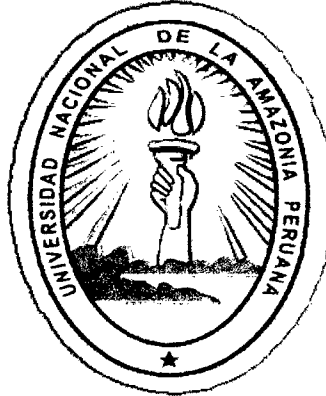


36.0824

19

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA
FACULTAD DE ZOOTECNIA**

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS BÁSICAS Y PECUARIAS



**“EFECTO DE DOS DILUTORES SOBRE LA MOTILIDAD Y
EL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN EL
SEMEN CONGELADO DE OVINO (*Ovis aries*)”**

TESIS



**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO ZOOTECNISTA**

PRESENTADA POR LA BACHILLER

NIEVES CRISTINA SÁNCHEZ CHÁVEZ

YURIMAGUAS - PERÚ

2009

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE ZOOTECNIA

"EFECTO DE DOS DILUTORES SOBRE LA MOTILIDAD Y EL PORCENTAJE
DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN EL SEMEN CONGELADO DE OVINO
(Ovis aries)"

Tesis para optar el título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

NIEVES CRISTINA SÁNCHEZ CHÁVEZ

Asesorado por:

Ing° Calos Alegría Ruíz

Tesis aprobada en sustentación pública el día 09 de
Setiembre de 2009 por el Jurado Calificador designado por
el Director de Escuela de Formación Profesional integrado
por:



Blga. Esther RUIZ REÁTEGUI
Presidente



M.V. Orlando IBERICO VELA
Miembro



Ing° María Elena DÍAZ PABLÓ
Miembro

DEDICATORIA

A mi mamita Maritza por su apoyo constante, por darme todo lo que ha estado a su alcance y a mi hermana Cecilia por su cariño y preocupación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana - Facultad de Zootecnia, por acogerme en sus aulas durante mi formación profesional.

Al Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria - La Molina, institución que apoyó en la realización de la presente investigación.

Al Ing° MSc. Carlos Alegría Ruiz, por asesorar la tesis y brindar apoyo permanente en su ejecución.

Al Ing° MSc. Próspero Cabrera Villanueva, Jefe del Banco Nacional de Semen, por su constante apoyo y ser el coasesor en este trabajo de investigación.

Al Programa de Investigación y Proyección Social en Ovinos y Camélidos Americanos de la Universidad Nacional Agraria - La Molina, a través de la Unidad Experimental de Ovinos Rigoberto Calle - "Rigoranch", por facilitar los carneros del plantel.

Al Ing° MSc. Jorge Calderón por su apoyo en el análisis estadístico de mi tesis.

A Hugo, mi amigo, quien me apoyó en la elaboración del proyecto de tesis y resolución de muchas interrogantes.

Al Ing° MSc. César Pantoja, por su asistencia en la parte experimental y estadística del trabajo y paciencia en la dilución y procesos necesarios de la investigación.

A Max Ávila, por la amistad, paciencia y los conocimientos transmitidos durante mi estadía en el Banco Nacional de Semen y a los técnicos José, Oscar, John, Carlos, Albino; por su apoyo en el manejo de los carneros.

A Erika, mi amiga y compañera de tesis, porque juntas lo lograremos.

A los miembros del Jurado de Tesis, que me motivaron y ayudaron en la corrección del proyecto de tesis.

A Alfonso del Águila, por soportar mis nervios y mal humor en la recta final de este trabajo.

ÍNDICE

CAPÍTULOS			Pág.
CAPÍTULO	I.	INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO	II.	REVISIÓN DE LITERATURA	19
CAPÍTULO	III.	MATERIALES Y MÉTODOS	46
CAPÍTULO	IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
CAPÍTULO	V.	CONCLUSIONES	72
CAPÍTULO	VI.	RECOMENDACIONES	74
CAPÍTULO	VII.	BIBLIOGRAFÍA	75
CAPÍTULO	VIII.	ANEXOS	82

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración del semen del carnero y del macho cabrío valorado por su consistencia.	22
Cuadro 2. Componentes de dilutores en semen fresco, para uso en inseminación artificial, vaginal o cervical.	34
Cuadro 3. Componentes de dilutores en semen refrigerado, para uso en inseminación artificial cervical o vaginal.	35
Cuadro 4. Composición química del dilutor Tris.	36
Cuadro 5. Composición y aporte nutricional del concentrado.	49
Cuadro 6. Composición del dilutor Tris usado en la investigación.	58

Cuadro 7. Promedio de volumen, pH, motilidad masal, concentración, espermatozoides vivos, anormales y motilidad individual progresiva del semen puro por raza.	61
Cuadro 8. Porcentaje de motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por dilutor y raza.	66
Cuadro 9. Porcentaje de motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por dilutor y raza.	69
Cuadro 10. Porcentaje de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por dilutor y raza.	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de preparación del dilutor Tris.	53
Figura 2. Técnica de preparación del dilutor Ovino Freezing.	54
Figura 3. Proceso de congelación del semen de ovino ovino.	57
Figura 4. pH y motilidad masal del semen por raza.	63
Figura 5. Concentración del semen por raza (N° de espermatozoides x 10 ⁶ /ml).	64
Figura 6. Espermatozoides vivos, anormales y motilidad individual progresiva del semen puro por raza.	65
Figura 7. Motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por dilutor y raza.	67

Figura 8. Motilidad individual progresiva del semen 69
después del congelamiento por dilutor y
raza.

Figura 9. Porcentaje de espermatozoides vivos del 71
semen después del congelamiento por
dilutor y raza.

ANEXOS

Anexo I.	Composición de la yema de codorniz.	83
Anexo II.	Características seminales evaluadas de los carneros de la Raza Blackbelly y Assaf.	84
Anexo III.	Análisis de varianza de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por dilutor y raza.	88
Anexo IV.	Análisis de varianza de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por dilutor y raza.	88
Anexo V.	Análisis de varianza de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por dilutor y raza.	88

Anexo VI.	Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por tratamiento.	89
Anexo VII.	Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por tratamiento.	89
Anexo VIII.	Análisis de comparación de medias (Duncan) de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por tratamiento.	89
Anexo IX.	Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por raza.	90
Anexo X.	Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por raza.	90

Anexo XI.	Análisis de comparación de medias (Duncan) del % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por raza.	90
Anexo XII.	Análisis de efecto simple de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por tratamiento.	91
Anexo XIII.	Análisis de efecto simple de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por tratamiento.	91
Anexo XIV.	Análisis de efecto simple de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por tratamiento.	91
Anexo XV.	Análisis de efecto simple de motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por raza.	92

- Anexo XVI. Análisis de efecto simple de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por raza. 92
- Anexo XVII. Análisis de efecto simple de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por raza. 92

RESUMEN

La fase experimental del presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal -Banco Nacional de Semen- del Programa de Mejoramiento Animal de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con la finalidad de determinar el efecto de dos dilutores: Tris_glucosa_yema de huevo (T1) y Ovine Freezing Buffer UA 467/005237 Lote N° S 98 (T2), en la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento, empleándose para esto cuatro carneros de 3.5 años de edad promedio, dos de la raza Blackbelly y dos de la raza Assaf, los que fueron alimentados con King grass (*Pennisetum purpureum x Pennisetum typhoides*) y maíz chala más un suplemento concentrado.

Las muestras del semen fueron colectadas con vagina artificial y evaluadas macro y microscópicamente. La evaluación de las muestras de semen puro arrojaron para el color, blanco cremoso; aspecto, denso acuoso; volumen, 0.77 ml; pH, 6.57; motilidad masal, 4.58; motilidad individual progresiva, 87.23%; concentración espermática, 2743×10^6 esp/ml; espermatozoides vivos, 80.27%; espermatozoides anormales, 1.59%.

Posteriormente las muestras fueron diluidas con los dilutores arriba mencionados. El promedio de la motilidad individual del semen antes del congelamiento fue para el dilutor Tris 84.13% y con el Ovine Freezing 87.7%, envasadas en pajillas de 0.25 ml. y puestas en refrigeración durante 4 horas hasta llegar a una temperatura de 5°C, para luego ser colocadas sobre vapores de nitrógeno líquido por 2 minutos, enseguida sumergidas para su congelamiento a -196°C. Finalizado el proceso, se procedió a descongelar y evaluar la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos. El promedio de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento con el dilutor Tris fue 57.60% y con el Ovine Freezing 62.23%, y los promedios de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento fueron para el dilutor Tris de 53,01% y de 53.63% para el Ovine Freezing. Los datos se procesaron empleando el programa estadístico SAS.

Los valores encontrados, indican que de los dilutores estudiados con el Ovine Freezing se obtuvo mejor efecto sobre la motilidad individual progresiva y el porcentaje de espermatozoides vivos del semen congelado en comparación con el dilutor Tris a pesar que los resultados fueron similares.

I. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en ovinos con el fin de mejorar los sistemas de explotación, así como la calidad genética de la especie, ha despertado el interés de muchos ganaderos. Esta técnica no sería posible sin la disponibilidad de un carnero de alto valor genético presente en el rebaño. Con el congelamiento del semen, se incrementan las posibilidades de utilizar la inseminación artificial y se facilita el desarrollo de programas de mejoramiento; asimismo, el costo de la adquisición de sementales sería inferior al necesario en casos de monta natural. El semen de ovino presenta una aceptable supervivencia espermática al proceso, encontrándose así fertilidades con valores entre 25 y 45% en ovejas inseminadas (García *et al.*, 1992).

Estas tasas de fertilidad podrían ser mejoradas si se pone especial énfasis en la composición de los dilutores y el manejo del semen para asegurar la supervivencia de los espermatozoides. Los dilutores usados durante el procesamiento del semen, tienen como finalidad dar las condiciones adecuadas para que los espermatozoides sean viables por largo tiempo bajo la criopreservación.

La congelación del material seminal del carnero, plantea variantes especiales en todos los tiempos de su ejecutoria, a fin de alcanzar condiciones óptimas que propicien mejores resultados, es decir, el mayor número posible de espermatozoides móviles y fecundantes después del proceso. El semen de carnero con motilidad superior a 85% y menos de 10% de espermatozoides anormales se considera de alta calidad (Pérez y Pérez, 1985).

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar el efecto de dos dilutores: Tris_glucosa_yema de huevo y Ovine Freezing Buffer UA 467/005237, sobre la motilidad y el porcentaje de espermatozoides vivos en el semen congelado de ovino.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El semen

El semen es el líquido o suspensión celular semigelatinosa que contiene los gametos masculinos o espermatozoides y las secreciones de los órganos accesorios del aparato reproductor masculino. La porción líquida de esta suspensión, formada durante la eyaculación, se llama plasma seminal (Hafez, 1996).

2.2 Obtención, manipulación y examen de semen.

El uso de la vagina artificial ha constituido hasta hoy uno de los mejores métodos para la colecta de semen en ovinos; es una imitación de la vagina natural de la oveja, que proporciona el estímulo térmico (temperatura), mecánico (presión) y lubricación adecuados. Para ello, el cuerpo de la vagina es llenado con agua a 41-42°C y una presión recomendada de 40-60 mm de mercurio (Inskeep, 1974; Bearden, 1980; Buxadde, 1996), conectándose un tubo calibrado al extremo para la colección del semen. La calidad de semen que se obtenga de ella, depende de la frecuencia y, sobre todo, el estado del animal al momento de la colección (Hafez, 1996).

2.3 Características de una muestra de semen.

Para conocer el potencial reproductivo del carnero reproductor se debe realizar una evaluación del semen (Borque y Sagüez, 1992), la misma que considera diferentes evaluaciones macroscópicas: color, aspecto, volumen, pH y microscópicas: motilidad, concentración, morfología, porcentaje de espermatozoides vivos e integridad de membrana espermática (Pérez y Pérez, 1985; Evans y Maxwell, 1990; Sumar, 1991; Hafez, 1996).

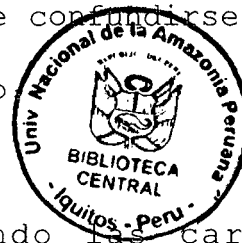
a) Color

La cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado, hace que la muestra presente una coloración blanca lechosa o cremosa cuando la muestra es de buena calidad y cuando es de baja calidad es similar a la leche aguada. Para esta evaluación, la muestra debe estar libre de pelos, suciedad y otros contaminantes (Hafez, 1996).

El color rojizo indica la presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos desechar el eyaculado y proceder a la revisión del macho (Gibbons *et al.*, 2004).

Pérez y Pérez (1985), al referirse al color, menciona que el eyaculado del carnero aparece en el colector como una masa cremosa muy densa, riquísima en zoospermos y de color blanquecino con tendencia mate. En este sentido puede admitirse una relación directa entre la intensidad de su color y la riqueza zoospérmica. Los eyaculados claros y verdosos son de escasa concentración, por tanto, con pocas posibilidades fecundantes. La alimentación concentrada y seca proporciona eyaculados blanquecinos y muy concentrados. Por el contrario, las tonalidades verdes significan régimen alimentario a base de forrajes de buena calidad y ricos en vitamina A, por lo que el esperma es de las mejores cualidades biológicas. Cualquier variación de las tonalidades del eyaculado, fuera de la blanquecina, amarillenta y verdosa deben ser motivo de revisión para descubrir el origen de tales variaciones.

Hafez (1996), manifiesta que algunos ovinos secretan semen de color amarillo debido a la presencia del pigmento riboflavina, inocuo y que no debe confundirse con orina, la cual tiene su olor característico.



Pantoja (2007), analizando las características del semen puro en ovinos de las razas Blackbelly,

Assaf y Canela en Sierra Central, reporta el color blanco cremoso.

b) Aspecto

El semen debe tener un aspecto opaco y relativamente uniforme. Las muestras translúcidas contienen pocos espermatozoides. La densidad que presenta el semen de carneros es debido a su alta concentración. El aspecto del semen depende de la relación de dos constituyentes: espermatozoides y plasma seminal. Las muestras de alta consistencia contienen más espermatozoides que las muestras que tienen menor consistencia o más acuosas. El examen del aspecto es un método muy rápido y simple que estima la concentración del semen (Evans y Maxwell, 1990), tal como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentración de semen del carnero y del macho cabrío valorado por su consistencia.

Valor	Consistencia	N° de espermatozoides x 10 ⁹ por ml	
		Media	Valores extremos
5	Creмоса espesa	5.0	4.5 - 6.0
4	Creмоса	4.0	3.5 - 4.5
3	Creмоса tenue	3.0	2.5 - 3.5
2	Lechosa	2.0	1.0 - 2.5
1	Nebulosa	0.7	0.3 - 1.0
0	Clara (acuosa)	Insuficiente	Insuficiente

Fuente: Evans y Maxwell (1990).

Las variaciones de viscosidad en el eyaculado de carneros se puede observar en el espermatozoide recién colectado, los valores de viscosidad son mínimos a las 4-6 horas, incrementándose ligeramente para estabilizarse; mas adelante vuelve a variar esta condición física, a medida que se establece la descomposición del espermatozoide (necrosis del espermatozoide); sin embargo, es preciso tener en cuenta que la viscosidad del espermatozoide en los rumiantes depende más de su contenido en zoospermios que de las reacciones biológicas entre los componentes líquidos del eyaculado, determinado por la acción de ciertos fermentos de origen prostático sobre el líquido procedente de la glándulas vesiculares (Pérez y Pérez, 1985).

c) Volumen

Según Gibbons *et al.* (2004), informa que la determinación precisa del volumen de un eyaculado es imprescindible para establecer el número total de espermatozoides contenido en el mismo. Así mismo también manifiesta que, este se mide utilizando un tubo de recolección graduado y varía considerablemente entre individuos y razas; sin embargo, es necesario establecer cifras generales para contar con puntos de referencia. El mismo autor indica, que cuando la recolección se realiza

con vagina artificial normalmente se obtienen eyaculados de aproximadamente 1 ml, que varían según la edad, tamaño y condición corporal del animal, frecuencia de colección y destreza del operador.

En ovinos los volúmenes de eyaculados pueden admitirse como normales cuando sus rangos van de 0.5 a 2.0 ml, con una media de 0.8 ml. Los volúmenes escasos y subnormales obedecen muchas veces a eyaculados incompletos, integrados por secreciones de algunas glándulas sin que merezcan la denominación de eyaculado. Así también los grandes volúmenes son consecuencia de hipersecreción glandular, frecuentemente en sementales con libido exagerado y gran excitación sexual (Hafez, 1996).

Pérez y Pérez (1985), afirma que en primavera y cuando los sementales se encuentran en régimen de consumo de mayor cantidad de forraje verde, se obtienen los mayores volúmenes de eyaculado. Las cópulas reiteradas a intervalos demasiado cortos disminuyen el volumen recolectado del esperma y por el contrario la excitación acentuada le aumenta.

Evans y Maxwell (1990), manifiestan que el volumen del eyaculado en carneros jóvenes es menor que en los adultos. Varía también con el tiempo transcurrido entre colecciones. En ovinos es recomendable recolectar cada 2 días. Cuando el semen se obtiene por electroeyaculación, el volumen depende mucho de la destreza del operario así como de la respuesta del semental.

Balbir *et al.* (1976), sostienen que las variaciones en el volumen se deben a diferencias individuales y raciales. Por su parte, Pérez y Pérez (1985), indica que entre otros factores que hacen variar el volumen del eyaculado están el nivel de alimentación, los intervalos en la colección de semen y la excitación del carnero frente a las hembras en celo.

Por su parte Pantoja (2007), trabajando con semen puro de ovinos reporta un volumen $1.65 \text{ cc} \pm 0.55$.

d) pH del semen

El pH del semen es indicador del grado de acidez de la muestra y es determinada mediante un papel indicador comercial. Evans y Maxwell (1990), manifiestan que la

reacción alcalina es característica de una escasa fertilidad y muchas veces acompañada de una disminución en la concentración y en la motilidad.

Los valores de pH son la resultante de la neutralización entre las reacciones glandulares de acción tampón y la concentración iónica del material de las ampollas de Henle y del epidídimo. En ovinos, el pH tiende a la acidosis, fenómeno en el cual radica la capacidad fecundante; de modo que, tan pronto como se inicie la alcalinización en el eyaculado aparece necropermia, desapareciendo la capacidad fecundante (Pérez y Pérez, 1985).

Calle (1976) y Ascue (1985), trabajando en ovinos de la sierra central reportan un rango de 6,3 a 6,8 en el pH del semen.

Asimismo Ramírez (2002), encontró valores de pH de 6.27 con dilutor Tris-Fructuosa-Yema de huevo y pH de 6.24-6.27 con Citrato-Glucosa-Yema de huevo. En tanto que Pantoja (2007), indica para el semen puro un pH 7.

e) Motilidad masal

La motilidad masal valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento solo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes. Se realiza mediante microscopia óptica a 10X sobre una pequeña gota de semen puro colocada sobre un portaobjetos atemperado a 37°C. La clasificación varía, en función de la escala utilizada, de 0 a 5, aunque esta forma de valoración es subjetiva, con la práctica se puede hacer una estimación bastante segura. Las muestras de semen de muy buena o buena motilidad (clasificación 4 ó 5) se pueden utilizar para inseminación artificial (Evans y Maxwell, 1990).

La motilidad masal es un buen indicador del metabolismo celular y de la funcionalidad de la membrana espermática; sin embargo, su relación con la fertilidad no es estrecha (Woelder, 1991). Implica una estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides (Hafez, 2002). Una disminución de la motilidad espermática tiene múltiples causas, que no son posibles diagnosticar por un simple análisis seminal.

Pantoja (2007), encontró para la motilidad masal valores de 4.25 ± 0.43 .

f) Motilidad individual

Es una de las pruebas que con mayor frecuencia se utiliza para evaluar la calidad en semen diluido. En algunas especies parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide. Si existe menos del 40% de espermatozoides con movimiento lineal progresivo, es menos probable que haya fertilidad (Padrón *et al.*, 1999).

El semen de carnero con motilidad superior a 85% se considera de alta calidad (Hafez, 1996).

Las diferencias en la motilidad individual están influenciadas por la composición de los dilutores utilizados (McDonald y Pineda, 1991); por lo que Hafez (1996), sugiere hacer una determinación exacta de la concentración de espermatozoides por mm de semen, dependiendo del tipo de dilutor empleado.

Ramírez (2002), menciona que los porcentajes de motilidad individual que se obtuvieron en diferentes

investigaciones fueron de $85.2\% \pm 4.33$ con Tris-Fructuosa-Yema de huevo, $84.2\% \pm 1.44$ con Citrato-Glucosa-Yema de huevo y de $85.8\% \pm 5.2$ con leche descremada. Encontró también que la motilidad individual disminuye a mayor tiempo de refrigeración (5°C), obteniéndose valores de motilidad a las 48 horas post refrigeración de $75.0\% \pm 9.01$ con Tris-Fructuosa-Yema de huevo, $77.5\% \pm 2.50$ con Citrato-Glucosa-Yema de huevo y de $67.5\% \pm 15.21$ con leche descremada.

Quinn y White (1968) y Quispe (1998), utilizando el dilutor tris-yema-glicerina para semen congelado encontraron motilidades de $37,0\%$ y $36,9\%$ respectivamente.

Pantoja (2007), encontró para la motilidad individual progresiva del semen refrigerado trabajando con el dilutor Tris y Ovine Freezing valores de $80.70\% \pm 2.75$ y con $82.55\% \pm 2.74$ respectivamente.

g) Concentración

La concentración espermática viene definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por centímetro cúbico) de eyaculado.

Son varios los métodos que permiten determinar la concentración espermática, entre ellos el recuento en la cámara de Neubauer y el método del fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos. Si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido, su costo es más elevado que cuando se utiliza la cámara Neubauer (Gibbons *et al.*, 2004).

Es muy importante conocer el número de espermatozoides por mililitro de eyaculado, ya que la relación de dilución depende de ella. El semen de carnero de buena calidad contiene 3,500 a 6,000 millones de espermatozoides/ml (Evans y Maxwell, 1990).

Pantoja (2007), menciona concentración espermática por cc. $2,735 \times 10^6$ en semen puro.

h) Morfología espermática

La morfología espermática se refiere al estudio de la forma del espermatozoide y permite determinar las posibilidades de fertilización de la célula espermática con el objetivo de eliminar aquellos individuos no aptos para la reproducción (Madrid y Bohada, 1993).

El estudio de la morfología espermática ha utilizado tradicionalmente técnicas de tinción, entre las que destacan la eosina-nigrosina (Colas, 1975; Evans y Maxwell, 1990). La introducción de los sistemas computarizados C.A.S.A. (Computer-Assisted-Sperm-Analysis) ha permitido realizar una evaluación morfométrica objetiva y cuantitativa del semen de diversas especies (Casey *et al.*, 1997).

Hafez (1996), afirma que la morfología es una prueba de control de calidad. Cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de estos es muy alta, mayores del 15%, entonces nos encontramos ante un semen de baja fertilidad. Se considera normal los eyaculados con valores de 5-9% de anormales. Entre las anomalías más frecuentes en un eyaculado se encuentran: espermatozoides sin cola, cabeza grande, cabeza pequeña, cola reducida, cabeza adelgazada, rotura de cuello y acrosoma anormal.

Pantoja (2007), reporta porcentaje de espermatozoides anormales 6.39 ± 1.40 en semen puro.

i) Porcentaje de espermatozoides vivos

La viabilidad espermática depende de la integridad de la membrana plasmática y de la actividad biosintética del espermatozoide.

Actualmente existe una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descrito numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática, como por ejemplo la eosina - nigrosina (Colas, 1975) y Tripan azul (Suttiyotin y Thwaites, 1992), de tal manera que si el espermatozoide está vivo, la membrana celular actúa como barrera impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse.

Pantoja (2007), encuentra un porcentaje de espermatozoides vivos en semen puro de $82.51\% \pm 3.69$.

2.4 Uso de dilutores para semen de carnero

El semen obtenido debe ser mezclado con sustancias líquidas llamadas dilutores, con la finalidad de aumentar el volumen del eyaculado e incrementar el número de dosis y sacar un máximo provecho a la capacidad reproductora del macho (Hafez, 1996; Bearden, 1980). Los diluyentes de semen

permiten incrementar el volumen de los eyaculados para inseminar un gran número de hembras, que en el caso de monta natural, sería a una sola.

Los dilutores contienen Tris (Hidroximetil Aminometano) o citrato como buffers, glucosa o fructosa como fuente de energía, penicilina o estreptomicina como agentes antimicrobianos (Gibbons *et al.*, 2004).

Además deben contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5°C (generalmente yema de huevo) y el congelamiento (generalmente glicerol) para evitar lesiones de la membrana durante la congelación (Hafez, 1996). Para el manejo de semen ovino, se cuenta con diluyentes sintéticos, los mismos que brindan posibilidades de su utilización de acuerdo a las circunstancias.

2.4.1 Diluyentes para uso en semen fresco

Los diluyentes más usados en el procesamiento de semen puro de ovino se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes de dilutores en semen fresco, para uso en inseminación artificial, vaginal o cervical.

Dilutor Tris		Dilutor Citrato	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Tris (g)	3.634	Citrato de sodio(g)	2.90
Fructosa (g)	0.50	Fructosa(g)	0.080
Acido cítrico(g)	1.99	ABD, enrasar a	100 ml
ABD, enrasar a	100 ml		

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

2.4.2 Dilutores para semen refrigerado

Los diluyentes empleados por semen refrigerado, se muestra en el cuadro 3.

Borque y Saguez (1992), refieren que la fructosa es necesaria para la supervivencia de los espermatozoides en condiciones anaeróbicas y está estrechamente relacionada con la motilidad inicial de los espermatozoides.

Salomón y Maxwell (1995), manifiestan que el ácido cítrico neutraliza los productos de desecho del metabolismo de los espermatozoides, en especial del ácido láctico, es decir, desempeña una acción buffer efectiva neutralizando la acidez del medio causado por los catabolitos.

Cuadro 3. Componentes de dilutores en semen refrigerado, para uso en inseminación artificial cervical o vaginal.

Dilutor Tris-Fructosa-Yema		Dilutor Citrato-Glucosa-Yema	
Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Tris (g)	3.634	Citrato de sodio(g)	2.37
Fructosa (g)	0.50	Glucosa (g)	0.80
Acido cítrico (g)	1.99	Yema de huevo(ml)	20.00
Yema de huevo (ml)	14.00	ABD (ml), enrasar a	100
ABD (ml), enrasar a	100		

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

Adicionalmente, Holy (1983), destaca la importancia del ácido cítrico por su acción en la fijación del calcio, que junto con los iones de sodio y potasio mantienen el equilibrio osmótico, favoreciendo la motilidad de los espermatozoides (Borque y Saguez, 1992), por participar en la activación de la fosfatasa ácida presente en el plasma seminal.

Saxena y Tripathi (1986), evaluando diferentes medios para la dilución del semen de carnero, encontraron que el dilutor citrato yema de huevo mostraba valores de motilidad de 48.33% y de espermatozoides vivos de 53.08% a las 72 h de conservado a una temperatura de 20-28°C.

2.4.3 Dilutor para semen congelado

Para congelar el semen de los carneros, se recomienda usar el dilutor Tris. En el Cuadro 4, se muestra la composición química del dilutor Tris.

Cuadro 4. Composición química del dilutor Tris

Insumo	Cantidad
Tris (g)	3.634
Glucosa (g)	0.500
Ácido cítrico (g)	1.990
Yema de huevo (ml)	15
Glicerol (ml)	5
Penicilina (UI)	100,000
Estreptomina (mg)	100
Agua destilada (ml), enrasar a	100

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

El hidroximetilaminometano es muy conocido por su acción buffer de proteger al acrosoma de los espermatozoides. Este buffer orgánico tiene mayor capacidad amortiguadora que el citrato o fosfato, es menos tóxico para los espermatozoides, penetra las células espermáticas para actuar como buffer intracelular (Visser, 1975). Por su acción osmótica y poder neutralizante de los productos de desecho metabólico, en particular del ácido láctico, es recomendado para su uso en dilutores de semen de ovinos (Evans y Maxwell, 1990).

La adición de yema de huevo al dilutor tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad, particularmente luego de un rápido enfriamiento del semen a 10 y 5°C, ya que las lipoproteínas de baja intensidad actúan como crioprotectores contribuyendo con dos factores, uno de los cuales protege contra el shock de frío (factor de resistencia) y el otro que mantiene la viabilidad (factor de conservación) (Fiser y Fairfull, 1986).

En Londres, Watson (1981), realizó un estudio sobre la importancia y el rol que cumplen las lipoproteínas de la yema de huevo en la conservación de la membrana citoplasmática del espermatozoide de carnero, obteniendo motilidades de 31.7, 46.7 y 43.3%, en las concentraciones de 0.1, 0.5 y 2.5 mg de lipoproteínas por ml de dilutor, respectivamente, al evaluar semen conservado a 5°C por un período de 72 horas.

Paulenz *et al.* (2002), refiere que mantuvo una mejor motilidad progresiva y un menor daño a la membrana plasmática, durante la conservación del semen a 20°C procesando con Tris conteniendo 20% de yema de huevo, que cuando los espermatozoides fueron conservados en un dilutor en base a leche conteniendo 5% de yema de huevo.

Gil *et al.* (2002), experimentando con diferentes concentraciones de yema de huevo y glicerol, determinaron que los diluyentes con una concentración de 5 a 10% de yema de huevo y la adición de glicerol a 5°C, son los más recomendables. Pérez y Pérez (1985), en estudios sobre las propiedades de las proteínas del plasma seminal para proteger al espermatozoide del shock de frío, concluyó que estas son capaces de revertir las alteraciones en la membrana plasmática, pudiendo ser utilizadas para prevenir daños en la misma y mantener la viabilidad del espermatozoide de carnero, al adicionarlas al dilutor en una cantidad de 2.1 mg antes del tratamiento de frío, existiendo además una interacción positiva con los ácidos grasos linoleico y oleico y con la vitamina E, mejorando la viabilidad de los espermatozoides.

Los antibióticos actúan reduciendo la carga bacteriana del medio que rodea al espermatozoide, debido fundamentalmente a que el material colectado se contamina con el medio, recomendándose el uso de dosis de 500 a 1000 UI de penicilina/ml de dilutor y 500 a 1000 ug de estreptomicina/ml de dilutor (Pérez y Pérez, 1985; Hafez, 1996). La penicilina tiene su acción principal en los microorganismos gram positivos, impidiendo la

transpeptidación a nivel de la pared celular bacteriana, interrumpiendo su regeneración, destruyendo así las bacterias (Sumano y Ocampo 1997).

Por otro lado, la estreptomicina tiene rápida acción contra los microorganismos gram negativos a nivel del ribosoma bacteriano, interfiriendo en la síntesis proteica del microorganismo (Merck, 1993).

2.5 Congelación del semen en carneros

Cuando el semen se congela y conserva a muy baja temperatura, esto es, en nitrógeno líquido a -196°C , las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas (Evans y Maxwell, 1990).

Esta ventaja hace que el semen se pueda conservar durante mucho tiempo para usos futuros y se asegure la disponibilidad de un semental en particular. También de esta forma se facilita el transporte de semen tanto nacional como importado y se pueda recoger y conservar en épocas distintas a la estación reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen (Mellisho et al., 2004).

La única desventaja que tiene su utilización son las bajas tasas de preñez, debido fundamentalmente a que la congelación y descongelación lesionan los acrosomas de las células espermáticas y afectan la motilidad de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

El semen de carnero puede ser congelado, por un método lento o convencional, en vapor de nitrógeno líquido a -196°C y por el método rápido en hielo seco (dióxido de carbono sólido) a -79°C y nitrógeno líquido. El primer método implica congelar semen en pajillas de plástico, mientras que el segundo dispone el semen en forma de pellets, obtenidos vertiendo el semen más dilutor dentro de agujeros grabados en la superficie de hielo seco (Evans y Maxwell, 1990).

La supervivencia de los espermatozoides de carnero es mejor después del congelamiento rápido. El semen congelado por cualquiera de los métodos debe ser transferido a tanques con nitrógeno líquido para su conservación (Evans y Maxwell, 1990; Cueto *et al.*, 2003).

Evans y Maxwell (1990), indica que el enfriamiento a 5°C ó a 15°C , se debe realizar en 1,0-1,5 h y de 2-3 h

respectivamente. Se debe poner especial atención para evitar un descenso rápido desde 18 a 5°C, ya que en este margen de temperatura, los espermatozoides son especialmente sensibles al shock por frío. Las temperaturas por debajo de 0°C son fatales para los espermatozoides. La viabilidad es más corta a 15°C, pero lo suficientemente prolongada para permitir su transporte.

Fiser y Fairfull (1986), sostienen que un rápido enfriamiento del semen diluido desde 30 a 15°C tiene poco o ningún efecto sobre la sobrevivencia de los espermatozoides antes y después del enfriamiento. Sin embargo, esto va acompañado de una disminución del porcentaje de motilidad y del porcentaje de acrosomas intactos, indicando que la adición de la yema de huevo en la fase inicial del dilutor, tiene un efecto benéfico en la motilidad luego de un enfriamiento rápido del semen a 10 y 5°C.

Para la refrigeración del semen diluido depositado en pajillas, se coloca en un recipiente de agua a 30°C, y se introduce a un frigorífico a 5°C ó 15°C. La motilidad de los espermatozoides se puede mantener durante varios días a 5°C; sin embargo, la fertilidad de semen utilizado para inseminación cervical, declina de 10 a 35% por día de

almacenamiento (Buxadde, 1996; Daza, 1997; Maxwell y Salomon, 2000). Es por ello que en Noruega y Suecia, se recomienda que el semen diluido a 5°C no sea conservado por mas de 12 horas para su utilización en la inseminación artificial (Paulenz *et al.*, 2002).

López (1999), estudió los cambios que se producen en la motilidad espermática y la integridad de membrana del semen conservado a 5°C por un período de 7 días, obteniendo como resultado que no hay diferencia entre los dilutores citrato de sodio, tris o leche, cuando el semen diluido de ovino es conservado a 5°C por un corto período de tiempo (dos días). Sin embargo cuando el semen fue conservado por un mayor tiempo, los espermatozoides presentes en el dilutor citrato de sodio tuvieron una mayor viabilidad.

Gil *et al.* (2002) concluyeron que cuando se usan dilutores a base de leche para congelar el semen de carnero, es recomendable usar concentraciones bajas de yema de huevo (5-10%) y la adición del glicerol a 5°C. Además, los resultados de su investigación indicaron que el dilutor comercial Bioxcell, al que se le adicionó 6.4% de glicerol, puede ser utilizado como una alternativa al dilutor convencional de leche conteniendo 5% de yema de huevo.

En el protocolo de congelación descrito por Evans y Maxwell (1990), mencionan que obtenidos los reactivos químicos, estos deben ser preparados para ser agregados al semen en dos fracciones de igual volumen, una sin glicerol (fracción A) a 32°C y la otra con glicerol (fracción B) a 4-5°C. El semen colectado inmediatamente pasa a baño maría (30 a 32°C) y mientras se realiza la evaluación de la calidad seminal, se procede a la pre - dilución de 1:1 con la fracción A del dilutor, de tal manera que los espermatozoides tienen más medio buffer y energético.

El mismo autor sostiene que, luego de determinar la calidad, se calcula el número de dosis de semen a obtener y la cantidad de dilutor a agregar, para enseguida añadir la fracción A restante, siempre cuidando que el dilutor y el semen estén a la misma temperatura en baño maría (32°C). Inmediatamente se inicia el descenso gradual de la temperatura de semen diluido a 0.7°C/min. (2°C por cada 3 min.), hasta llegar a 5°C, que demora un tiempo de 35 a 40 min. A la fase de descenso de temperatura sigue la de equilibrio o estabilización a 4-5°C. Al iniciar ésta se agrega la fracción B en tres partes, a intervalos de 10 minutos y se continúa la estabilización por un espacio de

45 a 60 minutos más, después de los cuales se procede a realizar la congelación.

2.6 Calidad del semen congelado

Respecto a tasas de descongelación, ésta se halla influenciada por la velocidad de congelamiento. Soderquist *et al.* (1991), en Suiza, probaron límites extremos de descongelación (50°C/9 seg. y 70°C/5 seg.), en pajillas de semen de carneros, no hallando diferencias significativas.

Ortiz *et al.* (1999), en México, usando el dilutor Tris compararon el efecto de dos temperaturas y tiempos de descongelación (1=36°C/8 seg. y 2=70°C/4 seg.) en pajillas de 0.25 ml con 300 millones de espermatozoides, sobre la motilidad y fertilidad del semen ovino. Sus observaciones de motilidad al descongelar fueron de 51.28% y 47.98% para los grupos 1 y 2, respectivamente.

Pantoja (2007), analizando las características del semen congelado encontró que, la motilidad individual progresiva con Tris y Ovine Freezing como diluyente, fue 60.77 ± 3.57 y 62.93 ± 2.41 % respectivamente.

En Argentina, Boretto et al. (2002), analizaron la calidad del semen post congelamiento en ovinos Merino y reportaron promedio de espermatozoides vivos después del proceso de 46.45 ± 5.95 %.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución y duración

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del Banco Nacional de Semen (BNS) de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicado en el Distrito de La Molina, Provincia y Departamento de Lima, entre las coordenadas 12° 05" Latitud Sur y 76° 57' Longitud Oeste, a una altitud de 243,7 m.s.n.m. y una precipitación promedio de 60 mm anuales. La temperatura máxima anual promedio en este lugar fue de 28,7°C en la época de calor y la mínima 14,6 °C en la de frío*.

El estudio tuvo una duración de cinco meses, entre agosto y diciembre del 2007.

3.2 Animales del experimento

Para el experimento se usaron cuatro carneros, dos de la raza Blackbelly (Eladio y Efraín) y dos de Assaf (Andrés y Lino), de 3,5 años de edad promedio, provenientes de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Los animales estuvieron bajo un mismo régimen alimenticio, manejo y cuidado sanitario.

* Fuente: Observatorio Meteorológico A. Von Humbolt - UNA La Molina, 2007

3.3 Instalaciones, materiales y equipos

Cada carnero reproductor fue ubicado en corrales de madera, de 2,80 m de ancho x 3,00 m de largo y una altura de 1,20 m, provistos de sombra, con sus respectivos bebederos y comederos.

Para la colección del semen se contó con una caseta que proporcionó sombra, permitiendo efectuar el procedimiento sin riesgo a la exposición de la radiación solar, en la que se acondicionó un brete de monta de metal, con dimensiones: largo de 1,0 m, ancho 0,80 m y alto 1,20 m, y una fosa de colección con paredes enlucidas por debajo de la superficie de 1,75 m de largo, 0,74 m de ancho y 1,02 m de profundidad. Además para el entrenamiento y colección de semen, se utilizaron jáquimas, dos vaginas artificiales IMV^R completas, papel toalla, termo, caja tecnoport y tubos de ensayo.

En los análisis del semen en el laboratorio, se usaron los siguientes equipos y materiales: dos microscopios de luz con platina incorporada temperada, platina de mesa para temperar los porta y cubreobjetos, baño maría, esterilizador para los objetos de plástico, tubos de plástico, tubos graduados de vidrio, balanza micrométrica,

pipetas Pasteur, micro pipetas, baguetas, cubre objetos, porta objetos, cámara de Neubauer, hemocitómetro, centrifuga, papel indicador de pH, bandejas de plástico, horno esterilizador y colorante eosina-nigrosina.

El envasado del semen se efectuó en pajillas de 0.25 ml Cassou ® IMV Technologies, Francia.

3.4 Metodología

3.4.1 Alimentación de los animales

La alimentación de los reproductores se basó en forraje verde picado de King grass (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*), maíz chala y suplemento con concentrado.

En el cuadro 5 se presentan los insumos y la proporción utilizada en la elaboración del concentrado, así como el aporte nutricional, el mismo que cubrió los requerimientos nutritivos de ovinos en actividad reproductiva.

El reparto del forraje se realizó dos veces por día, mientras que el concentrado sólo por las mañanas. La disponibilidad de agua fue ad-libitum.

Cuadro 5. Composición y aporte nutricional del concentrado.

Insumo	%
Algarrobo	20
Pancamel	20
Afrecho	28
Maíz molido	15
Torta de soya	10
Harina de pescado	6
Minerales y vitaminas	0.5
Sal común	0.5
Total	100
Aporte nutricional aproximado:	
Proteína	14
Fibra	17.5
NDT	68.5

Fuente: Banco Nacional de Semen - UNALM.

3.4.2 Manejo de los animales

El tiempo de permanencia de los animales en el BNS fue 20 semanas, 8 en la fase pre-experimental o de adiestramiento y 12 en la fase experimental. Los reproductores tuvieron un régimen de paseo, una vez por semana por un tiempo de 20 minutos.

3.4.3 Colección de semen

El proceso de colección del semen tuvo lugar en el brete de monta, contándose con una borrega para la

excitación de los carneros, empleándose para este fin, dos vaginas artificiales con agua temperada entre 41⁰C - 42⁰C y una presión de 40 a 60 mm de Hg. La frecuencia fue de dos colecciones/semana/carnero y dos saltos/colección.

3.4.4 Evaluación del semen

3.4.4.1 Evaluación macroscópica

a) Volumen:

Se midió el volumen del eyaculado por observación directa al tubo de vidrio graduado.

b) Color

A través del tubo de vidrio graduado se pudo observar el color el mismo que depende de la cantidad de espermatozoides.

c) Aspecto

Se procedió a determinar la impresión visual que produce la masa total del eyaculado por observación directa al colector de vidrio. La evaluación en cuestión permitió también descubrir contaminaciones groseras.

d) pH

Se midió el pH de la muestra empleando una cinta colorimétrica, de acuerdo a la escala de valores.

3.4.4.2 Evaluación microscópica del semen puro y congelado**a) Motilidad**

Se consideró una valoración subjetiva expresada en porcentaje colocándose 10 μ l del semen aproximadamente en láminas porta y cubre objetos en platina temperada a 37°C y y observándose al microscopio con aumentos de 20 y 40X.

b) Concentración espermática

Se utilizó la técnica descrita por Evans y Maxwell (1990), la misma que incluye el uso del hemocitómetro, la cámara de Neubauer y conteo de espermatozoides.

El cálculo del número total de espermatozoides se obtuvo multiplicando el número de células contadas por 10^6 millones de espermatozoides por ml del semen.

c) Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos

Esta evaluación tuvo la finalidad de ver el grado de efectividad de los dilutores en la conservación de los espermatozoides luego de la congelación. Mediante la

coloración eosina-nigrosina, se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, para ello se descongeló la pajilla, tomándo 10 ul del semen aproximadamente y 5 ul de ambos colorantes, suavemente fue homogenizada para hacer un frotis sobre una lámina porta objeto. Se determinó el porcentaje de vivos (blancos) y muertos (rojo), observando al microscopio a 40X.

d) Anormalidades espermáticas

Para la determinación de esta característica se efectuó el correspondiente conteo de las diferentes anormalidades, comprendidas en 100 células espermáticas en una alícuota de semen previa tinción con eosina-nigrosina a 40X.

3.4.5 Dilución del semen

En las figuras 1 y 2 se resumen las técnicas de dilución de los dilutores Tris y Ovine Freezing respectivamente.

3.4.6 Proceso de congelación del semen

En la Figura 3, se detallan los pasos del proceso incluyendo la obtención del semen y la evaluación después del congelamiento.

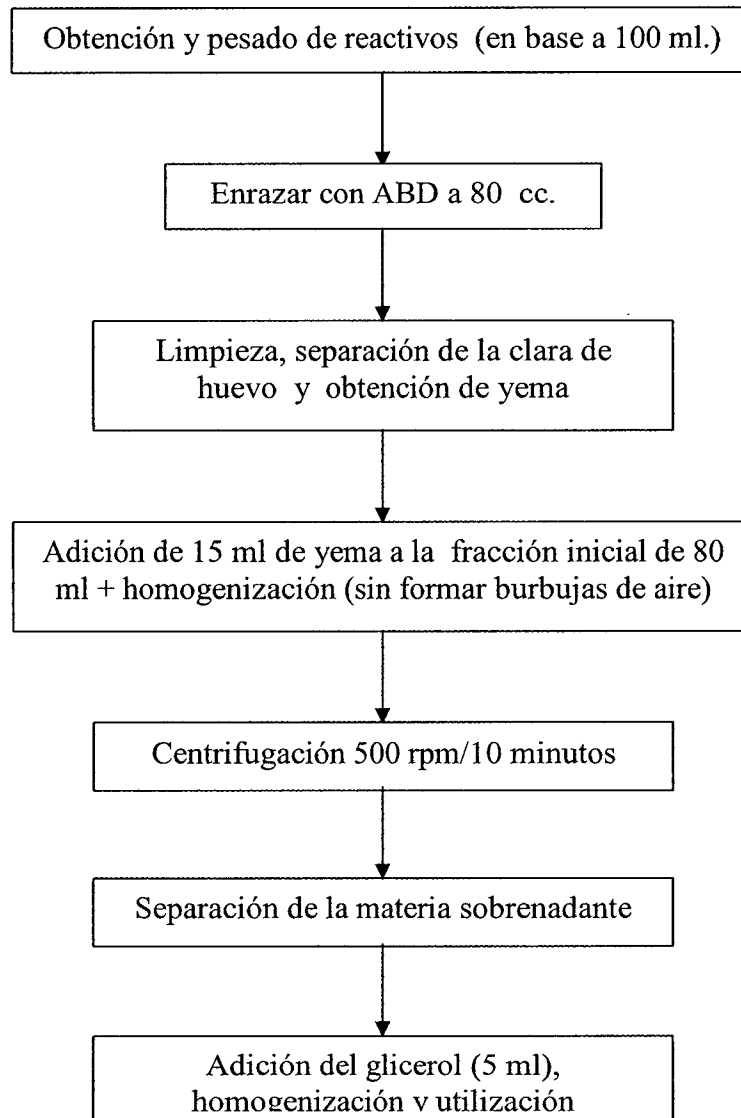


Fig. 1. Técnica de preparación del dilutor Tris.

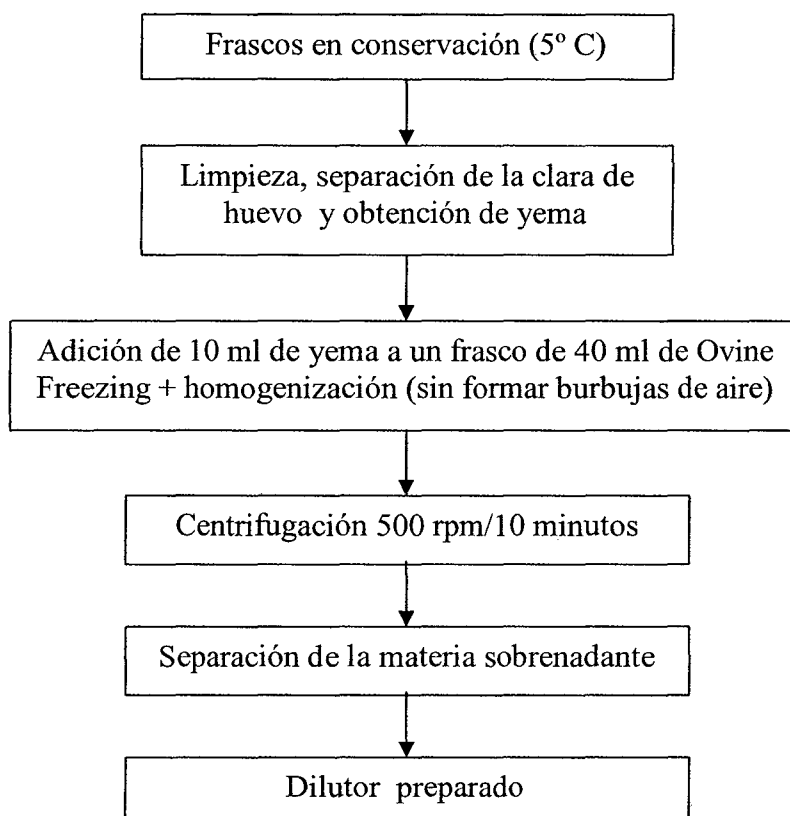


Fig. 2. Técnica de preparación del dilutor Ovine Freezing.

3.4.6.1 Dilución y envasado del semen

Del eyaculado fue tomado una alícuota (30 μ l) del semen para las evaluaciones. Inmediatamente se hizo una pre-dilución agregando el dilutor en la misma proporción del semen, ambos se colocaron en baño maría a 34°C, para que en el momento de la dilución tengan la misma temperatura. La dilución final se obtuvo agregando suave y lentamente el dilutor al semen pre-diluido, evaluándose la motilidad después de cada paso del proceso.

El número de pajillas a congelar fue determinado en función a la concentración espermática del eyaculado, siendo 25×10^6 el número de espermatozoides por dosis del semen y envasado luego en pajillas 0.25 ml. Cassou ® IMV Technologies, Francia.

3.4.6.2 Descenso de temperatura y tiempo de estabilización

Luego del envasado de las pajillas se inició inmediatamente el descenso de temperatura, colocándolas en cubetas conteniendo agua a 25°C, llevándolas enseguida a refrigeración, a una temperatura de 34 a 5°C en cuatro horas.

Quince minutos antes de cumplirse las dos horas, se observó la temperatura y en los casos de no llegar a la esperada agregamos gradualmente pequeños cubos de hielo al recipiente que contenía las pajillas, hasta lograr la temperatura de 5°C en la parte final de la curva de enfriamiento y equilibrio, procediéndose luego a la evaluación de motilidad.

3.4.6.3 Congelación de las pajillas

Se realizaron muchas congelaciones para obtener la adecuada, llegando a un protocolo ideal que consistió en colocar las pajillas en la rejilla metálica y un sensor de temperatura sobre ellas, para después ponerlas en una caja de congelación contenida con nitrógeno líquido al nivel de la rejilla. A partir de 0°C se controló 2 minutos, tiempo en el cual alcanza una temperatura de -78°C. Para en seguida sumergir esta por completo en el nitrógeno líquido.

3.4.6.4 Descongelación y evaluación.

La descongelación de la pajilla se realizó en un termo descongelador con agua a una temperatura de 40 °C por espacio de 10 segundos. Pasado este tiempo, la pajilla fue retirada, secada y agitada para desplazar la burbuja de aire al extremo del alcohol polivinílico, abriéndose este con la ayuda de una corta pajillas. Se tomó una muestra para observar la motilidad individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos después del congelamiento.

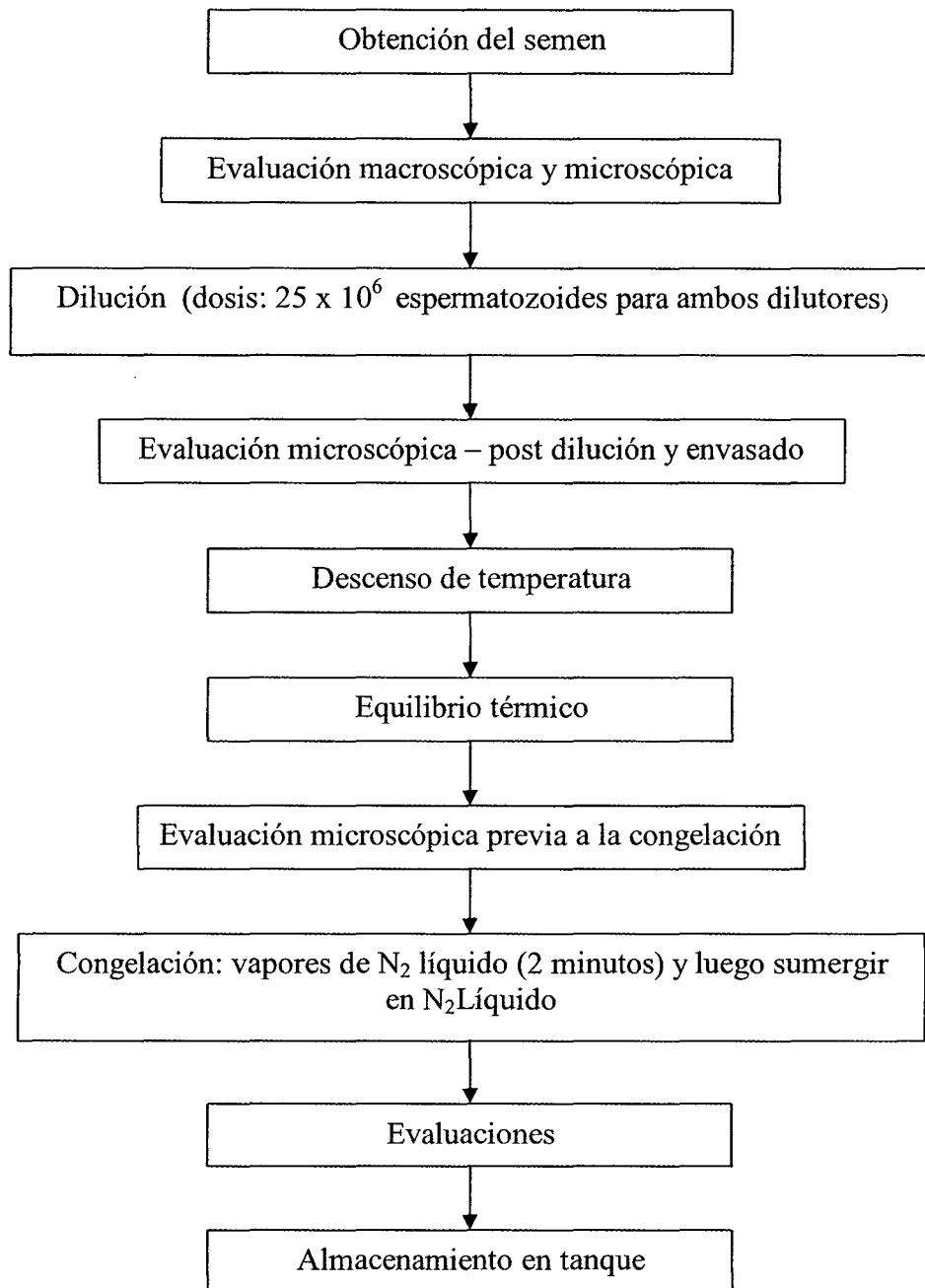


Fig. 3. Proceso de congelación del semen de ovino.

3.5 De los tratamientos

En la presente investigación, la búsqueda de protocolos que permitan la conservación óptima de las dosis de semen de ovino para una inseminación efectiva, planteó el establecimiento de dos tratamientos.

- Tratamiento 1: Diluyente Tris-glucosa-yema de huevo.
- Tratamiento 2: Diluyente Ovino Freezing Buffer.

En el cuadro 6, se presenta la composición del dilutor Tris, usado en la investigación.

Cuadro 6. Composición del dilutor Tris

Componente	Cantidad
Tris (g)	3.634
Glucosa (g)	0.500
Ácido cítrico (g)	1.990
Yema de huevo codorniz (ml)	15
Glicerina (ml)	5
Penicilina (UI)	100,000
Estreptomicina (mg)	100
Agua destilada enrasar a	100 ml.

Fuente: Evans y Maxwell (1990)

El Ovino Freezing UA 467/005237 Lote N° S 98, es un dilutor comercial de la marca IMV Technologies ® Francia.

3.6 Análisis estadístico

Los datos porcentuales, fueron previamente transformados mediante arco seno, según la fórmula:

$$y = \text{arc sen } [(x / 100)^{1/2}]$$

Donde:

x = representa el valor porcentual

Para las características del semen puro: volumen, pH, motilidad masal, concentración, porcentaje de espermatozoides vivos, anormalidades y motilidad individual progresiva; se usaron las medidas de tendencia central, desviación estándar y coeficiente de variación.

En el análisis estadístico e inferencial de la motilidad individual progresiva, antes y después del congelamiento, así como porcentaje de espermatozoides vivos después del congelamiento del semen, se empleó el diseño de bloques completamente al azar, con arreglo factorial 2 x 2, con submuestreo y error de muestreo, siendo los factores a evaluar, los diluyentes de semen Tris y Ovine Freezing y las razas, Blackbelly y Assaf, considerando para ello como bloques cada uno de los carneros.

El modelo aditivo lineal usado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = u + B_k + D_i + M_j + (D*M)_{ij} + e_{ijk} + \sigma_{ijkl}.$$

Donde:

Y_{ijkl} = Variable de respuesta de motilidad del k-ésimo carnero, sujeto al j-ésimo momento de procesamiento de semen con el i-ésimo diluyente.

u = Media general.

B_k = Efecto del k-ésimo bloques.

D_i = Efecto del i-ésimo diluyente (Tratamientos).

M_j = Efecto de la j-ésima raza.

$(D*M)_{ij}$ = Efecto de la interacción de la j-ésima raza con el i-ésimo diluyente.

e_{ijk} = Error experimental.

σ_{ijkl} = Error de muestreo.

Para todos los análisis estadísticos se utilizó el PROC GLM del programa SAS (Statistical Analysis System), descrito por Pérez (2001).

En las determinaciones de la significancia se empleó el error experimental, tanto para la comparación de medias de Duncan, así como para los efectos simples de la interacción.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Características del semen puro

Las muestras del semen puro obtenidas en el presente trabajo fueron homogéneas y de buena calidad, cuyas características y valores promedios encontrados se muestran en el cuadro 7 y figuras 4, 5 y 6.

Los resultados obtenidos en la evaluación de las características de color fueron blanco cremoso y aspecto denso acuoso, los mismos que se encuentran dentro del rango establecido para esta especie, tal como lo reportan Pérez y Pérez, (1985); Evans y Maxwell, (1990); Hafez, (1996) y Pantoja (2007).

Cuadro 7. Promedio de volumen, pH, motilidad masal, concentración, espermatozoides vivos, anormales y motilidad individual progresiva del semen puro por raza.

Característica	Raza		Promedio
	Blackbelly	Assaf	
Volumen(ml)	0.77 ± 0.06	0.77 ± 0.05	0.77 ± 0.06
pH	6.57 ± 0.02	6.57 ± 0.01	6.57 ± 0.02
Motilidad masal (%)	4.21 ± 0.10	4.94 ± 0.04	4.58 ± 0.07
Motilidad indiv.Prog.(%)	84.25 ± 0.72	90.20 ± 0.55	87.23 ± 0.64
Concentrac. (x 10 ⁶ /ml)	2379.37 ± 89.92	3106.63 ± 50.58	2743 ± 70.25
Esp. vivos (%)	77.92 ± 0.64	82.62 ± 0.25	80.27 ± 0.45
Esp. anormales(%)	1.65 ± 0.09	1.52 ± 0.08	1.59 ± 0.09

Los valores promedio encontrados para la característica volumen están dentro de los rangos normales reportados por Hafez, (1996); sin embargo, se muestran por debajo de los citados por Gibbons *et al.* (2004) y Pantoja, (2007). Estas diferencias pueden atribuirse a los factores raza, individuo, frecuencia de colección y destreza del operador, tal como lo manifiestan Balbir *et al.* (1976); Evans y Maxwell, (1990) y Gibbons *et al.* (2004).

Para el pH, los valores tienden a la acidosis según lo manifiesta Pérez y Pérez, (1985); cuyos promedio son similares a los reportados por Calle, (1976) y Ascue, (1985). No obstante se encuentran por debajo de lo indicado por Pantoja, (2007).

En lo referente a motilidad masal, la raza Assaf presentó valores más altos que la raza Blackbelly; sin embargo el promedio es ligeramente superior a lo mencionado por Pantoja, (2007) y se encuentra dentro de la escala indicada por Evans y Maxwell, (1990), recomendado para inseminación artificial.

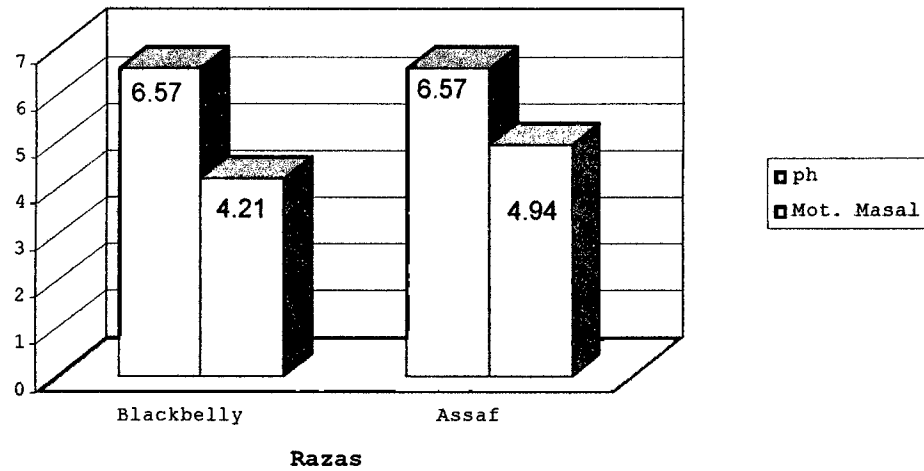


Fig. 4. pH y motilidad masal del semen por raza.

Los valores de motilidad individual progresiva encontrados en nuestro trabajo son superiores a los considerados por Hafez, (1996), se asume que esta diferencia se deba al factor raza y al manipuleo dentro del proceso.

Con respecto a la concentración espermática los valores obtenidos están por debajo de lo referido por Evans y Maxwell, (1990), superiores a los reportados por Pantoja, (2007). Estas diferencias probablemente se deban al volumen obtenido o al factor raza con que trabajaron los investigadores mencionados.

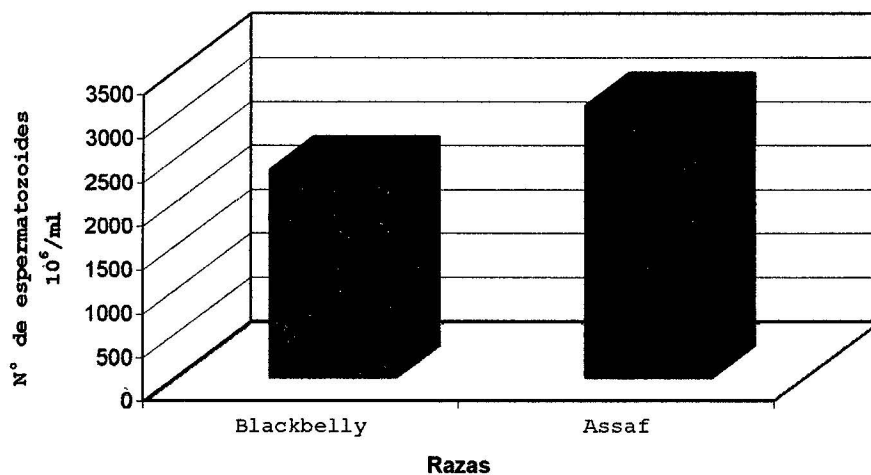


Fig. 5. Concentración del semen por raza (N° de espermatozoides x 10⁶/ml).

Los resultados para el porcentaje de espermatozoides vivos son inferiores a los reportados por Pantoja, (2007) debido probablemente al factor raza.

En cuanto a las anomalías espermáticas estas son inferiores a los rangos manifestados por Hafez, (1990) y Pantoja, (2007), esto puede atribuirse a la edad de los animales.

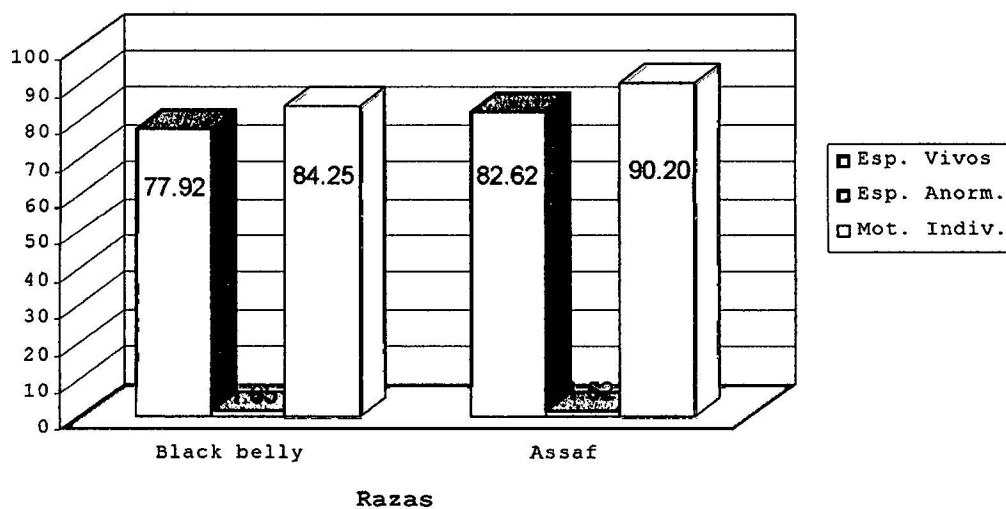


Fig. 6. Espermatozoides vivos, anormales y motilidad individual progresiva del semen puro por raza.

4.2 Características del semen antes del congelamiento

4.2.1 Motilidad individual progresiva por dilutor y raza

En el cuadro 8, figura 7 y anexo III, se muestran los valores obtenidos para la motilidad individual progresiva del semen por dilutor y raza antes del congelamiento.

Al análisis de varianza se determinó, que los efectos debido a los dilutores (Tratamientos) presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), mientras que para las razas fueron altamente significativas ($P < 0.01$).

Los valores encontrados son superiores a los referidos por Ramírez, (2002) y Pantoja, (2007). Estas diferencias podrían estar influenciadas por la composición de los dilutores utilizados y el tiempo de refrigeración, tal como lo sostiene Mc Donald, (1991) y Ramírez, (2002) respectivamente.

A la prueba de comparación de medias de Duncan, los valores encontrados mostraron una mejor motilidad individual progresiva con el dilutor Ovine Freezing con 87.7%, así como para la raza Assaf con 92.75% (Anexo VI y IX).

Cuadro 8. Porcentaje de motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por dilutor y raza.

Dilutor	Motilidad Individual Progresiva (%)		
	Raza		Promedio
	Blackbelly	Assaf	
T1: Tris	82.70 ± 0.57	85.55 ± 0.63	84.13 ± 0.47b
T2: Ovine Freezing	82.65 ± 1.14	92.75 ± 0.45	87.7 ± 1.01 ^a
Promedio razas	82.68 ± 0.86	89.15 ± 0.54	85.92 ± 0.74

Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas (p>0.05)

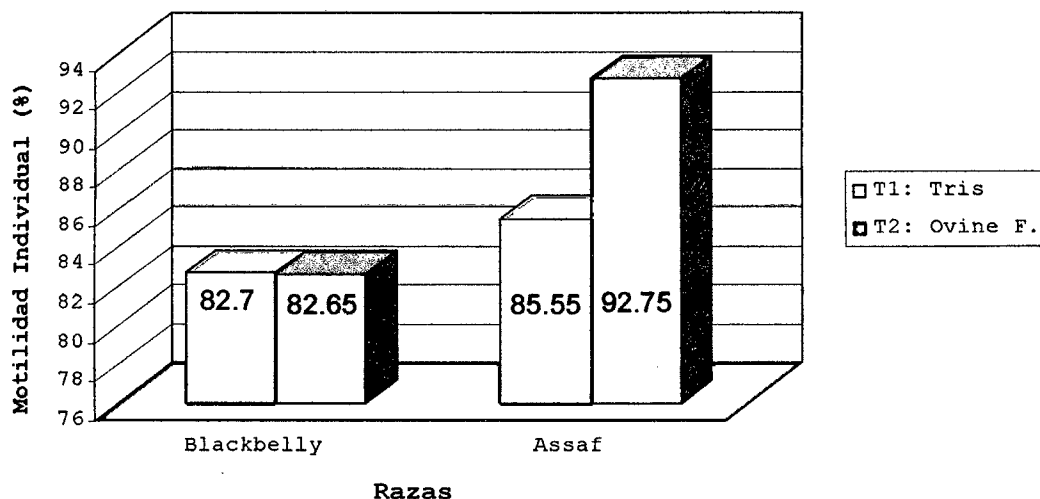


Fig. 7. Motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por dilutor y raza.

Al analizar los efectos simples, dado que la interacción presentó diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) (ver anexo III), se encontró que en el caso de los tratamientos, estas se debieron al dilutor Ovine Freezing ($P < 0.05$), mientras que para raza, a la Assaf. (ver anexos XII y XV).

4.3 Características del semen después del congelamiento

4.3.1 Motilidad individual progresiva por dilutor y raza

Los valores promedio de motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento se muestran en el cuadro 9, figura 8 y anexo IV.

Al análisis de varianza se determinó, que los efectos debido a los dilutores (Tratamientos) no presentaron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$); lo mismo ocurrió, cuando se consideró el efecto raza ($P>0.05$) (ver Anexo IV).

Por otro lado, al establecer comparación de medias Duncan, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) tanto para el efecto tratamiento, así como para raza (ver Anexos VII y X).

El efecto de la descongelación sobre la motilidad de los espermatozoides, es menor con el dilutor Ovine Freezing (62.23%) aunque los valores no son estadísticamente significativos ($p>0.05$) con respecto al dilutor Tris (57.60%); sin embargo, son superiores a los reportados por Quinn y White, (1968); Quispe, (1998); Ortiz *et al.* (1999), pero inferiores a lo referido por Pantoja, (2007).

Las diferencias observadas, posiblemente se deba a los componentes de los dilutores, tal como lo sostiene Borque y Saguez, (1992), a la velocidad de la congelación del que informa Soderquist *et al.* (1991) o a la

temperatura, tiempo de descongelación y capacidad de la pajilla que se utilizó en el presente estudio.

Cuadro 9. Porcentaje de motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por dilutor y raza.

Dilutor	Motilidad Individual Progresiva (%)		
	Raza		Promedio
	Blackbelly	Assaf	
T1: Tris	56.75 ± 0.99	58.45 ± 1.30	57.60 ± 0.82 ^a
T2: Ovine Freezing	60.10 ± 0.75	64.35 ± 0.51	62.23 ± 0.56 ^a
Promedio razas	58.43 ± 0.87	61.40 ± 0.91	59.92 ± 0.69

Letras iguales indican que no existen diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$)

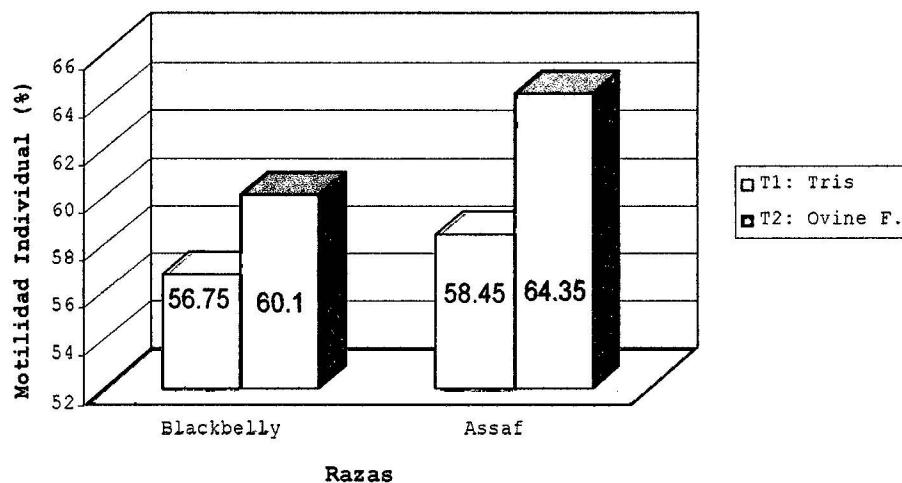


Fig. 8. Motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por dilutor y raza.

Al análisis de los efectos simples, al no encontrarse diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) en la interacción, no se puede atribuir a que factor se debe estos (ver Anexos IV, XIII y XVI).

4.4 Porcentaje de espermatozoides vivos después del congelamiento

En el Cuadro 10 y Figura 9, se muestran los valores obtenidos en la evaluación de espermatozoides vivos después de la congelación por dilutor y raza.

El análisis de varianza y comparación de medias Duncan no mostraron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) entre tratamiento y raza, (ver Anexos V, VIII y XI).

El porcentaje de espermatozoides vivos después del congelamiento, se vio reducido considerablemente al comparar con el porcentaje observado en el semen puro; sin embargo, se logró una sobrevivencia del 53.01 y 53.63 % para los dilutores Tris y Ovine Freezing respectivamente, considerando para esta especie un valor que permite trabajar en inseminación artificial, tal como lo manifiesta Hafez, (1996). Por otro lado Boretto *et al.* (2002), reportan valores por debajo a los encontrados en el

presente estudio, debido posiblemente a la capacidad de la pajilla, ya que este utilizó el de 0.5 ml y el grado de lesión por frío en células espermáticas es diferente.

Cuadro 10. Porcentaje de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por dilutor y raza.

Dilutor	Raza		Promedio
	Blackbelly	Assaf	
T1: Tris	51.59 ± 0.71	54.42 ± 0.68	53.01 ± 0.53a
T2: Ovine Freezing	52.59 ± 0.58	54.66 ± 0.68	53.63 ± 0.47a
Promedio razas	52.09 ± 0.65	54.54 ± 0.68	53.32 ± 0.50

Letras iguales indican que no existe diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$)

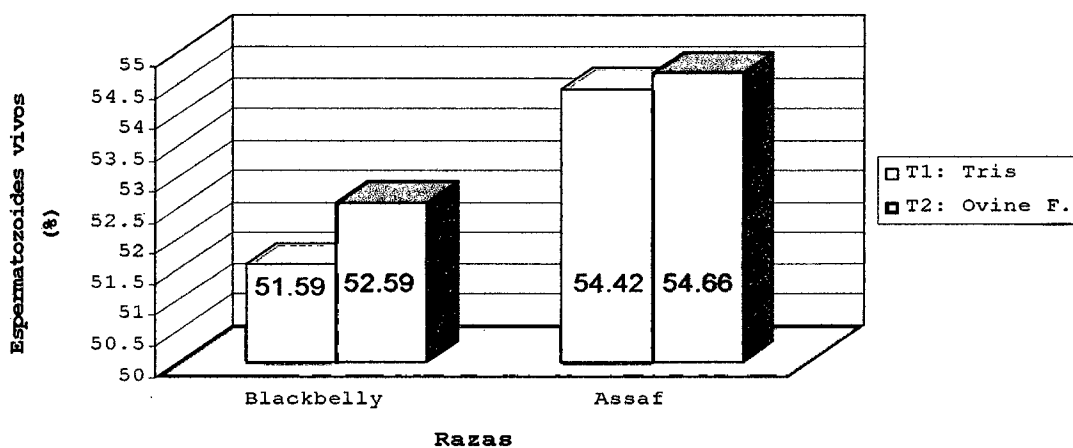


Fig. 9. Porcentaje de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por dilutor y raza.

Al análisis de efectos simples, no mostró diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) con ninguna de las fuentes de interacción, (ver Anexos V, XIV y XVII).

V. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se extraen las siguientes conclusiones:

- 1) Las características del semen puro de las razas evaluadas fueron: Para el color, blanco cremoso y aspecto denso acuoso; valores promedios de volumen 0.77 ml; pH, 6.57; motilidad masal, 4.58; motilidad individual progresiva, 87.23%; concentración espermática, 2743×10^6 esp/ml; porcentaje de espermatozoides vivos, 80.27%; y espermatozoides anormales, 1.59%.
- 2) Para la motilidad individual progresiva de los espermatozoides antes del congelamiento, se obtuvo mejor respuesta con el dilutor Ovine Freezing de 87.7%; asimismo la raza Assaf mostró mayor valor de 92.75% ($p > 0.05$).
- 3) Los promedios de motilidad individual progresiva de los espermatozoides después del congelamiento, fueron 57.6% para el dilutor Tris y 62.23% para el Ovine

Freezing, no mostrándose diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos.

- 4) Después del descongelamiento, se obtuvo una mejor respuesta para la motilidad individual progresiva de los espermatozoides con el dilutor Ovine Freezing de 62.23%, frente al 57.6% del Tris, mientras que para el factor raza, no se evidenciaron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$).
- 5) Los promedios de espermatozoides vivos después del congelamiento, fueron similares para ambos dilutores con 53.01% para el Tris y 53.63% para el Ovine Freezing. Igual tendencia muestra el factor raza con valores de 52.09% para la Blackbelly y 54.54% para la Assaf.
- 6) Fue factible el envasado de semen de ovinos en pajillas de 0.25 ml, el cual permitió la identificación, el almacenaje de cada dosis y sobre todo la congelación.

VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados y procedimientos realizados se recomienda:

- 1) El uso del dilutor Ovine Freezing en el procesamiento del semen de ovino para congelación, pues permite obtener mejores resultados en la motilidad individual progresiva y porcentaje de espermatozoides vivos, después del proceso.
- 2) Realizar estudios que permiten establecer la influencia de otros factores como la edad, niveles nutricionales de los carneros y la época del año, sobre la calidad seminal después del congelamiento.
- 3) Continuar el presente estudio evaluando la integridad de la membrana espermática (HOST) del semen después del congelamiento.
- 4) Continuar el presente estudio evaluando la fertilidad del semen congelado.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ASCUE, R.S. 1985. Espermatograma en carneros reproductores de diferentes edades en la zona altoandina - Pasco, Perú. Tesis UNDAC. Pasco, Peru.
- BALBIR, S., R. SHRI, S. DAYA. 1976 A note on studies on factors affecting seminal traits in Nali rams. Indian Journal Animal Science, 46:372.
- BEARDEN, J. H. 1980. Reproducción Animal Aplicada. Ed. El Manual Moderno. México.
- BORETTO, J.M.; GIBBONS, A.E.; BUNGE, M.M.; CUETO, M.I.; BIDINODT, F. 2002. "Calidad Seminal post descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos". Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 83 (4): 185-188. Bariloche Argentina.
- BORQUE, M. y A. SAGUEZ. 1992. Variaciones estacionales de los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim., Vol 7 N° 3, PP 235 - 240.
- BUXADDE, C. 1996. Zootecnia Bases de la Producción Animal. Ed. Mundi Prensa Tomo VIII.

- CALLE, R. 1976. Manual de Inseminación Artificial en Ovinos. 2^a. Edición UNA La Molina. Pp 44.
- CASEY, P. J.; GRAVANCE, C. G.; DAVIS, R. O.; CHABT, D. D.; LIU, I. K. M. 1997. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*, 47, 575-582.
- COLAS, G. 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal Reproduction Fertility*. 42: 277-285.
- CUETO, M.; GARCIA, J.; ARRIGO, J. GIBBONS, A. 2003. "Obtención, Procesamiento y Conservación del Semen Ovino" INTA - Bariloche- Argentina. (Comunicación Técnica PA 200).
- DAZA, A. 1997. Reproducción y Sistemas de Explotación del Ganado Ovino. Ed Mundi Prensa. España.
- EVANS, G. y MAXWELL, W. 1990. "Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goats". Editorial Butterworth / Co. Ltd., 88 Kingsway, London WC2B 6AB.
- FISER, P.S. y FAIRFULL, R.W. 1986. The effect of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluyents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Criobiology*. Vol. 23 (6): 518-24.

- GARCIA - GARCIA R.M.; DOMINGUEZ, V.; GONZALES - BULNES, A. VEIGA - LOPEZ, A. COCERO, M.J. 1992 "Efecto de la Concentración de sacarosa sobre la supervivencia post-descongelación de embriones ovinos en distintos estadios del desarrollo preimplantacional" ITEA 24(I): 229 - 281.
- GIBBONS, A., M. CUETO, M. WOLFF, J. ARRIGO, J. GARCIA. 2004. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Comunicación técnica PA 200. INTA. EEA Bariloche.
- GIL, J.; LUNDEHEIM N.; SODERQUIST L.; RODRIGUEZ M. H. 2002. "Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen". Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala. Sweden.
- HAFEZ, E.S.E. 1996. Reproducción e Inseminación Artificial de Animales. Ed. Interamericana.
- HAFEZ, E.S.E. 2002. Evaluación seminal. Reproducción e inseminación artificial en animales. Mc Graw Hill Interamericana 7° edición. México, 375-385.
- HOLY, L. 1983. Bases Biológicas de la Reproducción Bovina.

- INSKEEP, E. K. 1974. Artificial insemination and preservation of ram semen. Artificial Insemination in Sheep Bulletin 629. West Virginia University - Agricultural Experimental Station.
- LOPEZ, A. 1999. Sperm viability in ram semen diluted and stored in three different extenders. Acta Veterinaria Scandinava. Vol. 40 pp. 1-9.
- MADRID, N. B. y BOHADA E., 1993. Características de un buen reproductor bovino. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Zulia Maracaibo- Venezuela FONAIAP Divulga. N° 44. sep-dic.
- MAXWELL, W.C. y SALOMON, S. 2000. Storage of ram semen. Animal Reproduction Science. Vol. 62 pp 77 - 111.
- MCDONALD, L.E. y M.H. PINEDA. 1991. Endocrinología Veterinaria y Reproducción. Cuarta edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Impreso en México.
- MELLISHO, S., E.; GALLEGOS C., A.; ALVARADO M., E.; CABRERA P., P.; Y GARCIA G., R. 2004. "Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos". UNA La Molina. Boletín de divulgación.
- MERCK, CO; Inc, (1993). El Manual de merck veterinaria, cuarta edición, OCEANO CENTRUM, Barcelona España, 2092p.

OBSERVATORIO METEOROLÓGICO A.VON HUMBOLT - UNA LA MOLINA.
2007. Datos Meteorológicos Primer Trimestre 2007.

ORTIZ, H., A.; ANGULO M., B. y BERRUECOS V., D. 1999.
Motilidad y Fertilidad del Semen de Carnero
Descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura.
Vet. Méx. 30 (3) 265 - 268

PADRON, R; Alamo. L. y Cring, R. 1999 Three-dimensional
reconstruction of frozen_hydrated thick filaments from
tarantula muscle 43 rd Annual Meeting de la
biofysical Society. Baltimore 1999. Biophys. J. 76
(1): A34.

PANTOJA, A. C. 2007 Evaluación de dos dilutores en semen
congelado y su efecto en la fertilidad de ovejas,
inseminadas por vía laparoscópica en sierra central.
Tesis Post Grado. Universidad Nacional Agraria La
Molina. Perú.

PAULENZ, H.; SODERQUIST, L.; PEREZ-PE, R. y ANDERSEN, K.
2002. Effect of different extenders and storage
temperature on sperm viability of liquid ram semen.
Theriogenology Vol. 57 (2): 823-836.

PEREZ Y PEREZ, F. 1985 "Reproducción Animal: Inseminación
Artificial y Transplante de Embriones" Edit.
Científico Médica - Barcelona.

- PEREZ LOPEZ, C. 2001 "El Sistema Estadístico SAS" Instituto Complutense de Madrid. España.
- QUINN, P.J. y WHITE I.G. 1968. Osmotic SOC of Ram Spermatozoa. *J. Reprod Fertility*, 18, 375 - 377.
- QUISPE, P., E. 1998. Natalidad y Prolificidad en Ovejas Assaf y Assaf x Blackbelly Sincronizadas e Inseminadas con Semen Fresco y Congelado. Tesis para optar el grado de Magíster Scientiae UNA La Molina.
- RAMIREZ, C.A. 2002. Efecto de tres dilutores y tres tiempos de refrigeración en la motilidad individual del semen refrigerado de carneros BlackBelly. Tesis: Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima - Perú.
- SALOMON, S. y W.M.C. MAXWELL. 1995. Frozen storage of ram semen. I Processing freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*. 185 - 249.
- SAXENA, V. y TRIPATHI, S. 1986. Preservation of ram semen at room temperatura. *Animal Breeding Abstracts*. Vol. 54 N° 5.
- SODERQUIST, L., L. JANSSON, K. LARSSON, S. EINARSSON 1991. Spenn morphology and fertility in Al bulls. *J. Veto Med. A*. 38: 534-543.

- SUMAR, J. 1991 Fisiología Reproductiva del Macho y Manejo Reproductivo de los Animales. IVITA - UNMSM.
- SUTTIYOTIN, P. y THWAITES, C.J. 1992. Comparison of a swim-up technique with the Hamilton Thorn Motility Analyser for measurement of sperm velocity and motility. *Reprod. Fertil. Dev.* 4(2):153-60.
- SUMANO, H. y L. OCAMPO. 1997. Farmacología Veterinaria. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. México, p. 118 - 144.
- VISSER, D. 1975. Studies of factors affecting the survival and fertility of ram and boar spermatozoa following freezing in Tris - based diluents. *Aust. J. Biol. Sci.*
- WATSON, P.F. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg yolk lipoprotein. *Journal of Reproduction Science.* Vol. 37 (2): 156-157.
- WOELDER, H. 1991. Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. En: Boar semen preservation 11. Ed. Johnson L.A., Rath, D. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg. pp. 145-164.

ANEXOS

Anexo I: Composición de la yema de codorniz

CARACTERISTICAS	HUEVO DE CODORNIZ
Peso del huevo (g)	10.30
Albúmina (%)	56.54
Yema (%)	32.58
Cáscara (%)	9.85
COMPOSICIÓN:	
Calcio (%)	59.000
Fósforo (%)	220.00
Hierro (%)	3.80
Vitamina A (%)	300.00
Tiamina (%)	0.12
Riboflavina (%)	0.15
Niacina (%)	0.10
Energía (Kcal.)	158.00
Colesterol en yema (mg/g yema)	11.96

Fuente: Worlds Poultry Science Journal, Vol 46. November 1990.

Anexo II: Características seminales evaluadas de los carneros de la Raza Blackbelly y Assaf

Dilutor Tris

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volumen	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Blackbelly ELADIO	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	5	3470	79.82	1.13	86	80	50	51.83
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	5	2660	68.86	1.2	86	83	49	50.00
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.2	6.5	5	3425	77.92	1.08	86	83	50	50.80
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	2.1	6.5	5	2080	80.03	1.15	89	86	60	52.50
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	4	2000	69.9	1.24	89	86	59	51.60
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	4	2430	80.13	1.25	89	86	60	51.20
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.8	5	2060	71.5	1.87	83	80	56	50.28
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.9	5	2390	68.69	2.17	89	83	59	51.00
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	4	2990	80.71	2.15	86	86	53	51.00
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.6	6.5	4	2460	80.01	1.89	89	86	59	49.00
PROMEDIO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.96	6.57	4.6	2596.5	75.757	1.513	87.2	83.9	55.5	50.92

Dilutor Ovine Freezing

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volumen	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Blackbelly ELADIO	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	5	3200	82.96	1.02	93	93	60	57.30
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.9	6.5	5	3950	80.02	1.1	86	83	63	56.00
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.5	6.5	5	2800	80.88	1.35	89	83	63	53.90
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.9	6.5	3	2450	69.7	3.41	70	70	53	52.00
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.9	6.5	3.5	2460	78.53	2.6	93	90	60	52.00
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	4	2460	80.71	2.15	93	93	60	54.30
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.1	6.8	4	2200	68.86	1.2	80	80	60	51.29
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.3	6.9	4	2000	79.82	1.13	80	80	63	52.11
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.3	6.5	4	2400	80.02	1.1	86	86	63	50.53
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	5	2200	79.33	1.02	86	83	63	53.50
PROMEDIO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.91	6.57	4.25	2612	78.083	1.608	85.6	84.1	60.8	53.29

Dilutor Tris

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volumen	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Blackbelly EFRAIN	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	3.5	3200	79.91	1.94	83	80	60	59.22
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	3.5	3000	80.21	1.86	83	83	63	56.90
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	5	1800	79.04	1.95	83	83	63	50.99
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	5	1800	76.98	1.02	80	80	60	58.14
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	4	2800	78.28	1.98	80	80	60	50.10
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.4	6.5	3	1620	79.98	1.34	80	80	50	50.30
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.8	4.5	1900	79.93	1.48	80	80	59	52.14
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.9	4.5	1600	80.25	1.55	83	80	53	48.12
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	4	1750	79.33	1.02	86	83	56	46.16
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	4	1700	80.12	1.05	86	86	56	50.60
PROMEDO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.61	6.57	4.1	2117	79.403	1.519	82.4	81.5	58	52.258

Dilutor Ovine Freezing

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volumen	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Blackbelly EFRAIN	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	5	2400	79.91	1.94	83	80	60	51.60
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	4	2200	80.21	1.86	83	83	63	50.60
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	4	2000	79.04	1.95	83	83	63	59.86
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	4	2000	76.98	1.02	80	80	60	50.90
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	4	2000	78.28	1.98	80	80	60	50.60
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	4	1520	69.7	3.41	80	80	50	52.60
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.3	6.8	3	2600	80.25	1.55	80	80	59	51.23
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.9	3	2600	79.9	1.95	80	80	59	50.14
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	4	2800	80.01	1.99	83	83	60	50.23
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	4	1800	79.99	1.87	86	83	60	51.10
PROMEDIO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.58	6.57	3.9	2192	78.427	1.952	81.8	81.2	59.4	51.886

Dilutor Tris

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volumen	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Assaf ANDRES	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	5	3250	82.02	1.97	89	86	53	50.23
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.9	6.5	5	3250	80.71	1.87	89	83	59	59.60
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	5	3000	81.06	1.02	86	80	59	50.80
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	5	3000	82.35	1.48	86	83	59	56.90
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.1	6.5	5	3000	84.49	1.43	89	89	69	50.10
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.2	6.5	5	3005	83.1	1.14	89	89	69	51.20
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.8	5	3100	81.14	1.28	89	89	63	54.20
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.0	6.9	5	3100	82.24	1.94	89	89	59	53.26
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	5	3020	83.1	1.99	86	86	60	54.13
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	5	3200	81.09	1.73	86	86	60	52.30
PROMEDIO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.81	6.57	5	3092.5	82.13	1.585	87.8	86	61	53.27

Dilutor Ovine Freezing

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volumen	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Assaf ANDRES	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.9	6.5	5	2400	85.98	0.94	96	96	63	51.38
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.3	6.5	5	2900	84.4	0.99	93	93	63	52.30
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.5	5	2900	82.2	1.12	93	93	63	55.93
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	5	3200	84.1	1.14	96	93	60	53.80
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	5	3100	83.08	0.97	89	89	63	59.80
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.4	6.5	4.5	3000	82.96	1.17	93	93	63	52.18
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.8	5	3490	81.14	1.38	93	93	66	50.32
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.9	5	3490	80.02	1.42	93	93	66	54.26
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.0	6.5	5	3000	82.16	0.99	93	93	63	55.20
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.2	6.5	5	3400	81.27	0.78	93	90	63	53.14
PROMEDIO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.65	6.57	4.95	3088	82.731	1.09	93.2	92.6	63.3	53.83

Dilutor Tris

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volumen	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Assaf LINO	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.2	6.5	5	2120	79.82	1.13	86	86	59	56.49
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.2	6.5	5	3420	79.88	1.99	86	80	59	57.12
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	4	3420	84.5	1.38	89	86	56	58.45
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	5	3500	83.11	2.89	86	83	56	55.14
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.7	6.5	5	3200	82.03	2.01	86	83	59	57.00
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.2	6.5	5	3100	81.23	2.35	89	89	40	55.23
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	1	6.8	5	3050	83.94	2.14	86	86	59	55.28
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.9	5	3100	84.1	2.15	86	86	56	57.59
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	5	3000	82.09	1.99	86	86	56	49.12
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	5	3200	81.16	1.78	86	86	59	54.26
PROMEDIO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.96	6.57	4.9	3111	82.186	1.981	86.6	85.1	55.9	55.568

Dilutor Ovine Freezing

Bloque	N° Mts.	Color	Aspecto	Volume n	pH	Mot. Masal	Concent.	% Vivos	Anor	Mot. Ind. %	Mot. ant. cong. %	Mot. desp Cong. %	% V. desp Cong.
Assaf LINO	1	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	5	2120	83.02	0.98	93	93	63	52.10
	2	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	5	3540	81.14	0.94	93	93	63	56.80
	3	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.5	4	3540	83.17	1.11	93	93	63	59.30
	4	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.4	6.5	5	3200	82.15	1.1	96	96	66	58.20
	5	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.5	6.5	5	3250	83.08	1.25	96	96	66	59.80
	6	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.7	6.5	5	3200	84.92	1.88	89	89	69	56.30
	7	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.8	6.8	5	3200	86.6	1.75	93	93	69	55.14
	8	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.6	6.9	5	2900	83.92	1.66	93	90	66	51.20
	9	Bl.cremoso	Denso acuoso	0.2	6.5	5	3000	84.12	1.57	93	93	66	55.23
	10	Bl.cremoso	Denso acuoso	1.2	6.5	5	3400	82.11	1.95	93	93	63	50.90
PROMEDIO		Bl.cremoso	Denso acuoso	0.66	6.57	4.9	3135	83.423	1.419	93.2	92.9	65.4	55.497

Anexo III: Análisis de varianza de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por raza y dilutor.

The GLM Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
bloque	2	1 2
Trata	2	OVINE TRIS
Raza	2	ASSAF BBELLY

Number of observations 80

Dependent Variable: Mot. individual progresiva del semen antes del congelamiento

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trata	1	0.07320502	0.07320502	28.13	0.0131 *
Raza	1	0.18924205	0.18924205	72.73	0.0034 **
Trata*Raza	1	0.06663438	0.06663438	25.61	0.0149 *

Anexo IV: Análisis de varianza de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por raza y dilutor.

Dependent Variable: Mot. individual progresiva del semen después del congelamiento

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trata	1	0.04446695	0.04446695	6.73	0.0808 N.S.
Raza	1	0.01875034	0.01875034	2.84	0.1907 N.S.
Trata*Raza	1	0.00349048	0.00349048	0.53	0.5199 N.S.

Anexo V: Análisis de varianza de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por raza y dilutor.

Dependent Variable: % de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Trata	1	0.00077188	0.00077188	0.57	0.5038 N.S.
Raza	1	0.01209236	0.01209236	8.99	0.0578 N.S.
Trata*Raza	1	0.00028100	0.00028100	0.21	0.6787 N.S.

Anexo VI: Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por tratamiento.

Duncan's Multiple Range Test for Mot. individual progresiva del semen antes del congelamiento

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	3
Error Mean Square	0.002602
Number of Means	2
Critical Range	.03630

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Trata
A	1.22307	40	OVINE *
B	1.16257	40	TRIS *

Anexo VII: Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por tratamiento.

Duncan's Multiple Range Test for Mot. individual progresiva del semen después del congelamiento

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	3
Error Mean Square	0.006608
Number of Means	2
Critical Range	.05785

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Trata
A	0.90920	40	OVINE N.S.
A	0.86205	40	TRIS N.S.

Anexo VIII: Análisis de comparación de medias (Duncan) de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por tratamiento.

Duncan's Multiple Range Test for % de espermatozoides vivos del semen después del congelamiento

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	3
Error Mean Square	0.001345
Number of Means	2
Critical Range	.02610

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Trata
A	0.821774	40	OVINE N.S.
A	0.815562	40	TRIS N.S.

Anexo IX: Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por raza.

Duncan's Multiple Range Test for Mot. individual progresiva del semen antes del congelamiento

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	3
Error Mean Square	0.002602
Number of Means	2
Critical Range	.03630

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Raza
A	1.24145	40	ASSAF *
B	1.14418	40	BBELLY *

Anexo X: Análisis de comparación de medias (Duncan) de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por raza.

Duncan's Multiple Range Test for Mot. individual progresiva del semen después del congelamiento

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	3
Error Mean Square	0.006608
Number of Means	2
Critical Range	.05785

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Raza
A	0.90093	40	ASSAF N.S.
A	0.87031	40	BBELLY N.S.

Anexo XI: Análisis de comparación de medias (Duncan) del % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por raza.

Duncan's Multiple Range Test for % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	3
Error Mean Square	0.001345
Number of Means	2
Critical Range	.02610

Means with the same letter are not significantly different.

Duncan Grouping	Mean	N	Raza
A	0.830963	40	ASSAF N.S.
A	0.806374	40	BBELLY N.S.

Anexo XII: Análisis de efecto simple de la motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por tratamiento.

Least Squares Means

Standard Errors and Probabilities Calculated Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Trata*Raza Effect Sliced by Trata for Mot. individual prog. del semen antes del congelamiento

Trata	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
OVINE	1	0.240233	0.240233	92.32	0.0024 **
TRIS	1	0.015644	0.015644	6.01	0.0915 N.S.

Anexo XIII: Análisis de efecto simple de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por tratamiento.

Least Squares Means

Standard Errors and Probabilities Calculated Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Trata*Raza Effect Sliced by Trata for Mot. individual proa. del semen después del congelamiento

Trata	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
OVINE	1	0.019210	0.019210	2.91	0.1867 N.S.
TRIS	1	0.003030	0.003030	0.46	0.5468 N.S.

Anexo XIV: Análisis de efecto simple de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por tratamiento.

Least Squares Means

Standard Errors and Probabilities Calculated Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Trata*Raza Effect Sliced by Trata for % espermatoz. vivos del semen después del congelamiento

Trata	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
OVINE	1	0.004343	0.004343	3.23	0.1702 N.S.
TRIS	1	0.008030	0.008030	5.97	0.0922 N.S.

Anexo XV: Análisis de efecto simple de motilidad individual progresiva del semen antes del congelamiento por raza.

Least Squares Means
Standard Errors and Probabilities Calculated Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Trata*Raza Effect Sliced by Raza for Mot. individual prog. del semen antes del congelamiento

Raza	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
ASSAF	1	0.139762	0.139762	53.71	0.0052 **
BBELLY	1	0.000077226	0.000077226	0.03	0.8742 N.S.

Anexo XVI: Análisis de efecto simple de la motilidad individual progresiva del semen después del congelamiento por raza.

Least Squares Means
Standard Errors and Probabilities Calculated Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Trata*Raza Effect Sliced by Raza for Mot. individual prog. del semen después del congelamiento

Raza	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
ASSAF	1	0.036437	0.036437	5.51	0.1005 N.S.
BBELLY	1	0.011520	0.011520	1.74	0.2784 N.S.

Anexo XVII: Análisis de efecto simple de % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento por raza.

Least Squares Means
Standard Errors and Probabilities Calculated Using the Type III MS for bloque(Trata*Raza) as an Error Term

Trata*Raza Effect Sliced by Raza for % espermatozoides vivos del semen después del congelamiento

Raza	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
ASSAF	1	0.000060717	0.000060717	0.05	0.8454 N.S.
BBELLY	1	0.000992	0.000992	0.74	0.4536 N.S.