotilla de presión de aire. Por el otro extremo, se carga agua entre la funda y el cilindro y se ajusta con otra banda de sujeción, y por la escotilla, se le imparte aire por presión hasta que la luz de la funda desaparezca (Aisen, 2009).

- **Metodología**

La vagina se carga con 40-60 ml de agua caliente de 45 a 50°C o más, según las pérdidas de calor que se produzca hasta el momento de su utilización. Siendo importante que la temperatura interior de la misma al momento de la eyaculación, sea aproximadamente 40°C; en ambientes muy fríos, pueden disminuirse las pérdidas de calor, protegiendo el conjunto con una funda exterior, y al tubo colector previamente templado con un estuche de tergopor (Gibbons *et al.*, 2007).

El operador se sitúa al lado derecho de la hembra, coloca la vagina artificial en dicho flanco y se sujeta con la mano derecha, de tal forma que el extremo abierto quede mirando hacia el macho. La válvula de la vagina debe dirigirse hacia abajo con la inclinación de aproximadamente 45°, evitando el

contacto con el macho. En el momento del salto, el pene se dirige con la mano izquierda hacia el interior de la V.A., procurando hacerlo siempre del prepucio para evitar la retracción del mismo. Cuando el pene entra en contacto con la superficie caliente de la vagina artificial, el semental da el característico “golpe de riñón” eyaculando dentro del tubo colector (Evans y Maxwell, 1990).

#### **b) Electroeyaculación**

El semen se obtiene por medio de un estimulador vía rectal, alimentado mediante 220 voltios (con transformador reductor), por una batería (12 v) o un dínamo. La sonda introducida en el recto posee 2 o más electrodos y proporciona descargas de 4-15 voltios. Si la técnica se realiza correctamente, el semen resulta de características similares al obtenido por V.A. De todas maneras, no es raro que por sobrestímulo de las glándulas anexas, el eyaculado sea más diluido, o que se pueda contaminar de forma accidental con orina. Por lo tanto, esta técnica es una alternativa a aplicar sólo en el caso de que no se pueda extraer semen con V.A (Aisen, 2009).

- **Metodología**

Se coloca al macho en el suelo o en una mesa recostado. Es necesario que la zona del prepucio esté libre de lana y suciedad que puedan contaminar el semen. Se introduce la sonda en el recto hasta unos 10-20 cm (dependiendo del tamaño individual), procurando no lesionar la mucosa, para lo cual se puede lubricar con unas gotas de agua o solución salina. Se exterioriza el glande y se sujeta el pene por detrás del mismo (por medio de una gasa), introduciéndolo en un cono con tubo colector, limpio, seco, estéril y temperado. Se presiona la sonda hacia el suelo de la pelvis y a fin de estimular la erección, se aplican 3-5 estímulos cortos de 1-2 seg separados por 5 seg entre sí (evitando el exceso de secreciones de las glándulas anexas). Luego se aplican 1-3 estímulos más prolongados (5-10 seg) para estimular la eyaculación, recogiendo el semen en el tubo colector (Aisen, 2009).

#### **2.1.4 Parámetros de evaluación del semen**

Características seminales macroscópicas y microscópicas.

#### **2.1.4.1 Macroscópicas**

- **Color y consistencia**

El esperma completo es un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento o grisáceo según las especies. Los espermas de toro y morueco son de consistencia lechosa o lactocremosa y de coloración blanquecina (Derivaux, 1982).

El semen del carnero es normalmente blanco cremoso o lechoso, deben descartarse los eyaculados que presentan orina o contengan coloración blanco-rosácea que indica la presencia de sangre probablemente a causa de una lesión del pene al momento de la recolección, o gris, que indica algún tipo de infección o contaminación en el aparato reproductor (Evans y Maxwell, 1990).

- **Volumen**

La cantidad del esperma varía según las especies y, dentro de una misma especie, según el estado fisiológico del macho, el individuo, la raza, la edad, el tamaño, el número de saltos o recogidas. En las especies de reproducción vaginal (bóvidos, óvidos, conejos), es poco abundante y muy concentrado (Derivaux, 1982).

El volumen promedio de un carnero es de 1ml dependiendo de la raza, edad, estado general del macho y destreza del operario. Se puede medir directamente con el tubo colector graduado o con una pipeta calibrada. Si las muestras se recolectan 3 o más veces al día o por periodos extensos, el volumen disminuye (Evans y Maxwell, 1990).

La elevada frecuencia de eyaculación en una misma jornada, reduce el volumen promedio, y cuando se obtiene dos eyaculados consecutivamente, el segundo suele tener menor volumen (Hafez, 2000).

#### **2.1.4.2 Microscópicas**

- **Movimiento masal**

Los espermatozoides en movimiento vigoroso se desplazan creando ondas que son visibles a corta distancia. En una maniobra rápida, se observa el tubo colector con el eyaculado, tratando de determinar el movimiento en remolino u ondas y, de manera grosera, la motilidad de la muestra. Esta corresponderá con la observación de ondas al microscopio (Evans y Maxwell, 1990).

El examen de motilidad masal, permite apreciar la intensidad del movimiento de los espermatozoides por la existencia de verdaderas “olas” o remolinos, provocados por la reunión de los espermios seguidos de su dispersión (Derivaux, 1982).

Para evaluarlo, se coloca una pequeña gota de semen sobre un portaobjetos con el objetivo seco de 10X sobre una platina a 37°C. En un buen eyaculado; aparecen ondas en forma de herradura que se mueve rápidamente. La intensidad del movimiento permite hacer una apreciación subjetiva de acuerdo con la siguiente escala (Galina y Valencia, 2008).

**Tabla 1. Valoración microscópica de motilidad masal en semen fresco de carnero.**

ESCALA	CALIFICATIVO	OBSERVACIÓN (DESCRIPCIÓN)
5	MUY BUENO	Ondas oscuras de movimiento muy rápidas. Movimiento en remolino, no es posible observar células individuales. El 90% o más de los espermatozoides son activos.
4	BUENO	Movimiento vigoroso, pero las ondas y remolinos no son rápidos como el valor 5. Alrededor de 70 a 80% de espermatozoides, son activos.
3	REGULAR	Solo aparecen ondas de movimiento lento (aspecto de neblina). Se pueden ver espermatozoides aislados. Entre los 40 a 60% de espermatozoides, son activos.
2	POBRE	No aparecen ondas aunque se observan movimientos de espermatozoides (oscilatorio y rotatorio). Bastantes muertos. Solo viven del 20 a 40% de espermatozoides.
1	MUY POBRE	Muy pocos espermatozoides presentan signos de vida. Alrededor de 10% tienen movimientos débiles.
0	MALO	Ningún espermatozoide presenta movimiento, todos muertos.

Fuente: Manual de inseminación artificial en ovinos-Universidad Nacional del Altiplano-Puno, (2011).

- **Motilidad individual progresiva**

Es una de las pruebas que se utilizan con la mayor frecuencia para evaluar la calidad de semen. Se refiere al movimiento de los espermatozoides una vez combinado con el dilutor. Si estos avanzan en forma más o menos rectilínea en el campo

microscópico, debe ser del 80 %, con un rango del 70 % - 90 %. Los espermatozoides que giran sobre sí mismos, pueden estar indicando que sufrieron choque térmico o que el medio no es isotónico con el semen. Si los espermatozoides nadan en movimiento circular estrecho, ello significa que tal vez sufrieron choque por frío (Aisen, 2004).

Entendiendo la forma de desplazamiento del espermatozoide, puede ser progresiva o normal, siendo la de mayor utilidad, pero puede que sea oscilante, vibratoria o en retroceso (Galina y Valencia, 2008).

**Tabla 2. Calidad de movimiento: Tipos**

<b>ESCALA</b>	<b>OBSERVACIÓN (DESCRIPCIÓN)</b>
<b>1</b>	Espermatozoides sin movimiento.
<b>2</b>	Espermatozoides con movimiento pobre. Las cabezas de los espermatozoides quedan fijas y solo se mueven las colas, pudiendo girar sobre sí mismos. Espermatozoides sin movimiento.
<b>3</b>	Espermatozoides con desplazamiento en círculos y algunos progresivos.
<b>4</b>	Movimientos progresivos sinuosos.
<b>5</b>	Movimientos progresivos rápidos.
<b>6</b>	Movimientos progresivos muy rápidos.

Fuente: Manual práctico para profesionales – Biotecnología reproductiva – Inseminación artificial porcina. Cannavaro A. (2011).

- **Concentración espermática**

La concentración espermática o densidad espermática es el número de espermatozoides por  $\text{mm}^3$  o cc (Aisen, 2004).

La concentración expresa el número de espermatozoides por milímetro cúbico; este valor tiene gran importancia y es necesario conocerlo para juzgar la calidad de un esperma (Derivaux, 1982).

El término de concentración espermática se refiere al número de espermatozoides por mililitro de semen, mientras que el recuento espermático, es el número total de espermatozoides en el eyaculado. Ambos términos son importantes y deben calcularse.

La concentración o densidad se calcula por varios métodos:

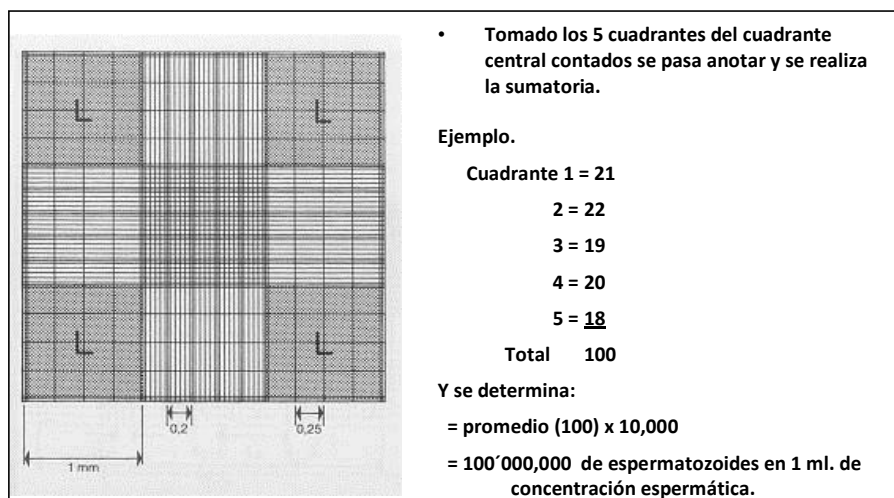
a) Hemocitómetro de Spencer. Este método es el mismo que se utiliza para el conteo de glóbulos rojos. La dilución se efectúa con la pipeta de glóbulos rojos, utilizando una solución salina al 3% con formalina para matar a los espermatozoides y poder contarlos sobre la cuadrícula de la cámara de Spencer (Aisen, 2004).

El hemocitómetro tiene una rejilla con cinco cuadrados principales: A, B, C, D, E. El cuadrado central, E, se

subdivide en 25 cuadros menores. Los cuatro cuadros más pequeños de las esquinas se denominan E1, E2, E3, E4, mientras que el central, es E5. Normalmente; se cuentan todos los espermatozoides en el cuadro E. Cuando se cuenta, se incluyen todos los espermatozoides contenidos dentro de los cuadros elegidos y los que cruzan las líneas superior y derecha (Hafez, 2000).

El cuadrado principal E tiene 1mm de largo y 1 mm de ancho, mientras el espesor del líquido comprendido entre la cubierta y la cámara Neubauer, es 0.1 mm. El volumen total representado en dicho cuadro es por tanto, de  $0.1 \text{ mm}^3$ , por lo que el factor de multiplicación del cuadro principal E, es, por tanto,  $10^4$ , o 10 000. Si se cuentan los espermatozoides en dichos cuadros y el número se multiplica por 10 000, se obtiene el número de espermatozoides por milímetro de la solución espermática. Si este número a su vez se multiplica por el factor de dilución espermática, lo que se obtiene es la concentración de espermatozoides en la muestra original de semen. A partir de esta información, el número total de espermatozoides en el semen se calcula multiplicando la

concentración espermática por el volumen del eyaculado (Hafez, 2000).



**Figura 1. Conteo para concentración espermática**

Fuente: (Hafez, 2000)

- b) Espectrofotómetro: Consiste en hacer una dilución del semen y medir la transmisión de la muestra en el aparato mediante una absorción de radiación electromagnética.
- c) Espermaticitómetro: Se basa en el principio de hematocrito. Al centrifugar el semen, en una micro pipeta, se separa el paquete celular y el plasma seminal. Permite calcular el número de espermatozoides en un volumen fijo.
- d) Contador fotoeléctrico de células: el semen diluido se pasa por unas celdillas fotoeléctricas y la cantidad exacta de

células aparece en números digitales sobre un tablero (Aisen, 2004).

## **2.1.5 Pruebas de semen**

### **2.1.5.1 pH**

El valor del pH es el resultante de la neutralización entre las reacciones glandulares de acción tampón y la concentración del material de las ampollas de Henle y del epidídimo. En ovinos, el pH tiende a la acidosis, fenómeno importante, ya que en él radica su capacidad fecundante. La reacción alcalina es característica de una escasa fertilidad, que muchas veces, va acompañada de necroespermia y de una disminución en la concentración espermática y motilidad (Derivaux, 1982).

En el Perú (Ascue, 1985), trabajando con muestras de ovino de la sierra central, reportó un rango de pH de entre 6.3 y 6.8.

### **2.1.5.2 Morfología de los espermatozoides**

El espermatozoide normal está compuesto de una cabeza y una cola dividida en una pieza intermedia, una pieza principal y una pieza terminal (Del Campo, 1993).

Los componentes importantes de la cabeza incluyen el núcleo que contiene el código genético, la membrana nuclear y el acrosoma que contiene las enzimas necesarias para la penetración de la corona radiada y la zona pelúcida durante la fertilización (Del Campo, 1993).

En la pieza intermedia, se encuentra el manto mitocondrial que contiene enzimas que convierten la fructosa y otros substratos energéticos en compuestos de alta energía que pueden ser utilizados por el espermatozoide (Del Campo, 1993).

La pieza terminal difiere de la pieza principal por carecer de una cubierta protectora, pero ambas son de suma importancia por poseer el filamento axial que se compone de un haz de fibrillas que al contraerse impulsan la movilidad del espermatozoide (Del Campo, 1993).

### **2.1.5.3 Examen morfológico del eyaculado**

Este examen es una prueba de control de calidad. Cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides vivos y muertos, también normales y anormales, pero si la proporción es muy alta de estos últimos, entonces estaremos ante un semen de baja fertilidad. Las anomalías pueden ser primarias (espermatogénesis), secundarias (paso por el epidídimo) y terciarias luego de la eyaculación y el manejo (Aisen, 2004; Evans, 1990).

El porcentaje de formas anormales puede cambiar con la estación del año y con la temperatura ambiente, por ello, si no se producen problemas debido a temperaturas muy elevadas, este análisis es bueno realizarlo (Del Campo, 1990).

El semen de los reproductores no debe contener más de un 20-30% de espermios muertos (coloreados) y no más de un 15-20% de espermios anormales, en el primer eyaculado de una serie. Estos valores disminuyen normalmente con el número de colectas (Del Campo, 1990).

Existen gran cantidad de tinciones, como: eosina-nigrosina, rojo de Bengala-Azul Victoria, Giemsa, Triptan azul, azul de anilina, etc. Por lo común; se cuentan 200 espermatozoides en varios campos y se anotan los alterados y el tipo de alteración (Galina y Valencia, 2008).

#### **a) Anormalidades de morfología espermática**

Las anormalidades morfológicas de los espermatozoides pueden ser primarias, secundarias o terciarias. Las primarias se deben a falla en la espermatogénesis, mientras que las secundarias, ocurren durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo. La lesión espermática que se produce durante la eyaculación, después de ella o por manejo inadecuado del

semen extraído para inseminación artificial, se considera una anomalía espermática (Hafez, 2000).

- **Anormalidades primarias**

Significan un trastorno en la espermatogénesis y/o tejido testicular a nivel del acrosoma (pérdida del borde apical, abultamiento, arrugado, incompleto, desdoblado), cabeza (piriforme, flagelado, irregular, angosta, macrocefálico, cabeza doble, micro cefálico) y cola (corta, doble, retorcida, con presencia de gota citoplasmática).

- **Anormalidades secundarias**

Ocurren durante el transporte de los espermatozoides, desde el túbulo seminífero y/o epidídimo hasta su salida por la uretra durante la eyaculación. En este tipo de anomalías, tenemos cabezas sueltas, acrosoma desprendido, etc. (Evans y Maxwell, 1990).

## **b) Algunas técnicas mediante tinciones para evaluación de espermatozoides anormales**

- **Evaluación del acrosoma**

- **Tinción con Giemsa**

Este método de tinción permite valorar el estado del acrosoma.

La solución de Giemsa, contiene eosina, azul de metileno y una serie de productos de la oxidación de este, ambos disueltos en metanol (Cannavaro, 2011).

### **Procedimiento**

Fijar la muestra con solución salina formolada (5%) de 15 a 20 minutos, después cubrir la extensión con colorante Giemsa durante 90 minutos. Transcurridos los cuales se retira el colorante se lavan los portaobjetos con la solución tamponada y se dejan escurrir en posición vertical hasta que estén completamente secos (Cannavaro, 2011).

## **Azul de Anilina**

Permite diferenciar morfológicamente células espermáticas con acrosoma íntegro y dañado usando el microscopio simple.

Se usa solución PBS, pH 7,2;; glutaraldehído al 3 % en PBS, solución al 2 % de ácido acético, azul de anilina (Cannavaro, 2011).

## **Procedimiento**

Centrifugar 10 ml de semen diuído, eliminar el sobrenadante y agregar igual volumen de MRA y homogenizar, después gotear en la lámina portaobjeto y secar a temperatura ambiente por 5-10 minutos. Fijar en glutaraldehído al 3% por inmersión durante 15 minutos, escurrir y dejar secar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, sumergir en colorante azul de anilina durante 30 minutos, lavar con agua destilada hasta eliminar restos del colorante, dejar secar a temperatura ambiente y observar (Cannavaro, 2011).

- **Evaluación de membrana espermática:**

### **Tinciones vitales**

Estas tinciones vitales se utilizan para poner en evidencia la integridad estructural de la membrana espermática, mediante el uso de colorantes no permeables que solo penetran en el interior de la célula si la membrana no está íntegra (Cannavaro, 2011).

#### **- Tinción con Azul Triptan:**

Se usa los reactivos. 2 gr de Triptan azul y 100 cc de diluyente (Cannavaro, 2011).

### **Procedimiento**

Se diluye el colorante Triptan azul en el mismo medio de dilución que los espermatozoides. Después, se mezcla la muestra espermática con un volumen igual de solución de triptan azul 1:1 v/v. Seguidamente, se incuba por 15 minutos a 37°C y se deja secar a temperatura ambiente (Cannavaro, 2011).

### **Tinción mediante Hancockstain (esosina-nigrosina)**

Esta prueba fue utilizada por primera vez en 1942 por Lasley y colaboradores (Del Campo, 1990), utilizando colorantes que eran absorbidos solo por las células muertas. Se usa reactivos: colorante Hancockstain (colorante a base de eosina-nigrosina) (Cannavaro, 2011).

### **Procedimiento**

Se calienta la lámina porta objetos sobre una platina a 37°C, luego se coloca en un extremo de la lámina una gota de semen puro, seguidamente agregar una gota del colorante sobre el semen, mezclar suavemente, dejar unos 20 segundos para que el colorante penetre en la membrana celular y con otro porta objetos; extender la muestra por frotis en la lámina, dejar secar a temperatura ambiente y observar al microscopio (Cannavaro, 2011).

### **Nota**

Se observan, en microscopio de campo claro; espermatozoides con cabeza blanca (sin teñir) y se corresponden con espermatozoides vivos y espermatozoides

con cabeza azulada (teñidos), que se clasifican como espermatozoides muertos (Cannavaro, 2011).

El cálculo de los distintos porcentajes permite clasificar los animales y decidir cuáles pueden ser utilizados para la IA. Un examen regular del semen de cada macho permite la detección de anomalías inesperadas o de descubrir qué macho sufre alteraciones espermáticas y por consiguiente bajo poder fecundante (Aisen, 2009).

#### **2.1.5.4 Test hipo osmótico (Prueba de Host)**

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

El test hipo osmótico será realizado según la técnica descrita por Jeyendran y col. (1984), que consiste en colocar a los espermatozoides a un medio de presión hiposmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua hacia el interior de la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (Pérez-

Llano *et al.*, 1999), la entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con membrana física funcionalmente dañada no experimentarían cambios en la forma del flagelo.

### **2.1.6 Dilutores**

Un diluyente es todo aquel compuesto que va a brindar protección al espermatozoide y volumen al eyaculado por periodos cortos o largos de tiempo al conservar su metabolismo, viabilidad y fertilidad (Guzmán, 2004).

El diluyente debe mejorar el poder fecundante del esperma y mantenerlo a un nivel elevado durante el mayor tiempo posible, debe ser de fácil preparación y prestarse fácilmente a la esterilización y asepsia y ser finalmente económico (Derivaux, 1982).

La dilución de los eyaculados tiene como objeto aumentar el volumen y mantener una concentración espermática adecuada para dar servicio al mayor número posible de hembras (Evans y Maxwell, 1990).

Los diluyentes seminales deben cubrir una serie de requisitos tales como pH, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Deben también contener una fuente que sirva de reserva para darle energía al

espermatozoide, no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y, sobre todo, proporcionar a la célula espermática protección frente a efectos de baja temperatura (Cortés, 1997).

#### **2.1.6.1 Características de los diluyentes**

- Debe ser isotónico al semen al tener las mismas concentraciones de iones libres (Daza, 1997).
- Debe tener capacidad amortiguadora, evitando los cambios de pH, ejemplo: solución isotónica de citrato de sodio (Galina y Valencia, 2008).
- Los diluyentes deben proteger a los espermatozoides de las lesiones del choque por frío durante el enfriamiento de temperaturas corporales a 5° C, ejemplo: lecitinas y lipoproteínas encontradas en la yema de huevo o leche (Del Campo, 1990).
- Debe proporcionar nutrientes y energía para el metabolismo de los espermatozoides, para que mantengan su actividad metabólica, ejemplo: yema de huevo, leche y algunos azúcares simples (Del Campo, 1990).
- Restringir el crecimiento de microorganismos mediante la adición de antibióticos, antimicóticos y otras sustancias (Del Campo, 1993).

El diluyente debe preservar la vida del espermatozoide con un mínimo de efecto sobre la fertilidad (Galina y Valencia, 2008).

#### **2.1.6.2 Algunos dilutores**

- **Leche**

Es un diluyente que proporciona un medio isotónico y mantiene la viabilidad espermática. En ovinos, se utiliza para semen fresco y refrigerado, ya que se han obtenido resultados variables en la leche, siendo rica en citratos, fosfatos y azúcares; sin embargo, contiene lactoninas, que son proteínas capaces de lesionar a los espermatozoides, por lo que deberán ser destruidas por calentamiento a 92-95° C durante 10 min., evitando su ebullición. La leche puede utilizarse de la siguiente manera: entera, homogeneizada, estandarizada, descremada o en polvo, pero todas ellas deberán ser sometidas a calentamiento (De Lucas, 2004).

- **Yema de huevo**

La yema de huevo, a través de sus compuestos lípido proteicos, resulta un excelente protector de la membrana espermática; posee; además, glucosa para ser metabolizada

por los espermatozoides, elementos proteicos y vitamínicos, otorgando finalmente un interesante grado de viscosidad que hace al semen más manejable. Esta deberá ser fresca y se recomienda previa limpieza del cascarón con alcohol (Evans y Maxwell, 1990).

- **Agua de coco**

El agua de coco, por ser pobre en fosfolípidos, se presenta como un diluyente favorable, facilitando un excelente comportamiento del semen caprino, tanto in vitro como in vivo. Este dilutor presenta resultados satisfactorios con el semen diluido y enfriado a 4° C (Nunes y Pérez, 2001).

- **INRA 82**

Es comúnmente usado en Francia mantiene mejor la motilidad del semen. El semen equino diluido con INRA 82 refrigerado a 5°C a 96 h. mantuvo una motilidad de 56%.

- **Tris**

Sus características principales son poseer una buena capacidad tampón, actividad diurética y osmótica, además de baja toxicidad en altas concentraciones. Existe una amplia

gama de diluyentes desarrollados a través del tiempo, los cuales presentan diferentes composiciones y cualidades. De todos éstos, el diluyente Tris-fructosa-yema de huevo desarrollado por Salomon y Maxwell (2000), es hasta hoy el más recomendado para semen refrigerado y congelado de carnero (Brinsko y Varner, 1992)

El diluyente Tris es recomendado para la preservación refrigerada del semen de carnero (Evans y Maxwell, 1987); sin embargo, se obtiene resultados también superiores de fertilidad al comparar la preservación de semen de carnero a 5°C de un diluyente en base a leche – yema de huevo, respecto a otro en base a Tris – yema (Paulenz y Col, 2003).

Por tal motivo, viendo las ventajas del dilutor Tris en el semen ovino, sus diferentes características positivas y su preparación mecánica, es que se usó en el trabajo de investigación para calcular el porcentaje de fertilidad, comparándolo con otro dilutor de origen comercial.

- **Triladyl**

Fabricado en Alemania por el laboratorio Minitube; este es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en Tris (Hidoxi-metil-aminometano, un amortiguador sintético) y además, contiene agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructosa y por cada 100 ml, contiene los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg, y lincomisina 15 mg.

El diluyente Triladyl ha sido utilizado anteriormente en rumiantes silvestres para la criopreservación de semen de gacela (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr* y *G. dorcasneglecta*); (Garde *et al.*, 2003), ciervo axis (Haigh *et al.*, 1993) y ciervo rojo (Zomborszky *et al.*, 2005) con resultados positivos.

Para el trabajo de investigación, se usó el diluyente Triladyl por sus ventajas en distintas especies de rumiantes, también, porque no se registran trabajos en la región sur (Puno y Tacna) acerca de este dilutor usado para congelamiento de semen, por lo que la investigación experimental, contribuye como referente para nuevos trabajos en la especie ovina.

### **2.1.7 Dilución de semen**

La principal razón para diluir el semen, antes de su uso en la inseminación artificial, es obtener un mayor aprovechamiento del eyaculado. Durante la monta natural, un carnero fértil deposita millones de espermatozoides en la vagina de la hembra, en tanto, solo algunos millares de esos espermatozoides penetran en la cérvix. En la I.A., tanto el volumen y el número de espermatozoides pueden ser reducidos en comparación con la inseminación natural (Da Silva, 2014)

El límite mínimo para obtener una tasa de concepción aceptable es de 100-300 millones de espermatozoides por dosis de inseminación, eso posibilita una inseminación de un gran número de hembras con un único eyaculado (Da Silva, 2014).

La dilución de semen debe ser hecha lo más rápido posible después de la colecta, y se señala que dependiendo del número de ovejas a inseminar por carnero, la dilución puede ser 1:1; 1:2; 1:3, no excediendo la relación 1:10, dependiendo del método de inseminación (Latorre, 2000).

La dilución de semen se realizó en relación 1:2 (semen/dilutor), deberá hacerse tan pronto como se pueda. Una vez recolectado el semen, el dilutor se colocó en baño maría a una temperatura de 37°C aproximadamente, para que cuando se añada al semen no ocurra el

shock por enfriamiento y puedan tener la misma temperatura. La adición del diluyente frío al semen puede ocasionar el shock térmico con la consiguiente reducción de la fertilidad. Después de adicionar el diluyente, se agitó todo convenientemente y se examinó al microscopio para comprobar la motilidad de los espermatozoides (Pereyra-Bonnet *et al.*, 2011).

#### **2.1.8 Refrigeración de semen**

Con la refrigeración, se produce una reducción de la motilidad y actividad metabólica, aumentando la vida media del espermatozoide hasta su utilización. La motilidad se detiene totalmente a los 5°C, pero se puede restituir si se eleva nuevamente la temperatura a los niveles normales, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por “shock térmico”, produciendo cambios irreversibles en la célula espermática (Da Silva, 2014)

Uno de los mayores problemas técnicos que presenta la inseminación artificial con semen refrigerado, es que el poder fecundante que presenta el semen así conservado, es limitado en el tiempo. Los ensayos, a nivel internacional, reportan una disminución entre 10 a 30% por cada 24 horas de refrigeración, en la fertilidad obtenida respecto al semen fresco (Da Silva, 2014)

El objetivo de refrigerar el semen previamente a su uso es reducir el metabolismo energético de los espermatozoides, prologando así su viabilidad y capacidad fecundante en el tiempo (Evans y Maxwell, 1990) .

### **2.1.9 Inseminación artificial**

La inseminación artificial (IA) es un método de reproducción en el que se obtiene el semen del macho para introducirlo posteriormente en el aparato genital de la hembra, por medio instrumental. La I.A. tiene como objetivo la utilización del eyaculado de un macho con características productivas superiores, en un gran número de hembras (Aisen, 2009).

- **Tipos de inseminación artificial**

- a) Intracervical**

- Se deposita el semen en el interior del canal del cuello del útero o cérvix. Requiere de una dosis mayor de semen que si se utiliza otro método (Evans y Maxwell, 1990).

- b) Transfondo vaginal**

- Se deposita en el fondo de la vagina (Evans y Maxwell, 1990).

### **c) Intrauterino**

Se deposita el semen en la curvatura mayor de cada cuerno uterino, en el interior (Evans y Maxwell, 1990).

La inseminación cervical implica la deposición del semen a una profundidad de hasta 3 cm dentro del cérvix.

#### **- Características del cérvix ovino**

El cérvix es la porción más caudal del útero. Provee lubricación, asiste en el transporte de espermatozoides a través de canales selectivos y proporciona una barrera durante la preñez. Su estrecho lumen se encuentra rodeado de una gruesa pared de tejido músculo-conectivo (Del Campo, 1990)

La longitud de medida del cuello uterino ovino es variable, dependiendo de factores tales como la edad y la raza. En promedio, el cérvix ovino presenta una longitud de 6 a 7 cm y se encuentra constituido de 5 – 7 anillos excéntricos entre sí, los anillos cervicales son de tejido fibroso y muscular y que apenas se dilatan al celo (Aisen, 2009).

## **2.1.10 Diagnóstico de gestación**

### **a) Ultrasonografía**

En pequeños rumiantes, el uso más frecuente de la ultrasonografía es mediante una sonda transabdominal de 5 MHz de frecuencia para realizar el diagnóstico y seguimiento de la gestación. Esta técnica resulta fiable y precoz, pero no permite visualizar el útero no gestante ni el ovario. Es aconsejable que el animal permanezca en ayunas 24 horas antes de la realización de la ecografía para evitar un excesivo contenido en el rumen e intestino que dificultaría la visión. La sonda impregnada con el gel se aplica en la región inguinal del flanco derecho en dirección a la ubre, realizando un barrido tanto caudal y superior como craneal e inferior (Mellisho, 2007).

### **b) Ecografía transrectal**

Se utilizará como herramienta para el diagnóstico de gestación o de seguimiento del desarrollo y estado de la cría en el útero. El diagnóstico se agiliza a partir de los 40 días de gestación, debido a una confirmación de la preñez por la presencia de cotiledones placentarios (Bidinost y Gibbons, 1999).

### **c) Taza de no retorno al celo**

Esta técnica consiste en el porcentaje de animales no vistos en celo en un determinado periodo después del servicio o de la IA. Este método bien manejado y en los tiempos precisos, tiene una buena exactitud (Mellisho, 2007).

Normalmente, se debe revisar el celo con un macho vasectomizado o entero cubierto con una pechera (todo el prepucio) a los  $17\pm 1$  y  $34\pm 1$  días posteriores a la inseminación, registrando las hembras que aceptan la monta o rechazan al macho. Sin embargo, este método puede no ser recomendado fuera de la estación reproductiva en especial en razas de ovinos que presentan anestros profundos (Mellisho, 2007).

### **d) Perneo**

Este método consiste en ubicar las ovejas sentadas (sujetadas por el operador) y realizar una palpación abdominal. Esto se efectúa al 4to mes de gestación. Resultando con un alto margen de seguridad al diagnosticar gestación positiva, sin embargo, al no sentir la presencia del feto (no gestante) a veces puede resultar en error al no sentir fetos muy pequeños. Este método no permite

predecir de manera exacta el número de fetos en el vientre (Mellisho, 2007).

## **2.2. Antecedentes del estudio**

La IA en los ovinos ha sido utilizada desde los años veinte en la Unión Soviética; el semen era usado en forma natural y solo por pocas horas; pero en el año 1940, Philips P. y Lardy logran un diluyente a base de fosfato de sodio y potasio que agregado a la yema de huevo y enfriado, permite la sobrevivencia de los espermatozoides durante varios días (Del Campo, 1990).

Los resultados en Tuxpan (México), realizados con dilutor comercial Triladyl (Triladyl (20 %), agua bidestilada (60 %) y yema de huevo de gallina (20 %)), se desprende que el porcentaje de preñes alcanzado en 100 cabras criollas mediante inseminación intrauterina por laparoscopia, utilizando 100 millones de espermatozoides por dosis a las 24 horas con semen diluido y refrigerado a 5°C, muestra una fertilidad del 67,5 % (Martínez, Hernández, y Hernández, 1990).

Los trabajos realizados en el Centro de Investigación de Reproducción Biológica del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de Quebec (Canadá), demuestran que en dos muestras de semen de carnero Hampshire (1ra semen fresco a 5°C (MM 78 % y MIP 50 %)) y la

2da con fluido sintético del oviducto (SOFT-m) a 39°C (MM 80 % y MIP 52 %) diluidos con Triladyl (7 % de glicerol) a 24 horas de refrigeración (5°C), presenta un efecto negativo en la motilidad del semen combinado y almacenado con SOFT-m (0 %); por el contrario, la primera muestra con semen fresco no presenta variabilidad en cuanto a la motilidad y viabilidad del eyaculado a 24 horas de análisis (MM 57 % y MIP 40 %) (Morrier *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos en los laboratorios de Biotecnología Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires sobre viabilidad espermática en carnero Texel en diferentes horarios de refrigeración (0; 24 y 48 horas), muestra resultados sobre motilidad individual progresiva de 2,42 %; 2,25 % y 1,50 % (rango de 0-5) y porcentaje de vitalidad de 59,17 %; 56,67 % y 31,67 % al análisis del semen refrigerado de 5-7°C con dilutor comercial Triladyl y una dilución 1:6 (semen/dilutor) (Dinatolo, 2011).

Los resultados encontrados por Belma Exrlalia Delgado Cáceres en el Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria la Molina, la evaluación espermática en carneros raza Assaf usando dilutor Triladyl refrigerado a 5°C y considerando parámetros como motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana, se obtuvo los porcentajes de 85,73 %;

75,19 % y 73,36 % a las 0 horas y de 82,43 %; 68,82 % y 67,97% % a las 24 horas de análisis seminal (Delgado, 2006).

Los resultados del Grupo de Reproducción de Pequeños Rumiantes INTA EEA-Bariloche, indican resultados de fertilidad de 58-65% empleando semen fresco (sin diluir) en ovejas raza merino australiano, obtenido en los últimos años realizando sincronización de celo con esponjas vaginales y una concentración espermática de 100-150 X 10<sup>6</sup> millones de espermatozoides por dosis de inseminación (Naim *et al.*, 2004).

Los trabajos sobre fertilidad realizados en Uruguay por Gil y Olivera (Proyecto Merino Fino del Uruguay) con el diluyente en base a leche descremada UHT (ultra alta temperatura) 5 % yema de huevo de gallina, 2 % glicerol, 100 000 UI Penicilina – 0,1 g estreptomycin, confirman mediante inseminación artificial con una concentración de 120x10<sup>6</sup>, un porcentaje de fertilidad de 49 %; a comparación del diluyente Tris (Fructosa 0,5 g, Ácido cítrico 1,99 g, yema de huevo de gallina 14 %, Penicilina 100 000 UI – Estreptomycin 0.1 g.) con un porcentaje de 19% a las 24 horas, asimismo, resultados de 47 % y 22 % de fertilidad respectivamente a las 48 horas (Olivera *et al.*, 2011).

Estudios realizados en Uruguay (Río Negro) en ovejas merino, donde se detectó celo natural durante época reproductiva, señalan que al inseminar artificialmente a 87 ovejas (0 h) y 84 ovejas (24 h) con semen diluido en Tris, refrigerado a 5°C y una concentración de  $200 \times 10^6$ , se obtuvo una fertilidad de 54,0 % (47/87) a las 0 horas y de 34,5 % (29/84) a las 24 horas post-colecta de semen (Menchaca *et al.*, 2005).

Trabajos realizados en el CIP Quimsachata – INIA – Puno, sobre la evaluación de la fertilidad en 54 alpacas Huacaya, empleando dilutor Tris-yema de Huevo refrigerado a 7°C con una concentración de  $15 \times 10^6$  en diferentes tiempos de post inducción de ovulación a las 26, 28 y 30 horas, revelan que el porcentaje de fertilidad a la 26 horas fue de 16.6% (González, 2011).

Trabajos realizados sobre evaluación seminal en cabras en diciembre del 2003 y marzo del 2004 en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), señala que la refrigeración a 5°C usando dilutor Tris-yema de huevo y con una dilución de 1:10 (semen/dilutor) para evaluar características seminales a las 0, 24 y 48 horas (MIP e integridad de membrana) en machos cabríos raza Anglonubian fue de 95,0 %;

91,0 % y 75,3 % y de 65,6 %; 57,0 % y 53,33 % respectivamente (Sarria *et al.*, 2007).

Resultados sobre el comportamiento espermático de caprinos adultos machos (criollos cruce Anglonubian) en la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga ( Ayacucho), indica que realizando la evaluación de los parámetros espermáticos sobre motilidad individual y vitalidad espermática, con el dilutor Tris-citrato-yema de huevo y una dilución de 1:4, reporta un 87,2 %; 70,6 % y 67,2 % a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración a 5°C para MIP; del mismo modo, resultados de 93,9 %, 85,0 % y 83,9 % para porcentajes de vitalidad seminal (Palomino *et al.*, 2007).

### **2.3 Base conceptual**

Para los efectos de este estudio, se ha considerado los siguientes conceptos:

#### **a) Fertilidad**

La fertilidad es la capacidad de un ser vivo de producir o sustentar una progenie numerosa. Este es el resultado de la interacción de varios factores, tanto biológicos, edad, estado de salud y el funcionamiento del sistema endocrino.

## **b) Inseminación artificial**

Inseminación artificial es todo aquel método de reproducción asistida que consiste en el depósito de espermatozoides de manera no natural, mediante instrumental especializado y utilizando técnicas que reemplazan a la copulación en el útero, en el cérvix o en las trompas de falopio, con el fin de conseguir una preñez.

## **c) Diluyente**

Un diluyente es todo aquel compuesto que va a brindar protección al espermatozoide y volumen al eyaculado, por períodos cortos o largos de tiempo, al conservar su metabolismo, viabilidad y fertilidad (Guzmán, 2004).

## **d) Eyaculado**

El eyaculado es el producto de la mezcla de secreciones procedentes del testículo, donde se producen los espermatozoides, con las secreciones de la próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales.

**e) Carnero**

Mamífero rumiante ovino, macho, con grandes cuernos estriados y enrollados en espiral cuerpo cubierto de lana espesa, macho de la oveja con uno o más períodos reproductivos, de 2 a 8 dientes. Peso vivo: 75 - 80 hasta 100 kg.

**f) Vagina artificial**

La vagina artificial consta, normalmente, de un cilindro que puede ser de goma y rígido de 12 a 15 cm de largo y alrededor de 5 cm de diámetro en el cual se hace un orificio provisto de un tapón de rosca. Por el centro del dispositivo, se introducirá el agua caliente a 40-42 °C y el aire para simular las condiciones de temperatura y presión adecuadas. Entre el tubo de la vagina y el agua caliente, debe existir un tubo de látex que sirve como funda para la vagina (Bearden y Fuquay, 1982).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de investigación**

El trabajo se realizó en la Estación Experimental Agraria Illpa - INIA ubicada en el distrito de Paucarcolla de la provincia de Puno, en el departamento de Puno, a 15°40'37" latitud sur y 70°04'38" longitud oeste, a una altitud promedio de 3, 815 m.s.n.m.

La temperatura fluctúa entre 1,60 – 16,30 °C; siendo el promedio durante el año aproximadamente 7°C (CONCYTEC, 2007).

#### **3.2 Tipo de investigación**

Esta investigación es de tipo experimental, donde los estudios realizados en el trabajo de investigación proporcionan los resultados de los diferentes tratamientos con el objetivo de evaluar la fertilidad.

#### **3.3 Población y muestra**

La población es de 320 ovejas raza Dohne merino.

### 3.3.1 Tamaño de muestra

El cálculo del tamaño de muestra para una población finita para el muestreo de análisis de estudio, fue mediante la siguiente fórmula (Rojas C., 2002).

Universo: 320 hembras

$$n = \frac{Z^2 p x q x N}{N x e^2 + Z^2 p x q}$$

Donde:

n = tamaño de muestra

N = universo 320 ovejas

Z = 1,96 (95 % de confianza)

p = valor de éxito (0,5)

q = valores de fracaso (0,5)

e = error de la estimación (7,23 %)

**Aplicando la fórmula se tiene:**

$$n = \frac{(1,96)^2 \times (0,5) \times (0,5) \times 320}{320 \times (0,0723)^2 + (1,96)^2 \times (0,5) \times (0,5)}$$

$$n = \frac{3,84 \times 0,25 \times 320}{320 \times 0,0052 + 3,84 \times 0,25}$$

$$n = \frac{3,072}{2,624} = 117 \text{ ovejas}$$

Por lo tanto, el tamaño de muestra fue 117 ovejas.

### **3.4 Material y equipos**

#### **3.4.1 Material experimental**

- 117 ovejas raza Dohne merino multíparas y primíparas
- 1 macho de 2 años con buenas características seminales raza Dohne merino
- 1 machos vasectomizado (retajo)

### **3.4.2 Material empleado para la colecta de semen**

- Bolsitas de plástico en forma de cono para tubo colector
- Tubo de PBC o de metal para ovinos con escotilla de presión
- Elásticos de plástico
- Tubos Falcom (15 ml)
- Fundas de latex
- Termo
- Toalla para mantener temperatura de vagina artificial.
- Cinta Maskintape
- Plumones de tinta indeleble

### **3.4.3 Material de laboratorio**

- Vortex
- Termómetro
- Microscopio óptico
- Platina calefactable
- Láminas Portaobjetos y cubreobjetos
- Micropipeta graduada
- Tubos de ensayo
- Vaso de precipitado
- Cámara NeuBauer

- Tubos de ensayo
- Jeringas hipodérmicas # 21, 23
- Jeringa Tuberculina (1ml)
- Calentador
- Hervidor eléctrico
- Refrigeradora
- Equipo de proctoscopia (proctoscopio y fuente de luz)
- Fundas de inseminación tipo pico de pato
- Papel toalla
- Estufa

#### **3.4.4 Material químico**

Los reactivos utilizados en la conservación de semen son: Tris y Triladyl.

##### **3.4.4.1 TRIS**

- Tris hydroxymethylaminomethano
- Fructosa
- Ácido cítrico 1-hidrato
- Gentamicina-Estreptomicina
- Yema de Huevo

- Agua Bidestilada

#### **3.4.4.2 TRILADYL**

- Tris (Hidoxi-metil-aminometano)
- Agua bidestilada
- Glicerol
- Ácido cítrico
- Fructosa
- Por cada 100ml, contiene los siguientes antibióticos: tilosina 5mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomisina 15 mg.

Los reactivos utilizados en la tinción eosina-nigrosina son:

- Eosina (soluble en agua)
- Nigrosina (soluble en agua)
- Tricitrato de sodio
- Agua bidestilada

### 3.5 Metodología

#### 3.5.1 Formación de grupos de estudio

Tabla 3. Grupos de investigación

TRATAMIENTO 1 (semen fresco)				TRATAMIENTO 2 (semen/Tris)				TRATAMIENTO 3 (semen/Triladyl)									
0 horas		24 horas		48 horas		0 horas		24 horas		48 horas		0 horas		24 horas		48 horas	
7ov.	6ov.	7ov.	6ov.	7ov.	6ov.	7ov.	6ov.	7ov.	6ov.	7ov.	6ov.	7ov.	6ov.	7ov.	6ov.	7ov.	6ov.
<b>TOTAL =117 ovejas</b>																	

Fuente: Elaboración propia

De las 117 ovejas, solo se inseminaron 91, ya que el semen tuvo una mortalidad total a las 12 horas, restando 26 ovejas del grupo control (semen fresco) de 24 y 48 horas.

#### 3.5.2 Tratamientos

##### Tratamiento 1

Es el grupo control (semen fresco sin diluir). Se inseminó a las 0 horas. Sólo se utilizó 13 ovejas (con 2 repeticiones cada una: r1=7 ovejas y r2=6 ovejas), haciendo un total de 13 animales.

## **Tratamiento 2**

Este grupo se diluyó con dilutor Tris, del cual se inseminó 39 ovejas, las mismas que se dividieron en 3 horarios: a las 0 horas, a las 24 horas y a las 48 horas. En cada horario, igualmente se utilizó 13 animales con 2 repeticiones cada uno: r1=7 ovejas y r2=6 ovejas.

## **Tratamiento 3**

El semen se diluyó con el dilutor comercial Triladyl y se inseminó a 39 ovejas en celo, las cuales se distribuyeron en grupos de 13, cada una en los distintos horarios: 0 horas, 24 horas y 48 horas, cada una con dos repeticiones (r1=7 ovejas y r2= 6 ovejas).

### **3.5.3 Secuencia de actividades**

Se seleccionaron tres grupos de investigación según se detalla en la tabla 3 con 39 ovejas por tratamiento, repartidas en 13 animales por cada horario (0, 24 y 48 horas).

El trabajo se llevó a cabo durante el período otoño invernal (3 de junio – 28 de agosto) del presente año, en la Estación Experimental Agraria ILLPA – INIA – PUNO que se encuentra ubicada en el distrito de Paucarcolla de la provincia de Puno.

Se seleccionó 117 hembras (primíparas y multíparas). Con un peso promedio de 45 Kg., de las cuales 39 formaron el grupo control, 39 formaron el segundo grupo experimental con dilutor Tris y 39 formaron un tercer grupo experimental con dilutor comercial Triladyl.

Las extracciones seminales se realizaron a 1 macho seleccionado con las mejores características seminales. Para esto, de los 4 machos que contaba el Centro Experimental (raza Dohne merino), se efectuó 5 colecciones previas evaluando la motilidad masal (MM), motilidad individual progresiva (MIP), pH, integridad de membrana, vitalidad y morfología de los espermatozoides de cada eyaculado.

Los eyaculados se colectaron 24 y 48 horas previas a la inseminación. Se mantuvo en un termo a 37°C durante la evaluación de la calidad seminal, teniendo en cuenta los siguientes parámetros evaluativos: MM, MIP, concentración espermática, vitalidad espermática (prueba eosina-nigrosina) e integridad de membrana (test hipo osmótico o prueba de Host).

Los eyaculados fueron rápidamente diluidos en una relación 1:2 (semen/diluyente). Se empleó los diluyentes Tris – yema de huevo y el dilutor comercial Triladyl a una temperatura de 37°C para evitar el shock por enfriamiento.

Para la refrigeración del semen ovino, primero se enfrió a temperatura ambiente el tubo colector de 30°C a 15°C, posteriormente se bajó gradualmente a 5 °C manteniendo la temperatura por refrigeración, el descenso de temperatura se hace gradual y puede demorar entre 2 y 3 horas,. El diluyente Tris se preparó según especificaciones teóricas al igual que el dilutor Triladyl.

De las 117 ovejas, solo se inseminaron 91 ya que la mortalidad del eyaculado fresco (sin diluir) era total a las 24 y 48 horas. Por lo tanto, se inseminaron 91 ovejas vía cervical cuando presentaron celo natural, detectados una vez al día por medio de un macho vasectomizado (retajo). Posteriormente, se inseminó con la ayuda de un equipo de proctoscopia con una concentración de  $250 \times 10^6$  de espermatozoides por dosis (ml/oveja) de acuerdo a los horarios y protocolos establecidos (a las 0, 24 y las 48 h.), siendo en el grupo control con semen fresco sin diluir solo 13 animales, finalizando la actividad con el marcaje de las ovejas de cada grupo.

Por último, se evaluó el porcentaje de fertilidad de cada protocolo (ovejas gestantes/ovejas inseminadas) a los 40 días de la última I.A. por medio del ecógrafo transrectal.

### **3.5.4 Metodología para cumplir el primer objetivo y segundo objetivo**

#### **3.5.4.1 Preparación de dilutor**

Para la preparación de los dilutores, en el caso del dilutor Tris, se realizó en forma mecánica con ayuda de una balanza previamente calibrada y en caso del dilutor Triladyl, se le añadió yema de huevo y agua bidestilada de acuerdo a la cantidad que se quería preparar (ml.)

#### **3.5.5 Diluyente TRIS**

Diluyente Tris: Para 10 ml de dilutor

- |                    |         |
|--------------------|---------|
| - Tris buffer      | 0,36 gr |
| - Ácido cítrico    | 0,19 gr |
| - Fructosa         | 0,5 gr  |
| - Yema de huevo    | 14 %    |
| - Gentamicina      | 0,1 ml  |
| - Agua bidestilada | 7 ml    |

### **3.5.6 Diluyente TRILADYL**

Así, se tiene diluyente Triladyl para 10 ml de dilutor:

- Dilutor Triladyl            1 porción
- Yema de huevo            1 porción
- Agua bidestilada        3 porciones

Se diluye por unos minutos en el vortex homogenizando la dilución.

### **3.5.7 Colección de semen**

Se utilizó una hembra para estimular el lívido y la monta del carnero. La colección de semen se realizó mediante vagina artificial. En el momento del salto, se dirigió con la mano izquierda el pene hacia el interior de la vagina artificial, procurando hacerlo siempre del prepucio para evitar la retracción y/o la contaminación del mismo. Con la superficie caliente de la vagina artificial, por la temperatura y presión, se sabe que el carnero eyaculó por el característico “golpe de riñón”.

### **3.5.8 Dilución de semen**

La dilución de semen se realizó en relación 1:2 (semen/dilutor). Se hizo de manera rápida para evitar el shock térmico y por la distancia del laboratorio para su análisis

El dilutor, previamente preparado, se lo puso en un termo a baño maría a una temperatura de 37°C aproximadamente.

Luego del eyaculado, se lo extrajo con una jeringa y se lo añadió por la pared del tubo colector de acuerdo con el volumen de semen.

### **3.5.9 Evaluación microscópica del semen a las 0, 24 Y 48 horas:**

#### **3.5.9.1 Motilidad masal subjetiva**

Se valoró en forma macro y microscópica, subjetivamente en un rango mayor a 3 en parámetros de 0 – 5.

#### **3.5.9.2 Motilidad individual progresiva subjetiva**

Se calculó con un valor subjetivo mayor a 4 (con escala de 0 – 6).

#### **3.5.9.3 Concentración espermática**

Se realizó mediante la fórmula citada por (Hafez 2000); el promedio del conteo de 5 cuadros que están ubicados en el centro de las dos retículas

(superior/inferior) en la cámara de NeuBauer, luego se multiplicó por 10 000 y después este resultado, se multiplicó por el volumen de la dilución.

*Concentración = Prom. x 10,000 = # de espermatozoides por ml.*

*Rec. esperm. = conc. x vol. de dilución = # total de esp. en eyaculado*

#### **3.5.9.4 Evaluación de vitalidad y morfología espermática**

Se colocó una gota de semen en una lámina portaobjeto y otra gota de coloración supravital eosina-nigrosina sobre la primera esperando unos segundos para la homogenización y la tinción de los espermios; posteriormente, en un ángulo de 45°, se deslizó la muestra con otra lámina portaobjetos, procurando que la tinción sea uniforme y de película fina en toda la lámina. Se realizó el recuento de 200 espermatozoides diferenciando vivos, muertos, normales y anormales (cabeza, cuello, cola, gota citoplasmática).

#### **3.5.9.4 Prueba de HOST (Hypoosmotic swelling Test)**

En un tubo de ensayo, se colocó 900 ul de solución hiposmótica, y 0,1 ml de semen a una temperatura de 37°C, por 1 hora para que ocurra la reacción (hinchazón de la cola); seguidamente, se le agrega 900 ul de formol para detener la reacción. Se extrajo una gota y se la puso en la

lámina portaobjetos para visualizar en el microscopio óptico; se cuentan 100 espermatozoides.

### **3.5.9.5 Refrigeración de semen**

La refrigeración se realizó en el tubo colector, primero descendiendo de una temperatura ambiente de 35°C a 25-30°C, posteriormente se bajó gradualmente a 5 °C, manteniendo la temperatura por refrigeración. El descenso de temperatura se hizo gradual en un refrigerador.

### **3.5.9.6 Dosis por inseminación**

Se realizó de la siguiente manera:

$$\# \text{ Ovejas a I.A.} = \frac{\text{Conc. esp.} \times \text{esp.vivos} \times \text{esp.normales}}{250,000,000}$$

$$\text{Dosis/I.A.} = \frac{\text{Vol.total}}{\# \text{ de ovejas}}$$

### **3.5.9.7 Inseminación artificial**

Para realizar la inseminación artificial, se apartó las hembras que estaban en celo, gracias a las marcas en la grupa que dejó el retajo. Con ayuda de un operario, se levantaron los miembros posteriores, quedando suspendida la hembra. Una vez en posición, se limpió la vulva con papel toalla y se introdujo el proctoscopio en la vagina en un ángulo de 45°. Seguidamente, se adaptó la fuente de luz para la visualización de la cervix y se introdujo la funda de inseminación con el semen ya cargado dentro de esta, procurando pasar la mayor cantidad de anillos (inseminación artificial vía cervical) depositando el semen en su interior.

### **3.5.9.8 Determinación de fertilidad mediante ecografía a los 40 días**

Se utilizó un ecógrafo modelo ALOKA para el diagnóstico de preñez que se efectuó a los 40 días post-inseminación, cuando el diagnóstico de gestación tiene una certeza muy alta (95 – 100%). Con anterioridad, los resultados suelen ser inciertos.

### **3.6 Análisis de datos**

Los resultados de fertilidad y características seminales fueron analizados mediante chi-cuadrada, operacionalizada en el programa (IBM SPSS) V.19 y mediante prueba de Tuckey, operacionalizada por el programa SAS (Statistical Analysis Sistem) V.1999, respectivamente.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

#### 4.1 Resultados de características seminales

**Tabla 4. Volumen de eyaculado, según dilutor y hora**

Dilutor	N	ml±SD	C.V
Tris	10	0,87± 0.22	25,44
Triladyl	10	0,80± 0.23	28,87

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 5. Porcentaje de motilidad masal, según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	4,20± 0,79 <sup>a</sup>	18,78	3,00	5,00
	24	10	2,95± 0,80 <sup>b</sup>	27,04	1,00	4,00
	48	10	2,30± 0,92 <sup>b</sup>	39,95	0,00	3,00
Triladyl	0	10	4,65± 0,47 <sup>a</sup>	10,20	4,00	5,00
	24	10	3,00± 0,53 <sup>b</sup>	17,57	2,00	4,00
	48	10	2,35± 0,47 <sup>c</sup>	20,18	2,00	3,00

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 5, observamos que la motilidad masal, según escala 1 – 5 (1 mínimo, 5 máximo) con dilutor Tris, a las 0 horas, muestra un valor superior (4.20%) a comparación con del semen refrigerado a las 24 y 48 horas, con promedios estadísticos similares de 2,95 % y 2,30 % respectivamente y que al análisis estadístico, indica que el factor tiempo de refrigeración tiene influencia altamente significativa en la motilidad masal a las 0 horas respecto a 24 y 48 horas ( $p<0,01$ ). Resultados similares se observa con el dilutor Triladyl a las 0, 24 y 48 horas, donde el tiempo de refrigeración a las 48 horas afecta de manera significativa la motilidad masal con respecto al análisis realizado a las 0 horas ( $p<0,01$ ).

Según la prueba de Tukey, las letras diferentes (a, b, c) en la misma columna dentro de cada dilutor indican diferencia significativa ( $p<0,01$ ).

**Tabla 6. Porcentaje de motilidad individual progresiva, según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	5,20± 0,79 <sup>a</sup>	15,17	4,00	6,00
	24	10	3,60± 0,99 <sup>b</sup>	27,62	1,00	4,50
	48	10	2,55± 1,12 <sup>b</sup>	43,80	0,00	4,00
Triladyl	0	10	5,40± 0,52 <sup>a</sup>	9,56	5,00	6,00
	24	10	3,70± 0,48 <sup>b</sup>	13,06	3,00	4,00
	48	10	2,80± 0,48 <sup>c</sup>	17,25	2,00	3,50

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 6, se observa que la motilidad individual progresiva con dilutor Tris-yema de huevo, desciende por acción del tiempo de refrigeración. Donde a las 0 horas, se obtuvo el mayor porcentaje de MIP (5,20 %) a comparación del semen refrigerado a las 48 horas con un porcentaje de 2,55 %. El análisis estadístico indica que el factor tiempo de refrigeración ejerce una influencia significativa entre estos dos horarios ( $p < 0,01$ ). Resultados similares se obtuvieron con el dilutor Triladyl a las 0, 24 y 48 horas donde la motilidad individual progresiva desciende en un mayor porcentaje a las 48 horas (2,80 %) respecto a las 24 horas de refrigeración (3,70 %) ( $p < 0,01$ ).

Habiéndose sometido los resultados a la prueba de Tukey, las letras (a, b, c) en la columna dentro de cada dilutor indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,01$ ).

**Tabla 7. Porcentaje de PH seminal, según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	6,90 ± 0,32 <sup>a</sup>	4,58	6,00	7,00
	24	10	6,55 ± 0,69 <sup>b</sup>	10,46	5,00	7,00
	48	10	6,11 ± 0,65 <sup>b</sup>	10,65	5,00	7,00
Triladyl	0	10	6,85 ± 0,34 <sup>a</sup>	4,93	6,00	7,00
	24	10	6,05 ± 0,55 <sup>b</sup>	9,10	5,00	7,00
	48	10	5,05 ± 0,60 <sup>c</sup>	11,85	4,00	6,00

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 7, se puede observar que el PH seminal ovino, con dilutor Tris analizado a las 0 horas, se obtiene un valor de 6,90 respecto a las 24 horas (6,55) y 48 horas (6,11). Siendo similares e inferiores a los del primer caso y que al análisis estadístico, indica que el factor tiempo de refrigeración tiene influencia significativa entre el primero y los dos horarios mencionados ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, el PH seminal con dilutor Triladyl a las 0 horas (6,85) es altamente significativo en comparación a las 24 (6,05) y 48 (5,05) horas, habiendo influencia significativa entre los 3 casos ( $p < 0,01$ ).

Mediante la prueba de Tukey, las letras diferentes (a, b, c), indican diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para dilutor Tris y diferencia altamente significativa ( $p < 0,01$ ) para dilutor Triladyl.

**Tabla 8. Porcentaje de concentración espermática según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	ml $\pm$ SD	C.V
Tris	0	10	3,700,000,000 $\pm$ 767,028,900 <sup>a</sup>	28,92 %
Triladyl	0	10	3,863,000,000 $\pm$ 1,117,259,047 <sup>a</sup>	20,73 %

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 8, se observa que al evaluar la concentración espermática de la muestra seminal, la concentración para dilutor Triladyl es de  $3,863 \times 10^6$  y para dilutor Tris es de  $3,7 \times 10^6$ , que al análisis estadístico, indica que no existe influencia significativa entre ambos dilutores.

Habiendo sometido los resultados a la prueba de Tukey, las letras iguales en la misma columna (a) dentro de cada dilutor, indican que no hay diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ).

**Tabla 9. Porcentaje de integridad de membrana por prueba de HOST, según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	$71,50 \pm 3,95^a$	5,53	65,00	77,00
	24	10	$60,80 \pm 7,00^b$	11,52	52,00	70,00
	48	10	$50,78 \pm 4,89^c$	9,64	45,00	60,00
Triladyl	0	10	$72,80 \pm 5,59^a$	7,68	64,00	82,00
	24	10	$60,40 \pm 9,72^b$	16,09	43,00	75,00
	48	10	$37,80 \pm 8,68^c$	22,95	23,00	52,00

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 9, se observa que el porcentaje de integridad de membrana según prueba de HOST, tuvo una reacción positiva decreciente a las 0, 24 y 48 con el dilutor Tris siendo de 71,50 %; 60,80 % y 50,78 % respectivamente y que al análisis estadístico, indica que el factor tiempo de refrigeración tiene influencia significativa sobre el

porcentaje de integridad de membrana ( $p < 0.01$ ), siendo a las 0 horas de análisis donde se observó el mayor porcentaje de integridad de membrana. Resultados similares se obtuvieron con el dilutor Triladyl a las 0, 24 y 48 horas con 72,80 %; 60,40 % y 37,80 % respectivamente, donde se evidencia que el tiempo de refrigeración a las 48 horas muestra el valor más bajo en comparación a las 24 horas de refrigeración ( $p < 0,01$ ).

Letras diferentes (a, b, c), en la misma columna dentro de cada dilutor indican diferencia significativa ( $p < 0,01$ ), mediante prueba de Tukey.

**Tabla 10. Porcentaje de vitalidad espermática, según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	64,25 ± 3,45 <sup>a</sup>	5,37	59,62	70,00
	24	10	53,45 ± 5,59 <sup>b</sup>	10,46	39,42	58,82
	48	10	45,84 ± 4,11 <sup>c</sup>	8,98	39,00	50,00
Triladyl	0	10	65,11 ± 2,89 <sup>a</sup>	4,44	60,00	69,00
	24	10	56,52 ± 2,65 <sup>b</sup>	4,69	53,85	61,22
	48	10	37,23 ± 5,93 <sup>c</sup>	15,92	25,74	46,15

Fuente: Elaboración propia

La tabla 10, muestra que la prueba de tinción supravital (eosina-nigrosina), en la vitalidad espermática, utilizando el dilutor elaborado a base de Tris-yema evaluado a las 0 horas, presenta el mayor porcentaje de espermatozoides vivos (64.25 %) en comparación con el semen refrigerado a las 24 y 48 horas (53,45 %); (45,84%), indicando una

influencia significativa del tiempo de refrigeración ( $p < 0,01$ ). Un resultado similar se ha obtenido utilizando el dilutor comercial Triladyl; sin embargo, con este último, el porcentaje de vitalidad a las 48 horas de refrigeración fue mucho menor en comparación al dilutor Tris.

Según la prueba de Tukey, las letras diferentes (a, b, c) en la misma columna dentro de cada dilutor, indican que hay diferencia significativa ( $p < 0,01$ ).

**Tabla 11. Porcentaje de espermatozoides normales, según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	95,97± 3,01 <sup>a</sup>	3,14	90,00	100,00
	24	10	91,36± 1,72 <sup>b</sup>	1,88	88,78	94,85
	48	10	88,69± 1,14 <sup>c</sup>	1,29	86,73	89,90
Triladyl	0	10	94,56± 3,60 <sup>a</sup>	3,80	88,79	98,99
	24	10	91,37± 2,67 <sup>a</sup>	2,93	85,86	94,00
	48	10	86,53± 2,48 <sup>b</sup>	2,86	82,47	90,63

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 11, podemos observar que al haber utilizado el dilutor a base de Tris y yema de huevo en el eyaculado, los resultados obtenidos de espermatozoides normales a las 0, 24 y 48 horas de refrigeración fueron de 95,97 %; 91,36 % y 88,69 % respectivamente, y que al análisis estadístico, demuestra que a las 0 horas presenta el mayor porcentaje de

espermatozoides normales respecto a las 24 y 48 horas, evidenciando alta significancia entre los tiempos de refrigeración ( $p < 0,01$ ). Por otro lado, al haber utilizado el dilutor comercial Triladyl, el tiempo de refrigeración a las 24 horas es similar a las 0 horas; sin embargo, a las 48 horas de refrigeración, este porcentaje disminuyó a 86,53 % mostrando un claro efecto negativo ( $p < 0,01$ ).

Letras diferentes en la misma columna (a, b, c) indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,01$ ) mediante la prueba de Tukey.

**Tabla 12. Porcentaje de anormalidades de la cabeza, según dilutor y hora de análisis.**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	0,13 ± 0,35 <sup>a</sup>	282,84	0,00	1,00
	24	10	0,23 ± 0,68 <sup>a</sup>	300,00	0,00	2,04
	48	10	0,38 ± 0,76 <sup>a</sup>	198,41	0,00	2,04
Triladyl	0	10	0,29 ± 0,67 <sup>a</sup>	227,71	0,00	2,00
	24	10	0,78 ± 2,48 <sup>a</sup>	316,23	0,00	7,84
	48	10	0,20 ± 0,65 <sup>a</sup>	316,23	0,00	2,04

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 12 se observa los porcentajes de anormalidades de la cabeza de los espermatozoide para el dilutor Tris analizado a las 0, 24 y 48 horas, fueron de 0,13 %; 0,23 % y 0,38 % respectivamente y al análisis estadístico, nos indica que no existe diferencia significativa entre estos

promedios ( $p \geq 0,05$ ); resultados similares se obtuvieron con el dilutor Triladyl a las 0, 24 y 48 horas que fueron de 0,29 %; 0,78 % y 0,20 % respectivamente donde tampoco existe diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ).

Letras iguales (a), en la misma columna dentro de cada dilutor, indican que no hay diferencia significativa ( $p \geq 0,05$ ), según prueba de Tukey.

**Tabla 13. Porcentaje de anomalías de la cola, según dilutor y hora**

Dilutor	Hora de análisis	N	Promedio, %	Coefficiente de variabilidad, %	Mínimo	Máximo
Tris	0	10	3,91 ± 2,94 <sup>b</sup>	75,23	0,00	10,00
	24	10	8,42 ± 1,91 <sup>a</sup>	22,70	5,15	11,22
	48	10	10,92 ± 0,68 <sup>a</sup>	6,22	10,10	12,00
Triladyl	0	10	5,14 ± 3,26 <sup>b</sup>	63,29	1,01	10,28
	24	10	7,84 ± 3,38 <sup>b</sup>	48,83	0,00	14,14
	48	10	13,27 ± 2,57 <sup>a</sup>	19,41	9,38	17,53

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 13, se observa que el porcentaje de anomalías de cola de los espermatozoides para el dilutor Tris, analizado a las 0, 24 y 48 horas fueron de 3,91 %; 8,42 % y 10,92 % respectivamente y al análisis estadístico, indica que sí existe diferencia significativa entre estos promedios; presentándose a las 24 y 48 horas de análisis donde se observó los mayores porcentajes de anomalías ( $p < 0,01$ ); resultados similares se obtuvieron con el dilutor Triladyl a las 0, 24 y 48 horas que

fueron de 5,14 %; 7,84 % y 13,27 % respectivamente donde también existe diferencia significativa ( $p < 0.01$ ).

Al haber llevado los resultados a la prueba de Tukey, las letras diferentes en la misma columna (a, b), indican diferencia significativa ( $p < 0.01$ ).

#### 4.2 Resultados de fertilidad

**Tabla 14. Diagnóstico de Fertilidad entre semen fresco y dilutor Tris a las 0 horas**

		PREÑADAS	VACIAS	Total
<b>FRESCO 0 H.</b>	Frecuencia Observada	10	3	13
	Frecuencia esperada	8,5	4,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>76,9 %</b>	<b>23,1 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRIS 0 H.</b>	Frecuencia Observada	7	6	13
	Frecuencia esperada	8,5	4,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>53,8 %</b>	<b>46,2 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TOTAL</b>	Frecuencia Observada	17	9	26
	Frecuencia esperada	17,0	9,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>65,4 %</b>	<b>34,6 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 14, se observa el diagnóstico de fertilidad a los 40 días post inseminación artificial. A las 0 horas, con semen fresco, se observa un porcentaje de 76,9 % y con dilutor Tris 53,8 %. Al análisis estadístico con

la prueba de chi-cuadrada, indica que no hay asociación estadística entre el porcentaje de fertilidad y los tratamientos ( $p \geq 0,05$ ). Esto indica que al añadir el dilutor Tris a un eyaculado e inseminar artificialmente por vía cervical a las 0 horas, no incrementa significativamente el porcentaje de fertilidad en comparación con semen fresco sin diluir al realizar el mismo método biotecnológico.

**Tabla 15. Diagnóstico de Fertilidad entre semen fresco y dilutor Triladyl a las 0 horas.**

		PREÑADAS	VACIAS	Total
<b>FRESCO 0 H.</b>	Frecuencia Observada	10	3	13
	Frecuencia esperada	9,5	3,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>76,9 %</b>	<b>23,1 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRILADYL 0 H.</b>	Frecuencia Observada	9	4	13
	Frecuencia esperada	9,5	3,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TOTAL</b>	Frecuencia Observada	19	7	26
	Frecuencia esperada	19,0	7,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>73,1 %</b>	<b>26,9 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 15, se observa que la inseminación artificial con semen fresco. El porcentaje fue de 76,9 % y con dilutor Triladyl fue de 69,2 %. al análisis estadístico con la prueba de chi-cuadrada, indica que no hay asociación estadística entre estos porcentaje ( $p \geq 0,05$ ), por lo que al diluir un eyaculado fresco con el dilutor comercial Triladyl y realizando una

inseminación artificial cervical a las 0 horas, no muestra diferencia significativa en comparación con semen fresco sin diluir.

**Tabla 16. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 0 y 24 horas**

		<b>PREÑADAS</b>	<b>VACIAS</b>	<b>Total</b>
<b>TRIS 0 H.</b>	Frecuencia Observada	7	6	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>53,8 %</b>	<b>46,2 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRIS 24 H.</b>	Frecuencia Observada	6	7	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>46,2 %</b>	<b>53,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TOTAL</b>	Frecuencia Observada	13	13	26
	Frecuencia esperada	13,0	13,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>50,0 %</b>	<b>50,0 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 16, señala que un eyaculado de semen fresco diluido en Tris-yema de huevo a las 0 horas, muestra un porcentaje de fertilidad de 53,8 % y con el mismo dilutor a las 24 horas de refrigeración, el porcentaje disminuyó a 46,2 %; sin embargo, al análisis estadístico con la prueba de chi-cuadrada, indica que no hay asociación estadística entre el porcentaje de fertilidad y la hora de inseminación con el dilutor Tris-yema de huevo ( $p \geq 0.05$ ), lo cual señala, que si queremos inseminar a las 0 ó 24 horas con

semen refrigerado diluido en Tris, no muestra diferencia significativa entre estos resultados.

**Tabla 17. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 0 y 48 horas**

		<b>PREÑADAS</b>	<b>VACIAS</b>	<b>Total</b>
<b>TRIS 0 H.</b>	Frecuencia Observada	7	6	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>53,8 %</b>	<b>46,2 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRIS 48 H.</b>	Frecuencia Observada	6	7	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>46,2 %</b>	<b>53,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TOTAL</b>	Frecuencia Observada	13	13	26
	Frecuencia esperada	13.0	13.0	26.0
	<b>% de FERT.</b>	<b>50.0 %</b>	<b>50.0 %</b>	<b>100.0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 17, revela que la fertilidad obtenida mediante inseminación artificial con semen diluido con Tris a las 0 horas, fue de 53,8 % y con la utilización del mismo dilutor a las 48 horas de refrigeración, muestra un porcentaje de 46,2 %; lo cual, al análisis estadístico con la prueba de chi-cuadrado, indica que no hay relación estadística entre estos dos porcentajes ( $p \geq 0,05$ ), por lo que el presente resultado, indica que al diluir un eyaculado fresco con el dilutor Tris de forma inmediata a las 0 horas y realizar la inseminación artificial, no muestra diferencia significativa en

comparación con el semen diluido y refrigerado para la inseminación a las 48 horas.

**Tabla 18. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 24 y 48 horas.**

		PREÑADAS	VACIAS	Total
<b>TRIS 24 H.</b>	Frecuencia Observada	6	7	13
	Frecuencia esperada	6,0	7,0	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>46,2 %</b>	<b>53,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRIS 48 H.</b>	Frecuencia Observada	6	7	13
	Frecuencia esperada	6,0	7,0	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>46,2 %</b>	<b>53,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TOTAL</b>	Frecuencia Observada	12	14	26
	Frecuencia esperada	12,0	14,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>46,2 %</b>	<b>53,8 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 18, se observa que el diagnóstico de fertilidad realizado mediante ecografía transrectal a los 40 días post inseminación artificial con semen refrigerado y diluido en Tris a las 24 horas, fue de 46,2 %; así mismo, empleando el mismo dilutor a las 48 horas tuvo, un porcentaje de preñes similar (46,2 %). Los porcentajes de fertilidad a las 24 y 48 horas de análisis estadístico con la prueba de chi-cuadrada, indica que no hay asociación estadística entre el porcentaje de fertilidad y los tratamientos ( $p \geq 0,05$ ), por lo que el presente resultado revela que al diluir un eyaculado

fresco con el dilutor Tris y realizando una inseminación artificial cervical a las 24 y 48 horas, no existe diferencia significativa entre estos porcentaje.

**Tabla 19. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Triladyl a las 0 y 24 horas**

		PREÑADAS	VACIAS	Total
TRILADYL 0 H.	Frecuencia Observada	9	4	13
	Frecuencia esperada	9,0	4,0	13,0
	<b>% de TRAT</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
TRILADYL 24 H.	Frecuencia Observada	9	4	13
	Frecuencia esperada	9,0	4,0	13,0
	<b>% de TRAT</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
TOTAL	Frecuencia Observada	18	8	26
	Frecuencia esperada	18,0	8,0	26,0
	<b>% de TRAT</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 19, se observa que a la inseminación artificial vía cervical en ovejas dohne merino realizada con semen diluido en Triladyl a las 0 horas, muestra un porcentaje de fertilidad de 69,2 %; de igual modo, al realizar la misma técnica a las 24 horas de refrigeración y diluido con el mismo dilutor comercial, fue de 69,2%, siendo similar la tasa de preñez; pero que al análisis estadístico con la prueba de chi-cuadrada, revela que no hay asociación estadística entre el porcentaje de fertilidad y los tratamientos ( $p \geq 0,05$ ); por lo tanto, el presente resultado nos indica que al

utilizar el dilutor comercial Triladyl a las 0 horas y 24 horas de refrigeración, no hay variabilidad estadística.

**Tabla 20. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Trildyl a las 0 y 48 horas**

		PREÑADAS	VACIAS	Total
TRILADYL 0 H.	Frecuencia Observada	9	4	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
TRILADYL 48 H.	Frecuencia Observada	4	9	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>30,8 %</b>	<b>69,2 %</b>	<b>100,0 %</b>
TOTAL	Frecuencia Observada	13	13	26
	Frecuencia esperada	13,0	13,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>50,0 %</b>	<b>50,0 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 20, muestra que el porcentaje de fertilidad realizando inseminación artificial vía cervical a las 0 horas y empleando dilutor comercial, fue de 69,2 % y con el mismo dilutor a las 48 horas de refrigeración la tasa de preñes, decrece a 30,8 %. Al análisis estadístico con la prueba de chi-cuadrada, indica que no hay relación estadística entre el porcentaje de fertilidad y los tratamientos ( $p \geq 0,05$ ), por lo que el presente resultado nos indica que al utilizar el dilutor comercial Triladyl en una inseminación artificial hecha a las 0 horas y 48 horas post-

refrigeración, no muestra diferencia significativa entre los porcentajes hallados.

**Tabla 21. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Triladyl a las 24 y 48 horas**

		PREÑADAS	VACIAS	Total
TRILADYL 24 H.	Frecuencia Observada	9	4	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
TRILADYL 48 H.	Recuento	4	9	13
	Frecuencia esperada	6,5	6,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>30,8 %</b>	<b>69,2 %</b>	<b>100,0 %</b>
TOTAL	Frecuencia Observada	13	13	26
	Frecuencia esperada	13,0	13,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>50,0 %</b>	<b>50,0 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 21, señala que a pesar de que los resultados de fertilidad muestren diferencia numérica a las 24 horas (69,2 %) y 48 horas de refrigeración seminal (30,8 %), al análisis estadístico mediante prueba chi-cuadrado, indica que no hay asociación estadística entre el porcentaje de fertilidad y los tratamientos ( $p \geq 0,05$ ); por lo que los resultados encontrados en el trabajo de investigación, revela que no hay diferencia estadística al emplear el dilutor comercial Triladyl en los dos tratamientos.

**Tabla 22. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 24 y Triladyl a las 24 horas**

		<b>PREÑADAS</b>	<b>VACIAS</b>	<b>Total</b>
<b>TRIS 24 H.</b>	Frecuencia Observada	6	7	13
	Frecuencia esperada	7,5	5,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>46,2 %</b>	<b>53,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRILADYL24 H.</b>	Frecuencia Observada	9	4	13
	Frecuencia esperada	7,5	5,5	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>Total</b>	Frecuencia Observada	15	11	26
	Frecuencia esperada	15,0	11,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>57,7 %</b>	<b>42,3 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 22, indica que el porcentaje de fertilidad usando los dilutores Tris y Triladyl a la misma hora de refrigeración para inseminar artificialmente vía cervical a ovejas dohne merino, muestra un porcentaje de 46,2 % con dilutor Tris y 69,2 % con dilutor Triladyl, los cuales llevados al análisis mediante chi-cuadrado, no muestra diferencias estadísticas entre estos dos porcentajes ( $p \geq 0,05$ ); esto quiere decir, que al inseminar con semen refrigerado de 24 horas diluido con Tris o Triladyl, los resultados no son reveladores estadísticamente.

**Tabla 23. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 48 y Triladyl a las 48 horas**

		<b>PREÑADAS</b>	<b>VACIAS</b>	<b>Total</b>
<b>TRIS 48 H.</b>	Frecuencia Observada	6	7	13
	Frecuencia esperada	5,0	8,0	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>46,2 %</b>	<b>53,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRILADYL 48 H.</b>	Frecuencia Observada	4	9	13
	Frecuencia esperada	5,0	8,0	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>30,8 %</b>	<b>69,2 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TOTAL</b>	Frecuencia Observada	10	16	26
	Frecuencia esperada	10,0	16,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>38,5 %</b>	<b>61,5 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 23 revela que los porcentajes de fertilidad a los 40 días post-inseminación artificial con semen diluido con Tris-yema de huevo y Triladyl a las 48 horas de refrigeración fue de 46,2 % y una merma con dilutor Triladyl a 30,8 %, donde estos resultados llevados al análisis de chi-cuadrado, no muestran una asociación estadística entre la tasa de preñes y los horarios de refrigeración ( $p \geq 0,05$ ), señalando, que al refrigerar semen combinados con estos dilutores en relación 1:2 (semen/dilutor), no se reporta diferencia estadística.

**Tabla 24. Diagnóstico de fertilidad con semen diluido en Tris a las 0 y Triladyl a las 0 horas**

		<b>PREÑADAS</b>	<b>VACIAS</b>	<b>Total</b>
<b>TRIS 0 H.</b>	Frecuencia Observada	7	6	13
	Frecuencia esperada	8,0	5,0	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>53,8 %</b>	<b>46,2 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TRILADYL 0 H</b>	Frecuencia Observada	9	4	13
	Frecuencia esperada	8,0	5,0	13,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>69,2 %</b>	<b>30,8 %</b>	<b>100,0 %</b>
<b>TOTAL</b>	Frecuencia Observada	16	10	26
	Frecuencia esperada	16,0	10,0	26,0
	<b>% de FERT.</b>	<b>61,5 %</b>	<b>38,5 %</b>	<b>100,0 %</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla 24. indica que los porcentajes obtenidos con el dilutor Tris-yema de huevo y el dilutor comercial Triladyl, realizando inseminación artificial inmediatamente después de la dilución en las muestras colectadas a las 0 horas, fue de 53,8 % y 69,2 % respectivamente. Estos porcentajes señalan que al análisis de chi-cuadrado mediante el programa estadístico, no tiene relación estadística entre el porcentaje de fertilidad y los tratamientos; por lo que no existe diferencia estadística entre estos porcentajes al inseminar artificialmente a las 0 horas usando dilutor Tris-yema de huevo y dilutor comercial Triladyl.

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

Los resultados de motilidad masal se obtuvieron por encima de 4 (escala 0-5) por lo que el semen indicaba que poseía buena característica seminal. A pesar de la naturaleza subjetiva de tales evaluaciones, el porcentaje de espermatozoides móviles se correlaciona positivamente con la fecundidad.

Según Hafez (2000), las bajas correlaciones entre motilidad espermática y fecundidad pueden deberse a la poca exactitud y precisión del método visual para evaluar dicha motilidad, fotoperiodo, época del año, mes en que se usa el semen y manejo del hato.

Los valores encontrados de volumen estuvieron dentro del rango que reporta), Hafez (2000). De igual modo, los valores de motilidad masal, pH, y de anomalías se mostraron normales y similares a los reportados por Gibbons y Cueto (2007).

Por lo tanto, al evaluar las características seminales a las 0 horas en lo que corresponde a MIP usando dilutor Tris y Triladyl, según los resultados

del trabajo de investigación, se obtuvo un porcentaje de 5,2 % y 5,4 % respectivamente (según escala 0 – 6). Resultados similares reporta Delgado, (2006) al evaluar la MIP con dilutor Triladyl en 3 carneros de raza Assaf con resultados de 5 %; sin embargo, Dinatolo (2011) y Morrier et al. (2002) obtuvieron resultados inferiores parecidos, usando el mismo dilutor 2,43 % y 3 % respectivamente. Esto, probablemente, se deba a que los animales poseían una edad mayor a 4 años por lo que la calidad seminal se ve afectada y por ende, su poder fecundante; tal afirmación es contrastada por Aisen (2009). También, en el caso de Dinatolo, posiblemente se deba a que la estacionalidad reproductiva de esta raza, que se encuentra de diciembre a julio, posee mejores efectos seminales en los meses de febrero, marzo y abril según Evans y Mawxell (1990), habiendo realizado Dinatolo su trabajo en mayo.

A mayor tiempo de refrigeración, existe un descenso gradual de la motilidad, evidenciándose una marcada disminución con el dilutor Triladyl a las 48 horas post-refrigeración. Asimismo, según Milczewsky *et al.*, (2000) confirma que la reducción, el aumento de la T<sup>o</sup> y la manipulación de semen, promueven una disminución en la motilidad y daños estructurales bioquímicos y funcionales en los espermatozoides. Tal afirmación queda confirmada en nuestro estudio, al comprobar que el porcentaje de MIP desciende a 3,70 % a las 24 horas y 2,80 % a las 48

horas de refrigeración. Tal descenso probablemente se atribuye al factor temperatura ya que el trabajo de investigación se realizó en los meses de friaje siendo la temperatura menor a 0 grados. Estos resultados difieren de los encontrados por Delgado (5 %), donde obtiene un porcentaje mayor a nuestro estudio a las 24 horas no existiendo marcada diferencia con su análisis inicial (0 horas). Asimismo, resultados en motilidad individual progresiva reportadas por Dinatolo también muestran porcentajes inferiores (2,25 %) a los reportados por Delgado a las 24 horas, y 1,5 % a las 48 horas. A su vez, los resultados hallados por Morrier y Col. son de 2,5 % a las 24 horas.

Para el caso de pH, los resultados de esta investigación se hallaron entre 6,90 para dilutor Tris y 6,85 con dilutor Triladyl, dentro de los rangos reportados por Aisen (2009), donde indica que los valores del pH del semen, pueden variar dependiendo si recién es eyaculado o ha sufrido almacenamiento,. En el carnero y en el macho cabrío, estos valores oscilan entre 6,2 y 7,3, llegando incluso a citarse como normal un pH de 7,5. Según Derivaux *et al.*, (1982) en el morueco, el pH normal es ácido 6,85; se hace alcalino en los individuos poco fecundo o estériles.

Por otro lado, los resultados de pH hallados a las 48 horas con el dilutor comercial Triladyl decae a un medio ácido a 5,05; esto

probablemente se deba a la acción del glicerol, el cual influye en la membrana espermática dañando su estructura, teniendo como consecuencia un descenso y acidificación del semen

Para el caso de integridad de membrana, se obtuvo un promedio de 72,80 % a las 0 horas de análisis seminal de las muestras colectadas con Triladyl, resultado similar al obtenido por Delgado (2006), que fue de 73,36 % con el mismo dilutor comercial trabajando con carneros raza Assaf. De igual modo, a las 24 horas de refrigeración, dicho autor obtuvo un porcentaje de 67,97 %, siendo mayor al reportado por este trabajo que fue 60,40 % y 37,80 % a las 48 horas encontrándose diferencias significativas entre los horarios. Según Palacios (1994) esto probablemente se deba a que el descenso de la temperatura por debajo de los 20°C, ocasiona que el espermatozoide presente cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, lo que puede afectar significativamente su sobrevivencia. Por otro lado, Fahy *et al.*, (1990) reporta que existe el consenso que, si bien el glicerol protege las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, también tiene cierto efecto tóxico sobre ellas.

Las alteraciones resultantes de este efecto tóxico pueden mermar la fecundidad del espermatozoide, pues aunque presenta motilidad tras la

refrigeración o descongelación y una adecuada producción de energía, podría estar afectada la capacidad de adhesión al ovocito Watson *et al.*, (1987).

Por otro lado, los resultados hallados con el dilutor Tris, 71,50 % (0 horas) y 60,80% (24 horas) son superiores a los reportados por Sarria *et al.*, (2007) en su trabajo con cabras Anglonubian con resultados de 65,6 % y 57,0 % a las 0 horas y 24 horas respectivamente. Asimismo, reporta resultados de 53,33 % a las 48 horas, siendo superiores a los halladas en esta investigación que fue de 50,78 %; esta diferencia probablemente se deba al factor climático de los meses de ejecución del proyecto de investigación.

En el caso de vitalidad espermática, se evidenció que los espermatozoides analizados a las 0, 24 y 48 horas con dilutor Tris, presentaron diferencias significativas con resultados de 64,25 %; 53,45 % y 45,84 %. Estos valores son inferiores a los reportados por Palomino *et al.*, (2007) en su trabajo con caprinos, donde hallaron una vitalidad seminal de 93,9 %, 85 % y 83,9 % a las 0, 24 y 48 horas con el mismo dilutor. Esto probablemente se deba al shock térmico ocasionado por las bajas temperaturas durante la ejecución del trabajo de investigación.

Caso diferente ocurre con el dilutor Triladyl, ya que los resultados hallados a las 48 horas muestran un claro descenso (37,23 %) respecto al dilutor Tris (45,84 %).

En este trabajo de investigación, se obtuvo resultados de 65,11% de vitalidad espermática con el dilutor Triladyl a las 0 horas. Estos resultados difieren con los hallados por Dinatolo (2011) (59,17 %) a la misma hora de análisis. Del mismo modo, el análisis realizado a las 48 horas de refrigeración, dio un resultado de 37,23 %, teniendo una caída significativa; asimismo, resultados inferiores encontrados por Dinatolo a la misma hora de refrigeración, fue de 31,67 %. Este descenso considerable, según Garner *et al.*, (1999), probablemente se deba a la toxicidad del glicerol, el cual afecta en distintos grados a las membranas del espermatozoide, donde parece que las membranas de las mitocondrias son más afectadas que las membranas acrosomales y plasmáticas, ocurriendo una disminución de la movilidad y su posterior muerte.

En lo que concierne a morfología espermática, se obtuvo resultados muy favorables sobre la normalidad de los espermios en el eyaculado, como son de 95,97 % y 94,56 % con los diluyentes Tris y Triladyl respectivamente. Según Da Silva (2014), normalmente el eyaculado

contiene de 5 a 10 % de espermatozoides anormales, más si el porcentaje de células anormales es mayor que 20-25 % produce una reducción de la fertilidad, tal afirmación es contrastada por Aisen (2009), donde indica que cada eyaculado contiene una proporción de espermatozoides anormales y que las muestras que contengan más del 15% de anormalidades no debe usarse en un programa de inseminación. Estas citas son comprobadas con nuestros resultados hallados con cada uno de los dilutores a las 0 horas de análisis, asimismo, dichas cifras disminuyen conforme aumenta el tiempo de refrigeración ocasionando daños morfológicos en los espermatozoides.

El porcentaje de espermatozoides anormales puede variar con la época del año, la temperatura ambiental, edad (pubertad), nutrición y cualquier factor estresante Da Silva (2014).

En cuanto a la fertilidad, la inseminación artificial fue realizada a 91 ovejas. Las 26 restantes no fueron inseminadas, ya que la mortalidad de los espermatozoides a las 24 y 48 horas fue total. Esta afirmación es comprobada por Gibbons y Cueto (2007), que menciona que el semen puede conservarse por periodos de 6-12 horas (semen enfriado) o 24 horas (semen refrigerado) decayendo el poder fecundante después de este horario.

En la experiencia, la eficiencia de preñez registrada en el grupo control con semen fresco sin diluir, fue de 76,9 %; siendo superior a la fertilidad hallada por Naim, (2004) con resultados de 58-65. A su vez, se evidenció que las condiciones generales de preñez de la majada no estuvieron afectadas por el estado nutricional o de manejo.

Asimismo, los resultados de fertilidad reportados en nuestra investigación con dilutor Tris a las 0 horas de análisis, fue de 53,8 %. Este valor es similar a los obtenidos por Menchaca *et al.*, (2005), el cual fue de 54,0 % a la misma hora. Esto probablemente se deba a la relación del número de espermatozoides al momento de la inseminación ya que Menchaca inseminó con una concentración de 200 millones y en esta experiencia fue de 250 millones de espermatozoides por dosis, del mismo modo, resultados inferiores reporta Olivera *et al.*, (2011) trabajando con 680 ovejas con resultados de 15 % a la misma hora de análisis. Este porcentaje probablemente sea tan bajo, ya que el número de muestra supera al nuestro; además, pudo ocurrir mortalidad embrionaria por factores climatológicos, ya que las precipitaciones fluviales ocurrieron durante el experimento. Tal afirmación es corroborada por Buratovich (2010), quien indica que las ovejas expuestas a la lluvia e hipotermia, antes y después del apareamiento, muestran disminución de la tasa ovulatoria y de fertilidad por estrés.

Al analizar la tasa de fertilidad con semen de 24 horas de refrigeración y empleando dilutor Tris, se halló resultados de 46,2 %. Estos resultados son superiores, difiriéndose con los reportados por Menchaca *et al.*, (2005), el cual obtuvo resultados de 34,5 % en 84 ovejas inseminadas (29/84), dicho porcentaje probablemente se deba a que en su investigación utilizó un número mayor de muestra a comparación del nuestro. Asimismo, resultados, también menores, mostró Oliver *et al.*, (2011) a 24 horas de inseminación con el mismo diluyente obteniendo 19 % de fertilidad. Este valor posiblemente se deba al tamaño de muestra inseminado en su investigación y también, al estrés por las condiciones climatológicas que acontecieron durante su experimento. A su vez, Evans y Maxwell (1990) mencionan que durante el proceso de refrigeración, la fertilidad parece disminuir entre 10 % a 35 % por día de almacenamiento, lo que también podría suscitar tales resultados. Por otro lado, Gonzáles (2011), trabajando con 54 alpacas huacaya, donde indujo a ovulación con utilización de ECG, obtuvo un porcentaje de fertilidad de 16.6% a las 24-26 horas explicado porque a partir de esta hora se inicia la ovulación y los espermatozoides tardan 6 horas en llegar al lugar de fertilización. Resultados que son explicados por los trabajos de seguimiento de las ondas foliculares en el ovario de los camélidos sudamericanos (Bravo *et al.*, 1990).

Por otro lado, la tasa de fertilidad con dilutor Tris diagnosticada a los 40 días post-inseminación con semen de 48 horas de refrigeración, muestra un porcentaje de 46,2 % en nuestra investigación. Este valor es semejante a la fertilidad obtenida con semen de 24 horas. Se puede desprender que sea posible tales valores a la yema de huevo, la cual estuvo fresca (menor a 3 días). Tal afirmación es ratificada por Moussa *et al.*, (2002), quien manifiesta que la yema de huevo, ejerce una acción protectora frente al shock térmico, ya que las lipoproteínas de baja densidad presentes en su composición, interactúan con la membrana plasmática de los espermatozoides protegiéndolos en el proceso de enfriamiento.

Asimismo, resultados hallados en este trabajo de investigación con el dilutor comercial Triladyl a las 0 y 24 horas, fue de 69,2 % en los dos casos, resultados similares reporta Martínez *et al.*, (1990), inseminando intrauterinamente 100 cabras criollas con resultados de 67,5 % a las 24 horas. Según la técnica de inseminación, resultados más favorables y con mayores porcentajes, se obtiene por medio de la inseminación artificial intrauterina, pero los valores semejantes probablemente se deba a la concentración que se usó por dosis de inseminación, ya que en nuestro estudio se inseminó con  $250 \times 10^6$ , mientras que el de Martínez y Col., inseminaron con  $100 \times 10^6$ . De igual modo, en este trabajo los resultados

de fertilidad reportados a las 48 horas tienen una disminución significativa a comparación de los horarios de 0 y 24 horas. Esta merma tan importante, posiblemente se deba al factor glicerol por parte del dilutor Triladyl, ya que como se dijo en los análisis de características seminales, produce una intoxicación en la membrana plasmática dañando la estructura del espermatozoide y su motilidad, produciendo su muerte.

Estas diferencias halladas en nuestra experiencia sobre la tasa de preñez entre el dilutor Tris y dilutor Triladyl es 46,2 % y 69,2 % inseminando artificialmente a las 0 y 24 horas, probablemente se atribuye a la preparación mecánica del dilutor Tris. Se tiene que tener presente el error humano al pesar los distintos ingredientes en una balanza digital, por lo que merma la fertilidad, asimismo, el huevo a utilizar tiene que ser fresco y menor a 3 días, caso contrario, los fosfolípidos se degradan conforme se prolonga el tiempo de almacenamiento. También el glicerol del dilutor Triladyl le confiere a los espermatozoides una capa protectora hasta las 24 horas como se demostró en el estudio, pero decae drásticamente intoxicando la membrana de la célula después de dicho horario. Así pues, se ve reflejado los resultados obtenidos, teniendo en cuenta estos factores desde la dilución de semen, hasta la inseminación artificial propiamente dicha.

En la literatura revisada, solo se encontró pocos trabajos sobre tasa de fertilidad con dilutor Tris para inseminación artificial con semen refrigerado en diferentes horarios, mas no con dilutor Triladyl, que es empleado para la congelación de semen. Asimismo, los trabajos bibliográficos investigados para las características seminales, no contaban con la totalidad de los parámetros evaluados en el presente trabajo de investigación, por lo que se tomó las características espermáticas más importantes según los trabajos recopilados.

## **CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS**

- **Prueba estadística**
  - Tukey
- **Fórmula estadística**

$$w = q \times \sqrt{\frac{CME}{r}}$$

### ➤ **Para hipótesis 1**

Se acepta la hipótesis alterna  $H_a$ : “El tiempo de refrigeración del semen, influye en el porcentaje de fertilidad mediante la I.A. en ovejas Dohne merino”. Es decir, que la fertilidad se ve influenciada

por la inseminación artificial con semen preservado a 24 y 48 horas de refrigeración. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis alterna.

➤ **Para hipótesis 2**

Se acepta la hipótesis nula  $H_0$ : “Los diluyentes Tris y Triladyl tienen diferentes efectos sobre las características seminales a 24 y 48 horas de refrigeración”. Es decir, que las características seminales se ven afectadas a 24 y 48 horas de refrigeración. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis alterna.

## **CONCLUSIONES**

1. El dilutor y tiempo de refrigeración influyen en el porcentaje de fertilidad en ovejas Dohne merino.
2. Los dilutores Tris y Triladyl tienen diferentes efectos sobre las características seminales a 24 y 48 horas de preservación.
3. La utilización del semen hasta las 48 horas de refrigeración con dilutor Tris, tiene buenos índices de fertilidad.

## **RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda realizar más trabajos de investigación con dilutor Triladyl, utilizando un mayor número de muestra.
2. Se sugiere realizar trabajos a 15°C de preservación y comparar los resultados, a fin de obtener referencias sobre tasa de fertilidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aisen, E. (2004). Reproducción ovina y caprina.
- Aisen, E. (2009). Reproduccion ovina y caprina. Exploración clínica.
- Ascue, R. (2005). Espermatoograma en carneros reproductores de diferentes edades en la zona altoandina - Pasco, Perú (Tesis de Licenciatura). Facultad de Biología. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Pasco, Perú.
- Bidinost, F. y Gibbons, A. (1999). Ecografía para el diagnostico de preñez en ovinos y caprinos.
- Bravo, W., Folwer, M., Stabenfeldt, Lasley, B. (1990). Ovarian Follicular dynamics in the llama. Biol. Reprod 43: 579 - 585.
- Brinsko, S., Varner, D. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice, 8(1), 205–218.
- Buratovich, O. (2010). Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que la afectan, 163–166.
- Cannavaro, A. (2011). Manual práctico para profesionales – Biotecnología reproductiva – Inseminación artificial porcina.

CONCYTEC. (2007). CIT ILLPA ESTACIÓN EXPERIMENTAL ILLPA - PUNO, 12.

Cortez - Gallego S. (1997). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Complutense. Madrid, España.

Cueto, M. y Gibbons, A. (2011). Inseminación artificial cervical en ovejas, 10–14.

Da Silva Maia, M. (2014). Tecnología de semen e inseminación artificial em caprinos. Acta Veterinaria Brasilica, 8(SUPPL. 2), 389–395.

Daza, A. (1997). Reproducción y sistemas de explotación del ganado ovino. Mundi-prensa. Madrid, pp. 137-155.

Delgado, B. (2006). Evaluación espermática de semen ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad. Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Ricardo Palma.

Del Campo, D. (1993). Anatomía, Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Hemisferio Sur. Uruguay, pp. 125-138.

Derivaux, J. (1982). Reproducción de los animales domésticos. ACRIBIA EDITORIAL.

Dinatolo, E. (2011). Efecto de la trehalosa en la viabilidad de semen ovino

refrigerado.

Evans, G. y Maxwell, W. (1990). Inseminación artificial en ovejas y cabras.

Editorial Acribia. Zaragoza, España, pp. 109 - 123.

Fahy, G., Lilley, T., Linsdell, H., Meryman, H. (1990). Cryoprotectant

toxicity and cryoprotectant toxicity reduction. In search of molecular mechanisms. *Cryobiology* pag. 268 - 274.

Galina, C. y Valencia, J. (2007). Reproducción de Animales Domésticos.

Garner, D., Thomas, C., Gravence, C. (1999). The effect of glicerol on the

viability, mitocontrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* Pag. 399 - 404.

Gibbons, A., y Cueto, M. (2007). Inseminación artificial con semen fresco,

(inseminacion artificial con semen fresco en ovinos).

Gibbons, A., Cueto, M., y García, J. (2007). Obtención, procesamiento y

conservacion del semen ovino. *A*, 1-14.

Guzmán, G. (2004). Factores que afectan la fertilidad en ovejas

inseminadas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de México, pag. 35 - 41.

Hafez, ESE. (2000). Reproducción e Inseminación artificial de animales.

1º Edición. México. Interamericana - McGraw Hill.

INTA, A. A. C. D. M.-. (2003). Criadores de merino, (Asociación argentina Criadores de merino - INTA).

Laboratorios Minitube (1993). Manual de uso y preparación del diluyente Triladyl.

INTA (2003). Manual del Dohne merino.

Martínez, R., Hernández, J., & Hernández, H. (1990). Inseminación artificial en cabras criollas con semen refrigerado.

Menchaca, A., Pinczak, A., & Queirolo, D. (2005). Storage of ram semen at 5 ° C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes, (November).

Mellisho, E. (2007). Primera edición. Manual de inseminación artificial en ganado ovino. Pag. 23 - 25.

Milsewsky, V., Kozicki, L., Neves, J. (2000). Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas, utilizando semen refrigerado. Archives of Veterinary Science, v.5, p. 35 - 39.

MINAGRI. (2013). Cadena Productiva de Ovinos, 0 - 53.

Morrier, A., Castonguay, F., y Bailey, J. (2002). Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa, 347–356.

Moussa, M., Marinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., Anton, M. (2002).

Low density lipoproteins extracted from egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen thawed bull semen.

Gonzales, M., Huanca, T., Cárdenas, M. (2011). Evaluación de fertilidad en alpacas inseminadas con semen refrigerado en diferentes periodos de tiempo, post inducción de ovulación.

Naim, P., Cueto, M., y Gibbons, A. (2004). Inseminación Artificial a Tiempo Fijo ( IATF );, 277(8400), 1–4.

Nunes, J., y Pérez, F. (2001). Biotécnicas de la Reproducción caprina y ovina. Editorial Fortaleza. Brazil, pp. 18 - 43.

Olivera, J., Gil, A., Gamarra, J., y Fierro, S. (2011). “ Preservación seminal y su uso en programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en Ovinos .”

Palacios, A. (1994). Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento del semen. Veterinaria México. Pag. 201 - 210.

Palomino, J., Cervantes, M., Cisneros, F., y Huanca, W. (2007). Efecto de dos dilutores y tiempos de refrigeración sobre la motilidad individual de semen refrigerado de caprinos, 2006–2008.

Paulens y Col. (2002). Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ramn semen.

Theriogenology, v. 57. Pag. 823 - 836.

Pereyra, F., Gibbons, A., Cueto, M., Sipowicz, P., Fernández, R., y Salamone, D. (2011). Efficiency of Sperm-Mediated Gene Transfer in the Ovine by Laparoscopic Insemination , In Vitro Fertilization and ICSI, 57(2).

Robles, C. (2004). Salud reproductiva del carnero (Vol. 277).

Rubianes, E. (2000). Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo, 93–103.

Sarria, J., Amalia, G., y Irma, C. (2007). Evaluacion de tres dilutores y tiempos de refrigeracion en semen de machos cabrios. Anales Cientificos. Universidad Nacional Agraria La Molina, 68(1), 88–95.  
Retrieved from [http://tumi.lamolina.edu.pe/resumen/anales/enero\\_marzo\\_2000.pdf](http://tumi.lamolina.edu.pe/resumen/anales/enero_marzo_2000.pdf)

Sepúlveda, N. (2012). Inseminación artificial en ovinos.

Universidad Nacional del Altiplano - Puno, (2011). Manual de Inseminación Artificial en Ovinos.

Watson P. 1979. The preservation of semen in mammals. In:Finn C.A. Oxford reviews of reproductive biology. UK, Oxford University.

## **ANEXOS**

**Anexo 1. Análisis de varianza para motilidad masal usando dilutor Tris**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	18,65000000	9,32500000	13,30	<,0001
HORA	2	18,65000000	9,32500000	13,30	<,0001
Error	27	18,92500000	0,70092593		
Corrected Total	29	37,57500000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MM Mean
0,496341	26,57820	0,837213	3,150000

**Anexo 2. Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad masal usando dilutor Tris**

Alpha 0,05  
 Error Degrees of Freedom 27  
 Error Mean Square 0,700926  
 Critical Value of Studentized Range 3,50643  
 Minimum Significant Difference 0,9283  
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	4,2000	10	0
B	2,9500	10	24
B	2,3000	10	48

**Anexo 3. Análisis de varianza para motilidad masal usando dilutor Triladyl**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	28,11666667	14,05833333	57,95	<,0001
HORA	2	28,11666667	14,05833333	57,95	<,0001
Error	27	6,55000000	0,24259259		
Corrected Total	29	34,66666667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MM Mean
0,811058	14,77611	0,492537	3,333333

**Anexo 4. Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad masal usando dilutor Triladyl**

Alpha 0,05  
 Error Degrees of Freedom 27  
 Error Mean Square 0,242593  
 Critical Value of Studentized Range 3,50643  
 Minimum Significant Difference 0,5461  
 Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	4,6500	10	0
B	3,0000	10	24
C	2,3500	10	48

**Anexo 5. Análisis de varianza para motilidad individual progresiva usando dilutor Tris**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	35,61666667	17,80833333	18,69	<,0001
HORA	2	35,61666667	17,80833333	18,69	<,0001
Error	27	25,72500000	0,95277778		
Corrected Total	29	61,34166667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MIP Mean
0,580628	25,80009	0,976103	3,783333

**Anexo 6. Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad individual progresiva usando dilutor Tris**

Alpha 0,05  
Error Degrees of Freedom 27  
Error Mean Square 0,952778  
Critical Value of Studentized Range 3,50643  
Minimum Significant Difference 1,0823

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	5,2000	10	0
B	3,6000	10	24
B	2,5500	10	48

**Anexo 7. Análisis de varianza para motilidad individual progresiva usando dilutor Triladyl**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	34,86666667	17,43333333	71,32	<,0001
HORA	2	34,86666667	17,43333333	71,32	<,0001
Error	27	6,60000000	0,24444444		
Corrected Total	29	41,46666667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MIP Mean
0,840836	12,46420	0,494413	3,966667

**Anexo 8. Prueba de comparación múltiple de Tukey para motilidad individual progresiva usando dilutor Triladyl**

Alpha 0,05  
Error Degrees of Freedom 27  
Error Mean Square 0,244444  
Critical Value of Studentized Range 3,50643  
Minimum Significant Difference 0,5482

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	5,4000	10	0
B	3,7000	10	24
C	2,8000	10	48

**Anexo 9. Análisis de varianza para Test Hiposmótico con dilutor Tris**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	2039,172031	1019,586015	34,26	<,0001
HORA	2	2039,172031	1019,586015	34,26	<,0001
Error	26	773,655556	29,755983		
Corrected Total	28	2812,827586			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	HOST Mean
0,724955	8,887204	5,454904	61,37931

**Anexo 10. Prueba de comparación múltiple de Tukey para Test Hiposmótico usando dilutor Tris**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	26
Error Mean Square	29,75598
Critical Value of Studentized Range	3,51417
Minimum Significant Difference	6,1732

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	71,500	10	0
B	60,800	10	24
C	50,778	9	48

**Anexo 11. Análisis de varianza para Test Hiposmótico usando dilutor Triladyl**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	6298,400000	3149,200000	46,99	<,0001
HORA	2	6298,400000	3149,200000	46,99	<,0001
Error	27	1809,600000	67,022222		
Corrected Total	29	8108,000000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	HOST Mean
0,776813	14,36265	8,186710	57,00000

**Anexo 12. Prueba de comparación múltiple de Tukey para Test Hiposmótico usando dilutor Triladyl**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	27
Error Mean Square	67,02222
Critical Value of Studentized Range	3,50643
Minimum Significant Difference	9,0777

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	72,800	10	0
B	60,400	10	24
C	37,800	10	48

**Anexo 13. Análisis de varianza para porcentaje de vitalidad espermática con dilutor Tris**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	1634,497847	817,248923	40,57	<,0001
HORA	2	1634,497847	817,248923	40,57	<,0001
Error	26	523,790222	20,145778		
Corrected Total	28	2158,288069			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VIT Mean
0,757312	8,188871	4,488405	54,81103

**Anexo 14. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de vitalidad espermática usando dilutor Tris**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	26
Error Mean Square	20,14578
Critical Value of Studentized Range	3,51417
Minimum Significant Difference	5,0794

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	64,250	10	0
B	53,450	10	24
C	45,836	9	48

**Anexo 15. Análisis de varianza para porcentaje de vitalidad espermática con dilutor Triladyl**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	4076,559327	2038,279663	121,12	<,0001
HORA	2	4076,559327	2038,279663	121,12	<,0001
Error	27	454,364770	16,828325		
Corrected Total	29	4530,924097			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	VIT Mean
0,899719	7,747324	4,102234	52,95033

**Anexo 16. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de vitalidad espermática usando dilutor Triladyl**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	27
Error Mean Square	16,82832
Critical Value of Studentized Range	3,50643
Minimum Significant Difference	4,5487

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	65,105	10	0
B	56,518	10	24
C	37,228	10	48

**Anexo 17. Análisis de varianza para porcentaje de espermatozoides normales con dilutor Tris**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	217,2656863	108,6328431	24,84	<,0001
HORA	2	217,2656863	108,6328431	24,84	<,0001
Error	22	96,1998097	4,3727186		
Corrected Total	24	313,4654960			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NORM Mean
0,693109	2,273424	2,091105	91,98040

**Anexo 18. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de espermatozoides normales usando dilutor Tris**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	4.372719
Critical Value of Studentized Range	3.55259
Minimum Significant Difference	2.5774

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	95,970	8	0
B	91,356	9	24
C	88,694	8	48

**Anexo 19. Análisis de varianza para porcentaje de espermatozoides normales con dilutor Trilady1**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	327,1884467	163,5942233	18,73	<,0001
HORA	2	327,1884467	163,5942233	18,73	<,0001
Error	27	235,8633400	8,7356793		
Corrected Total	29	563,0517867			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NORM Mean
0,581098	3,254274	2,955618	90,82267

**Anexo 20. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de espermatozoides normales usando dilutor Trilady1**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	27
Error Mean Square	8,735679
Critical Value of Studentized Range	3,50643
Minimum Significant Difference	3,2773

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	94,564	10	0
A	91,373	10	24
B	86,531	10	48

**Anexo 21. Análisis de varianza para porcentaje de cabezas anormales con dilutor Tris**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0,26945000	0,13472500	0,34	0,7124
HORA	2	0,26945000	0,13472500	0,34	0,7124
Error	22	8,60575000	0,39117045		
Corrected Total	24	8,87520000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CA Mean
0,030360	256,3263	0,625436	0,244000

**Anexo 22. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de cabezas anormales usando dilutor Tris**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	0,39117
Critical Value of Studentized Range	3,55259
Minimum Significant Difference	0,7709

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	0,3825	8	48
A	0,2267	9	24
A	0,1250	8	0

**Anexo 23. Análisis de varianza para porcentaje de cabezas anormales con dilutor Triladyl**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	1,95134000	0,97567000	0,42	0,6628
HORA	2	1,95134000	0,97567000	0,42	0,6628
Error	27	63,07089000	2,33595889		
Corrected Total	29	65,02223000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CA Mean
0,030010	357,9355	1,528384	0,427000

**Anexo 24. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de cabezas anormales usando dilutor Triladyl**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	27
Error Mean Square	2,335959
Critical Value of Studentized Range	3,50643
Minimum Significant Difference	1,6947

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	0,7840	10	24
A	0,2930	10	0
A	0,2040	10	48

**Anexo 25. Análisis de varianza para porcentaje de colas anormales con dilutor Tris**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	202,7103229	101,3551615	24,00	<,0001
HORA	2	202,7103229	101,3551615	24,00	<,0001
Error	22	92,9034931	4,2228860		
Corrected Total	24	295,6138160			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CO Mean
0,685727	26,42839	2,054966	7,775600

**Anexo 26. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de colas anormales usando dilutor Tris**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	4,222886
Critical Value of Studentized Range	3,55259
Minimum Significant Difference	2,5329

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	10,923	8	48
A	8,418	9	24
B	3,906	8	0

**Anexo 27. Análisis de varianza para porcentaje de colas anormales con dilutor Triladyl**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	342,1832267	171,0916133	16,09	<,0001
HORA	2	342,1832267	171,0916133	16,09	<,0001
Error	27	287,0536700	10,6316174		
Corrected Total	29	629,2368967			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	CO Mean
0,543807	37,26276	3,260616	8,750333

**Anexo 28. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de colas anormales usando dilutor Triladyl**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	27
Error Mean Square	10,63162
Critical Value of Studentized Range	3,50643
Minimum Significant Difference	3,6155

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	13,265	10	48
B	7,843	10	24
B	5,143	10	0

**Anexo 29. Análisis de varianza para porcentaje PH con dilutor TriS**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	2,95162835	1,47581418	4,51	0,0209
HORA	2	2,95162835	1,47581418	4,51	0,0209
Error	26	8,51388889	0,32745726		
Corrected Total	29	6,9.2368967			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PH Mean
0,257435	8,757217	0,572239	6,534483

**Anexo 30. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de PH usando dilutor Tris Alpha**

Alpha	0,05
Error Degrees of Freedom	26
Error Mean Square	0,327457
Critical Value of Studentized Range	3,51417
Minimum Significant Difference	0,6476

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	6,9000	10	0
B	6,5500	10	24
B	6,1111	9	48

**Anexo 31. Análisis de varianza para porcentaje de PH con dilutor Triladyl**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	16,26666667	8,13333333	31,48	<,0001
HORA	2	16,26666667	8,13333333	31,48	<,0001
Error	27	6,97500000	0,25833333		
Corrected Total	29	23,24166667			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	PH Mean
0,699892	8,494680	0,508265	5,983333

**Anexo 32. Prueba de comparación múltiple de Tukey para porcentaje de PH usando dilutor Triladyl**

Alpha	005
Error Degrees of Freedom	27
Error Mean Square	0258333
Critical Value of Studentized Range	3,50643
Minimum Significant Difference	0,5636

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey	Mean	N	HORA
A	6,8500	10	0
B	6,0500	10	24
C	5,0500	10	48

**ANEXO 33. SOBRE RESULTADOS DE FERTILIDAD, INSEMINACIÓN CON SEMEN DE 0, 24 Y 48 HORAS**

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA COMPARAR FERTILIDAD DE DILUTOR TRIS A LAS 0 H.\_CON TRIS A LAS 24 H.**

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,434 <sup>b</sup>	1	0,510		
Corrección por continuidad	0,057	1	0,812		
Razón de verosimilitud	0,436	1	0,509		
Estadístico exacto de Fisher				0,680	0,407
N de casos válidos	23				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,78.

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA COMPARAR FERTILIDAD DE DILUTOR TRIS A LAS 0 H. CON TRIS A LAS 48 H.**

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,040 <sup>b</sup>	1	0,842		
Corrección por continuidad	0,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	0,040	1	0,842		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	0,573
N de casos válidos	27				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 6,26.

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA COMPARAR FERTILIDAD DE DILUTOR TRIS A LAS 24 H. Y TRIS A LAS 48 H.**

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,235 <sup>b</sup>	1	0,628		
Corrección por continuidad	0,005	1	0,945		
Razón de verosimilitud	0,236	1	0,627		
Estadístico exacto de Fisher				0,697	0,473
N de casos válidos	24				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 1 casillas (25,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 4,58.

Viene página anterior

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA COMPARAR FERTILIDAD CON DILUTOR COMERCIAL TRILADYL A LAS 0 H. CON TRILADYL A LAS 24 H.**

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,195 <sup>b</sup>	1	0,658		
Corrección por continuidad	0,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	0,196	1	0,658		
Estadístico exacto de Fisher				1,000	0,500
N de casos válidos	26				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 2 casillas (50,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 3,50.

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA COMPARAR FERTILIDAD CON DILUTOR COMERCIAL TRILADYL A LAS 0 H. CON TRILADYL A LAS 48 H.**

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	4,891 <sup>b</sup>	1	0,027		
Corrección por continuidad	3,279	1	0,070		
Razón de verosimilitud	5,073	1	0,024		
Estadístico exacto de Fisher				0,047	0,034
N de casos válidos	25				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5,76.

**PRUEBA DE CHI-CUADRADO PARA COMPARAR FERTILIDAD DE DILUTOR COMERCIAL TRILADYL A LAS 24 H. CON TRILADYL A LAS 48 H.**

**Pruebas de chi-cuadrado**

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	6,740 <sup>b</sup>	1	0,009		
Corrección por continuidad	4,820	1	0,028		
Razón de verosimilitud	7,076	1	0,008		
Estadístico exacto de Fisher				0,017	0,013
N de casos válidos	25				

a. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

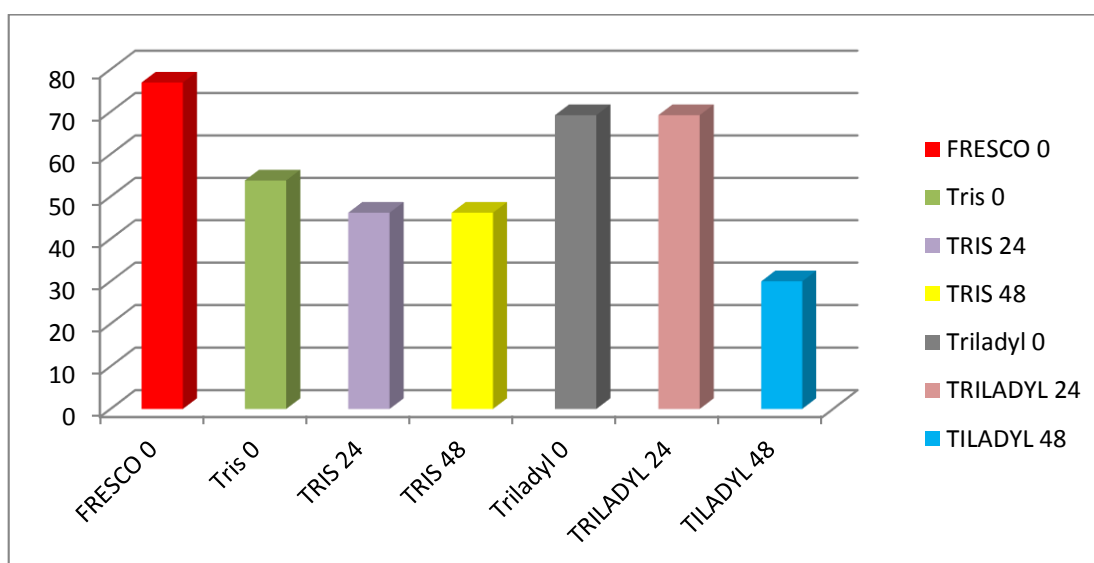
b. 0 casillas (,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 5,76.

## ANEXO 34. SOBRE RESUMEN DE RESULTADOS DE FERTILIDAD

Fertilidad en ovejas Dohne merino inseminadas con semen fresco y semen refrigerado diluido en Tris o Triladyl

Dilutor	T° refrigeración	N	Fertilidad %
<b>Fresco</b>	0	13	76,9(10/13)
<b>Tris</b>	0	13	53,8 (7/13)
	24	13	46,2 (6/13)
	48	13	46,2 (6/13)
<b>Triladyl</b>	0	13	69,2 (9/13)
	24	13	69,2 (9/13)
	48	13	30,8 (4/13)

Fuente: Elaboración propia en base a registros colectados



### Fertilidad por inseminación artificial con semen de 0, 24 y 48 horas

Fuente: Elaboración propia en base a registros colectados





## ANEXO 36. REGISTRO DE OVEJAS INSEMINADAS ARTIFICIALMENTE

E.E.A. – ILLPA – INIA – AREA DE REPRODUCCIÓN ANIMAL – OVINOS

Nº	ARETE	DILUTOR/HORA	SEMEN MACHO	RELAC. S/D	DIAGNOSTICO DE PREÑEZ
1	3681110	TL0	4	1/2	P
2	3231109	TL0	4	1/2	V
3	2961109	TL0	4	1/2	P
4	3641110	TL0	4	1/2	P
5	1541105	TL0	4	1/2	P
6	2741108	TL0	4	1/2	V
7	5071112	TL0	4	1/2	P
8	3451110	TL0	4	1/2	P
9	4061111	TL0	4	1/2	P
10	5201112	TL0	4	1/2	V
11	4241111	TL0	4	1/2	V
12	C2010	TL0	4	1/2	P
13	4451110	TL0	4	1/2	P
14	4321111	TL24	4	1/2	V
15	5121112	TL24	4	1/2	P
16	6011013	TL24	4	1/2	P
17	2011113	TL24	4	1/2	P
18	1971113	TL24	4	1/2	V
19	4871113	TL24	4	1/2	P
20	2561108	TL24	4	1/2	P
21	4730512	TL24	4	1/2	V
22	C 23-10	TL24	4	1/2	P
23	1651111	TL24	4	1/2	P
24	2221112	TL24	4	1/2	P
25	3651110	TL24	4	1/2	V
26	3761110	TL24	4	1/2	P
27	5441112	TL48	4	1/2	V
28	1881206	TL48	4	1/2	V
29	1521112	TL48	4	1/2	V
30	5461112	TL48	4	1/2	V
31	3741110	TL48	4	1/2	V
32	3401209	TL48	4	1/2	P
33	4781109	TL48	4	1/2	V
34	1231112	TL48	4	1/2	P
35	EEA213	TL48	4	1/2	V
36	1921013	TL48	4	1/2	V
37	1651111	TL48	4	1/2	P
38	5891013	TL48	4	1/2	V
39	1821112	TL48	4	1/2	P
40	1771112	T0	4	1/2	P
41	3751110	T0	4	1/2	V
42	5731013	T0	4	1/2	V
43	2511108	T0	4	1/2	P
44	3011109	T0	4	1/2	V
45	2370608	T0	4	1/2	V
46	4231111	T0	4	1/2	P

Continúa página siguiente

Viene página anterior

47	4181111	T0	4	1/2	P
48	4191111	T0	4	1/2	P
49	3151109	T0	4	1/2	P
50	3621111	T0	4	1/2	V
51	3281109	T0	4	1/2	P
52	6311213	T0	4	1/2	V
53	4640112	T24	4	1/2	P
54	6201113	T24	4	1/2	V
55	4181111	T24	4	1/2	P
56	3011109	T24	4	1/2	V
57	2741108	T24	4	1/2	P
58	3231109	T24	4	1/2	V
59	5231112	T24	4	1/2	V
60	4321111	T24	4	1/2	V
61	3071112	T24	4	1/2	P
62	4191111	T24	4	1/2	V
63	3051109	T24	4	1/2	P
64	2851009	T24	4	1/2	V
65	5921013	T24	4	1/2	P
66	2951109	T48	4	1/2	P
67	2860109	T48	4	1/2	P
68	1661211	T48	4	1/2	V
69	6091113	T48	4	1/2	V
70	5091112	T48	4	1/2	V
71	5691013	T48	4	1/2	V
72	S/A	T48	4	1/2	P
73	2851009	T48	4	1/2	V
74	3091109	T48	4	1/2	V
75	C710	T48	4	1/2	P
76	S/A	T48	4	1/2	P
77	5001112	T48	4	1/2	V
78	5411112	T48	4	1/2	P
79	5131112	F0	4	1/2	V
80	5381112	F0	4	1/2	P
81	3051109	F0	4	1/2	P
82	5211112	F0	4	1/2	P
83	3821110	F0	4	1/2	P
84	3961210	F0	4	1/2	P
85	4361111	F0	4	1/2	P
86	3091109	F0	4	1/2	V
87	1121010	F0	4	1/2	P
88	3221110	F0	4	1/2	P
89	2710512	F0	4	1/2	P
90	3651009	F0	4	1/2	V
91	5431211	F0	4	1/2	P