

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**“EFECTO DEL FACTOR DILUTOR Y RAZA EN LA INTEGRIDAD DE LA
MEMBRANA ESPERMÁTICA Y ACROSOMAL EN SEMEN
CRIOCONSERVADO DE CARNEROS”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. M.V.Z. PATRICIA VARGAS CAHUANA

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PUNO – PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

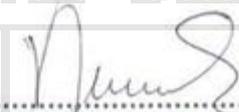
*"EFECTO DEL FACTOR DILUTOR Y RAZA EN LA INTEGRIDAD DE LA
MEMBRANA ESPERMÁTICA Y ACROSOMAL EN SEMEN CRIOCONSERVADO
DE CARNEROS"*

TESIS

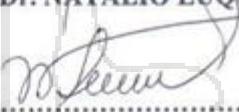
PRESENTADO PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO
VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE:


.....
Dr. NATALIO LUQUE MAMANI

PRIMER MIEMBRO


.....
Mg. Sc. BILO WENCESLAO CALSÍN CALSÍN

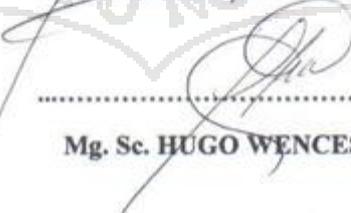
SEGUNDO MIEMBRO


.....
Mg. Sc. URI HAROLD PÉREZ GUERRA

DIRECTOR DE TESIS


.....
MVZ. ROLANDO G. ALENCASTRE DELGADO

ASESOR DE TESIS


.....
Mg. Sc. HUGO WENCESLAO DEZA CALSÍN

ÁREA : Reproducción animal

TEMA : Conservación de gametos

DEDICATORIA

A Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente; por darme las virtudes y la fortaleza necesaria para salir siempre adelante.

A mi papito, Francisco Vargas Sacaca y mi mamita, Emilia Cahuana Pinto, que con su amor, sacrificio y comprensión lo dieron todo por mí para poder lograr mis objetivos y metas.

A mis hermanos Marco Antonio, Luis Francisco, Miguel Angel y Harol Rafael, por su cariño, cuidado y apoyo incondicional, por los consejos y regaños, solo quieren que de lo mejor de mi.

A aquellas personas que formaron parte de mi vida en algún momento, que me apoyaron y me brindaron su amistad durante mi vida y periodo de estudio.

Patricia Vargas Cahuana

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis MVZ. Rolando Alencastre Delgado por su permanente disposición, generosidad y constante guía profesional para la concreción de este trabajo de investigación. Por creer en mí persona por su apoyo y confianza.

A mi asesor de tesis Mg. Sc. Hugo Deza Calsin, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia profesional en un marco de confianza, afecto y amistad; por su inmensa paciencia. Porque este trabajo de investigación no se habría llevado a cabo sin su apoyo incondicional.

Al director del CIP-Chuquibambilla Dr. Natalio Luque Mamani por haberme brindado las facilidades para poder realizar el presente trabajo de investigación.

A mis docentes de la Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia por todos los conocimientos compartidos no solo en lo profesional sino también en lo ético y moral.

A mi jurado revisor de tesis por sus aportes y correcciones que fueron de mucha utilidad para la redacción del presente trabajo, por su disponibilidad y apoyo gracias

A Raquelita y Katisita por brindarme su amistad y cariño, por escucharme y aconsejarme por su apoyo infinito, gracias hermanitas.

A mis amigos y compañeros, Rómulo, Flor, Luis, Mariela que han sido un gran apoyo y doy gracias por su ánimo y colaboración. A aquellos amigos (as) que compartieron conmigo todos los momentos buenos y malos, por su impulso, consejos y compañía que me dieron fortaleza y el aliento para seguir adelante.

A los trabajadores del CIP-Chuquibambilla por su colaboración y amabilidad.

Patricia Vargas Cahuana

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. COLECCIÓN DE SEMEN	3
2.1.1. Estimulación previa del carnero	3
2.1.2. Colección de semen propiamente dicha	3
2.1.3. Intervalos de colección de semen	4
2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE CARNERO	4
2.2.1. Plasma Seminal	5
2.2.2. Influencia de la época reproductiva	5
2.3. DILUCIÓN	6
2.3.1. Dilutores usados en la congelación de semen	7
2.3.1.1. Solución tris-yema	8
2.3.1.2. Agua de coco	9
2.3.1.3. La leche	11
2.3.2. Importancia y propiedades de los aditivos para la congelación de semen	12
2.4. REFRIGERACIÓN	13
2.5. CRIOPRESERVACION DE SEMEN	14
2.5.1. Efecto de la criopreservación en los espermatozoides	16
2.5.1.1. Efecto sobre el metabolismo espermático	17
2.5.1.2. Efecto sobre la ultra estructura espermática	19
2.6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL POST-DESCONGELAMIENTO	20
2.6.1. Características de la membrana espermática	20
2.6.1.1. Test de endosmosis celular (Jeyendran <i>et al.</i> , 1992)	22
2.6.2. Características del acrosoma del espermatozoide	25
2.6.2.1. Tinción triple (eosina-nigrosina-giemsa) (Tamuli y Watson, 1994)	26
III. MATERIAL Y MÉTODOS	30
3.1. AMBITO DE ESTUDIO	30
3.2. MATERIAL DE ESTUDIO	30
3.2.1. Animales	30
3.2.2. Manejo de los carneros	30
3.3. METODOLOGÍA DE TRABAJO	31
3.3.1. Manejo el semen	31
3.3.1.1. Colección de semen	31
3.3.2. Dilución	32
3.3.2.1. Preparación de los dilutores	32
3.3.2.2. Técnica de dilución	34
3.3.3. Refrigeración	35

3.3.4.	Fase de equilibrio	35
3.3.5.	Etiquetado de las pajillas	35
3.3.6.	Envasado de semen en pajillas.....	35
3.3.7.	Congelación de semen	36
3.3.8.	Descongelación	36
3.3.9.	Evaluación del semen descongelado.....	37
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1.	INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA EN SEMEN REFRIGERADO.....	41
4.1.1.	Efecto del dilutor sobre la integridad de membrana celular en semen refrigerado	41
4.1.2.	Efecto de la raza sobre la integridad de membrana celular en semen refrigerado	42
4.1.3.	Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre la integridad de membrana celular en semen refrigerado.....	43
4.2.	ACROSOMA EN SEMEN REFRIGERADO	44
4.2.1.	Efecto del dilutor sobre el acrosoma en semen refrigerado.....	44
4.2.2.	Efecto de la raza sobre el acrosoma en semen refrigerado	46
4.2.3.	Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre el acrosoma en semen refrigerado	47
4.3.	INTEGRIDAD DE MEMBRANA EN SEMEN DESCONGELADO	48
4.3.1.	Efecto del dilutor sobre la integridad de membrana celular en semen descongelado	48
4.3.2.	Efecto de la raza sobre la integridad de la membrana espermática en semen descongelado	50
4.3.3.	Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre la integridad de membrana celular en semen descongelado.....	52
4.4.	ACROSOMA EN SEMEN DESCONGELADO	53
4.4.1.	Efecto del dilutor sobre la integridad del acrosoma en semen descongelado	53
4.4.2.	Efecto de la raza sobre el acrosoma en semen descongelado	55
4.4.3.	Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre el acrosoma en semen descongelado	55
V.	CONCLUSIONES	57
VI.	RECOMENDACIONES	58
VII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	59
VIII.	ANEXOS	69

RESUMEN

El estudio fue diseñado para evaluar la integridad de la membrana espermática y acrosoma en semen de carneros de tres razas (Criollo, Corriedale y Texel) expuestos a tres dilutores (Tris, agua de coco y leche UHT), al momento de la refrigeración (5°C) y descongelación; la prueba de endosmosis fue utilizada para evaluar la integridad de la membrana espermática y la tinción triple para evaluar la integridad de acrosoma. Los resultados obtenidos a la refrigeración y descongelación para integridad de membrana para el efecto dilutor fueron 67.33%, 49.93%, 46.93% y 34.47%, 24.73%, 20.93% para el dilutor tris, agua de coco y leche UHT respectivamente y para el efecto raza se obtuvo 59.33%, 56.87%, 48.00% y 29.13%, 21.73%, 29.27% en semen de carneros Criollo Corriedale y Texel respectivamente. En el acrosoma en semen refrigerado y descongelado para el efecto del dilutor se obtuvo 50.60%, 44.27%, 48.93% y 24.33%, 24.00%, 28.20% para el dilutor tris, agua de coco y leche UHT respectivamente y para el efecto raza se obtuvo 39.73%, 55.47%, 48.60% y 20.93%, 29.53%, 26.07% en semen de carneros criollo Corriedale y Texel respectivamente. Para las interacciones solo se observó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) para la interacción agua de coco-corriedale con un 56.80% en acrosoma en semen refrigerado y para la interacción tris-Texel con un 45.00% de espermatozoides con membrana espermática intacta en semen descongelado. Concluyendo así que el tris brinda la mejor protección sobre la membrana espermática y el acrosoma a la refrigeración que persiste hasta la descongelación, respecto a la raza se podría decir que los espermatozoides del Corriedale se comportarían mejor si serían más tolerantes al proceso de refrigeración y congelación que de los del criollo y Texel.

Palabras clave: carnero, espermatozoides, integridad de membrana espermática, integridad de acrosoma

I. INTRODUCCIÓN

Las barreras geográficas para el apareamiento de los animales durante mucho tiempo redujeron las posibilidades del transporte de semen, sin embargo, en la actualidad la inseminación artificial ha logrado resolver este problema y es la herramienta mas ampliamente aplicada para utilizar extensivamente el semen congelado de reproductores genéticamente superiores, es así que la congelación o criopreservación de semen ha sido la mas invaluable técnica de preservación de semen ovino, en el manejo reproductivo. Esta técnica permite incrementar el número de hembras que pueden ser fertilizadas con un solo eyaculado. No obstante, sus resultados hasta ahora tienden a ser insatisfactorios en ovinos, debido a la baja tasa de fertilidad, este hecho podría deberse a los daños ocasionados en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, principalmente en la membrana espermática y acrosomal del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables acortando su tiempo de vida en el tracto reproductivo de la hembra; por lo tanto tendrían una menor oportunidad de poder fecundar el ovocito (Sandoval, 2005)

Estos daños producidos en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación podrían ser prevenidos parcialmente, usando dilutores adecuados con agentes crioprotectores apropiados, que puedan mejorar la capacidad de preservación y fecundación del semen congelado de carnero, que es uno de los principales temas de investigación, mas aun en nuestra zona, en la que, no esta bien definido en la especie ovina, por lo cual se vienen desarrollando ensayos con diferentes dilutores, así existen algunos trabajos con agua de coco y leche en sus diferentes presentaciones; que buscan entender el efecto protector que estos puedan tener sobre la célula espermática del ovino. Así mismo, existen publicaciones que establecen el efecto de la raza de la hembra, sobre la tasa de fertilidad después de la inseminación artificial, observándose

mejores tasas de concepción en algunas razas laneras o aquellas productos de cruce y las menores en las razas carniceras; la raza del carnero también podrían tener un efecto sobre ello, no obstante, la mayoría de los estudios sobre congelación de semen ovino, se han realizado sin observar este efecto sobre las características del semen (Boiso, 2001).

Se conoce además que para determinar la calidad seminal se aplican frecuentemente pruebas *in vitro* (volumen, concentración, vitalidad, morfología, motilidad) en su mayoría de valoración subjetiva que no están bien relacionadas con la fertilidad del animal, y muchas veces sobre estiman el potencial fecundante del macho. Ante esto la evaluación de integridad de la membrana espermática y acrosomal son valoraciones objetivas que reflejan la viabilidad espermática, ya que nos dan la real capacidad fertilizante del espermatozoide (Januskauskas *et al.*, 2000).

Con los antecedentes descritos anteriormente, se propusieron los siguientes objetivos, en el presente trabajo de investigación.

Es evaluar el efecto del dilutor y la raza sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen refrigerado a 5°C.

Evaluar el efecto del dilutor y la raza sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen descongelado.

Evaluar el efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre la integridad de la membrana espermática y acrosomal en semen refrigerado a 5°C y descongelado.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. COLECCIÓN DE SEMEN

De los métodos disponibles para la recolección del semen del carnero. El más usado universalmente es la vagina artificial, con el cual se pretende simular la temperatura y presión a su vez se recomienda lubricar la vagina artificial para obtener los mejores resultados en cuanto a volumen y concentración de espermatozoides. El procedimiento ideal debe ser inocuo, sin contaminación, estar protegido contra el shock térmico y de la luz solar (Curry, 2000).

2.1.1. Estimulación previa del carnero

A efectos de lograr un buen eyaculado es altamente recomendable la excitación previa del carnero. Las montas falsas realizadas aumentan la cantidad del semen en cuanto a volumen, concentración espermática y motilidad, siendo de esta manera la segunda eyaculación la que da la mejor respuesta (Galina *et al.*, 1988).

2.1.2. Colección de semen propiamente dicha

Se realiza haciendo uso de la vagina artificial, este método es el método mas usado por que se asemeja al tracto genital de la oveja, que proporciona el estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) para la reacción del pene del macho y que son igualmente necesarios para producir la eyaculación, con este método se colecta en forma rápida y con limpieza el semen de carnero y se puede coleccionar varias veces al día (Pérez, 2008).

La temperatura de la vagina artificial antes de la colección de semen en ovinos será de 42-45° C y puede ser chequeado por inserción de un termómetro limpio. La extracción del semen de carnero deberá hacerse haciendo saltar el carnero sobre una oveja en celo, el operador se situara a un lado del cuerpo del animal de esta manera

podrá desviar oportuna y suavemente el pene del carnero hacia el interior de la vagina artificial, para lograr la recolección del material seminal (Colas *et al.*, 1980).

2.1.3. Intervalos de colección de semen

En carneros adultos es recomendable coleccionar 1 a 2 eyaculados diariamente, en los cuales debería obtenerse un volumen de semen mínimo de 0.8 ml y un máximo de 2.0 ml que debería ser de consistencia cremosa, en animales jóvenes la frecuencia de colección será menor respecto de los carneros mayores (Quispe, 2011). Los ritmos de recogida más frecuentemente empleado en la especie ovina, para la realización de experiencias de larga duración, son de un eyaculado en una semana o bien de dos eyaculado en una semana (Colas *et al.*, 1980).

2.2. CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE CARNERO

El semen está conformado por una fracción líquida o plasma seminal y una fracción celular que la conforman los espermatozoides (Garner y Háfez, 2000). A partir de diversos reportes (Cuadro 1), se tiene que en promedio el carnero tiende a eyacular una cantidad de semen que oscila entre 0.75 a 2 mL., conteniendo una alta concentración de espermatozoides, los cuales son altamente viables.

Cuadro 1: características del semen ovino

Autor y año	Volumen (mL)	Concentración (millones/mL)	Móviles (%)	Vivos con acrosoma (%)	Integridad de membrana (%)
Garner y Háfez, 2000	0,8 - 1,2	2000-3000	60-80		
Paulenz y col., 2002	0,75 - 2,0	> 3500	> 70		
Gil y col., 2003 ^a	0,75 - 2,0	> 2500	> 70		
Santiani y col., 2004			80-95	83-95	70-90

FUENTE: (Ruiz, 2005)

2.2.1. Plasma Seminal

El plasma seminal ovino está compuesto por las secreciones provenientes de la próstata y de las glándulas vesiculares y bulbouretrales. Durante la eyaculación, dichas secreciones son vertidas hacia la uretra generándose así una mezcla con la suspensión de espermatozoides y las secreciones ampulares del conducto deferente (Garner and Hafez, 2000).

La importancia funcional del plasma seminal es cuestionable, dado que es posible inducir la preñez por inseminación empleando espermatozoides colectados del epidídimo. Sin embargo, el plasma seminal sí muestra ser un componente esencial en el apareamiento natural porque actúa como portador y protector de los espermatozoides (Garner and Hafez, 2000), situación que es más importante en el apareamiento de la oveja, en la cual el eyaculado es depositado en la vagina.

El mayor constituyente del plasma seminal es el agua (cerca del 75%) y usualmente es un fluido neutral e isotónico, con un pH cercano a 7.0 y rico en moléculas tanto orgánicas como inorgánicas encargadas de nutrir y proteger a los espermatozoides (Evans and Maxwell, 1990). Dentro de todos los componentes del plasma seminal ovino la fructosa y el ácido cítrico vienen a ser los componentes considerados de mayor importancia en los rumiantes.

2.2.2. Influencia de la época reproductiva

El plasma seminal posee una gran variedad de proteínas, algunas de las cuales se adosan a la superficie de los espermatozoides eyaculados contribuyendo a su capacitación, mejorando la viabilidad y motilidad, además de aumentar su resistencia al golpe de frío, estabilizando la membrana espermática de los espermatozoides congelados. La concentración de estas proteínas varía mucho entre un macho y otro, pudiendo también variar entre razas aumentando o disminuyendo

dependiendo de los factores ambientales tales como la temporada de colección, temperatura, nutrición, el estrés, etc. Uno de los factores que mayormente influye en la producción de semen de carnero es el fotoperiodo; durante la estación reproductiva hay una mejor calidad espermática; así como en las hembras que aseguran que la actividad folicular es mejor en los machos la espermatogénesis alcanza su máximo en otoño (Fernández *et al.*, 2009) también la cantidad de espermatozoides producidos por el testículo, testosterona plasmática por tanto la calidad seminal; el parénquima testicular esta constituido en su mayor parte por tejido espermato genico y las variaciones estacionales sobre la espermatogenesis se ven reflejadas en un aumento tanto en el tamaño del testículo. es por ello que hay varios autores que recomiendan hacer la recogida de semen en esta época del año, sobre todo si el mismo se va a usar almacenaje criopreservado. (Domínguez *et al.*, 2008), (Marti *et al.*, 2007), también aconseja que la recolección de semen para congelar debe hacerse en otoño, ya que la motilidad espermática es mejor (Melendez, 2014).

2.3. DILUCIÓN

La dilución permite aumentar el volumen total de un eyaculado, asegurar un medio favorable para la supervivencia de los espermatozoides in Vitro, conservando su capacidad fertilizante y realizar a partir de un solo eyaculado la inseminación de un número elevado de hembras (Salisbury y Van dermark, 1978).

La dilución otorga la posibilidad de crear condiciones de equilibrio osmótico y fisiológico adecuados, lograr la optima supervivencia de los espermatozoides in vitro, asegurar una prolongada capacidad de fecundación, mantener integras las estructuras morfológicas y en particular las protoplasmáticas de superficie que envuelven al espermatozoide sobre todo su porción apical, limitar al mínimo posible las actividades

metabólicas supuestamente reducidas a su fase catabólica (Sorensen, 1981). Los diluyentes apropiados proporcionan a los espermatozoides nutrientes, medio buffer o amortiguador para evitar los cambios de pH y un ambiente isotónico, además protegen a los espermatozoides del shock del frío y favorecen su conservación así como también protegen de las injurias en la congelación cuando se congela el semen (Evans and Maxwell, 1990).

Los dilutores de semen contienen Tris (Hidroximetilaminometano) o citrato como buffers, glucosa o fructosa como fuente de energía, y 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 usándose generalmente la yema de huevo, y para el congelamiento es generalmente utilizado el glicerol, todo ello con el objetivo de evitar lesiones de la membrana celular durante la congelación (Hafez, 2000). Existen otros dilutores comerciales, como el Laiciphos (IMV, Francia) para diluir semen fresco, Ovine Fresh para semen refrigerado y Ovine Freezing para la congelación de semen (Santiani, 2003).

2.3.1. Dilutores usados en la congelación de semen

Los dilutores o diluyentes tienen como objeto aumentar el volumen y mantener una concentración espermática adecuada para dar servicio al mayor número posible de hembras. El título de dilución depende tanto del volumen de inseminación (varía en función del tipo de inseminación: vaginal, cervical, intrauterina) como de la concentración de espermatozoides móviles con la que queremos inseminar, ya que independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles está correlacionado con la fertilidad (Evans and Maxwell, 1990).

Los espermatozoides viven fuera del organismo solamente durante un tiempo limitado. Precisamente por esto, el semen colectado que se va a utilizar para

inseminar deberá proceder a su dilución lo más pronto posible. Las soluciones buffer que conforman la mayor parte del diluyente seminal poseen un doble rol: uno es neutralizando el ácido láctico producido por la actividad metabólica de los espermatozoides (evitando los cambios de pH). El otro es proveyendo una correcta concentración del buffer conformando un medio isotónico para el semen. Las sales utilizadas deben ser no tóxicas. Las siguientes son cuatro soluciones que cumplen con estos requerimientos: solución buffer fosfatado, buffer citrato, buffer tris y la leche entera o descremada (Tribulo, 2009).

2.3.1.1. Solución tris-yema

El hidroximetilaminometano (Tris) es muy conocido por su acción buffer y la 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 y penetra la membrana plasmática de las células espermáticas para actuar como buffer intracelular por su acción osmótica, tiene también poder neutralizante de los productos de desecho metálico, en particular del ácido láctico, siendo entonces un dilutor recomendado para su uso en la dilución del semen de ovinos (Evans y Maxwell, 1990).

Cuadro 2: Composición del dilutor Tris para la congelación de semen

Ingrediente	Cantidad
Tris	3.634(g)
Glucosa	0.500(g)
Acido Cítrico	1.990(g)
Penicilina	100 000(UI)
Estreptomina	100(mg)
Yema de huevo	15(mL)
Glicerol	5(mL)
Agua bidestilada	100(mL)

FUENTE: (Evans y Maxwell, 1990).

La solución Tris – yema de huevo se prepara añadiendo 20% de yema de huevo fresca a la solución amortiguadora Tris, se añaden antibióticos a las concentraciones recomendadas. Se ha visto que el glicerol a 6% es de beneficio, aun cuando el semen se almacene a 5° C. El amortiguador Tris también tiene una ventaja adicional, pues permite añadir el glicerol en el diluyente inicial evitando así la demora en añadir el glicerol a 5°C después que se han enfriado los espermatozoides. La mayor parte de los otros diluyentes requiere de este último procedimiento. El tiempo de equilibrio no parece ser tan crítico con el diluyente Tris-yema como lo es con otros diluyentes (Bearden y Fuquay, 1997).

2.3.1.2. Agua de coco

El coco (*Cocos nucifera*), perteneciente a la familia Cocosidea, madura a los 6 meses de edad y a partir de este momento presenta en su contenido agua líquido endospermico solución natural y estéril ligeramente acida, compuesta de soluciones ácidas y estériles, como aminoácidos, azúcares, sales, proteínas, vitaminas, minerales grasas neutras, factores de crecimiento y muy pocos fosfolípidos según lo

mencionan Nunes *et al.* (1994). En la fase de maduración inicial, el agua de coco presenta una osmolaridad entorno de 500 miliosmoles y un pH de 4.5 (Nunes y Fernández, 2001).

El punto de partida inició cuando fue aislada del agua de coco una molécula perteneciente al grupo de las auxinas esto es el **ácido 3-indol-acético (IIP)**, la cual le confiere a los espermatozoides de diferentes especies un incremento en la motilidad y porcentaje de espermatozoides vivos, aumentando también la tasa de fertilidad, además de permitir su conservación durante periodos más largos (FUNCAP, 1999).

Los diluyentes con base en agua de coco han sido ampliamente estudiados y utilizados en el noroeste brasileño, debido a su excelente eficacia y bajo costo (Nunes, 1998). Se realizó una evaluación *in vitro* de semen de ovinos, después de realizada la recolección, cada eyaculación fue dividida en dos porcentajes iguales, siendo una diluida en agua de coco con osmolaridad y pH corregidos y la otra fue diluida en leche en polvo glucosado, concluyendo que los diluyentes utilizados demostraron eficiencia como medio de dilución para semen de ovinos (Silva, 1990).

La habilidad de agua de coco en la sobrevivencia espermática, es atribuida en gran parte a una inhibición reversible del ácido láctico del esperma, manifestado por una disminución en el metabolismo celular, en términos de respiración, glucólisis anaerobia y motilidad (Norman *et al.*, 1958). Por otra parte, el uso de este diluyente incrementa la fertilidad en comparación con otros convencionales, además de que aumenta el número de nacimientos de crías del sexo femenino, lo cual indica un favorecimiento a los cromosomas X y un detrimento a los cromosomas Y de los espermatozoides (Nunes, 1986).

2.3.1.3. La leche

La leche específicamente de vaca, es utilizada para diluir semen de diferentes especies (Foote, 2002; Salamon y Maxwell, 2000). La leche de vaca es un diluyente ampliamente utilizado, puede emplearse tanto entera, descremada, **UHT** o en polvo para reconstituir, siendo esta última la más universal (Watson, 2000). Existen diluyentes a base leche descremada en polvo como Kenney (Hamilton Research Inc, USA) o E-Z-Mixin (ARS, USA) los que son usados comúnmente para la dilución del eyaculado para la inseminación artificial, tanto con semen fresco y refrigerado, para mantener bien la motilidad espermática y la fertilidad. Además de esto, son de preparación simple y de bajo costo (Dinatolo, 2011).

Las proteínas de la leche actúan como amortiguadores contra cambios de pH y como agentes quelantes contra cualquier metal pesado presente (Salamon y Maxwell, 2000). La caseína, la principal proteína de la leche, también tiene un efecto antioxidante (Foote, 2002), y por tanto confiere protección a los espermatozoides durante la reducción de temperatura. Sin embargo, otra proteína presente en la leche, la lactenina, es tóxica para los espermatozoides (Salamon y Maxwell, 2000), es por lo que se recomienda calentar la leche previamente a temperaturas superiores a los 90°C, lo cual inactiva a esa proteína (Salamon y Maxwell, 2000). La leche puede ser usada en forma entera, reconstituida o descremada (Gil *et al.*, 2003).

El uso de leche tratada con altas temperaturas (UHT) es muy recomendado por su condición de esterilidad y por no requerir calentamiento previo (Salamon y Maxwell, 2000). Algunos estudios indican que no existen diferencias entre utilizar leche entera pasteurizada y leche descremada (Gil *et al.*, 2003).

2.3.2. Importancia y propiedades de los aditivos para la congelación de semen

a) Yema de huevo

La yema de huevo es un componente básico que está en casi todos los diluyentes por su papel protector y conservador de los espermatozoides está ligado a los compuestos lípido-proteicos y lipídicos de la yema de huevo, igualmente contiene glucosa que puede ser metabolizada por los espermatozoides, ciertas proteínas, vitaminas hidrosolubles y liposolubles las cuales poseen un cierto grado de viscosidad que pueden beneficiar a las células espermáticas (De Alba, 1985)

La fracción proteica responsable de la conservación interviene inhibiendo la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como consecuencia de la oxidación desaminativa de una molécula de triptófano, de fenilalanina o de tirosina. La yema de huevo contiene igualmente toda una serie de diastasas, especialmente de deshidrogenasa, que intervendrían como sustrato de oxidación y como elementos protectores de enzimas con grupos sulfhidrilos y del factor anticoagulante que normalmente está presente en el plasma seminal (Derivaux, 1982).

Los efectos beneficiosos de la yema de huevo para impedir el choque por el frío se debe a los componentes de la yema de huevo (lipoproteínas, fosfolípidos y lecitina), en los diluyentes sus concentraciones oscilan entre 1 a 5% de lipoproteínas, 0.5 a 1% de fosfolípidos y 0.25 a 2.0% de lecitina (Salisbury y Van Dermark, 1978).

b) Glicerol:

El glicerol es el agente crioprotector permeante más usado en los protocolos de criopreservación de semen en las diferentes especies (Bittencourt *et al.*, 2004).

Su bajo peso molecular le permite ingresar a la célula y reemplazar osmóticamente el agua intracelular durante el proceso de congelamiento. Esto combinado con una velocidad de congelamiento lenta disminuye la formación de cristales de hielo

intracelulares (Salamon y Maxwell, 2000). El ingreso del glicerol al espermatozoide se realiza mediante los canales aquaporin 7 (Ishibashi *et al.*, 1997).

La mayoría de trabajos utilizan el glicerol en concentraciones entre 6 a 8% (El-Alamy y Foote, 2001). En un diluyente en base a Tris, la mejor motilidad post descongelamiento se obtiene con 6% de glicerol (Molinia *et al.* 1994). Se ha sugerido que la concentración óptima de glicerol en el diluyente está relacionada a su concentración final en el espermatozoide (Salamon y Maxwell, 2000).

La mayoría de protocolos de congelamiento de semen ovino prefiere la adición del glicerol a los 5°C para evitar sus efectos tóxicos (Salamon y Maxwell, 2000). La sensibilidad de espermatozoides a los efectos tóxicos varía en cada especie (Bittencourt *et al.*, 2004). Algunos efectos atribuidos al glicerol son cambios en la estructura bioquímica de la membrana plasmática del espermatozoide relacionados a la capacitación y reacción del acrosoma (Salamon y Maxwell, 2000). Se presenta mayor reacción del acrosoma y mayor cantidad de espermatozoides capacitados cuando el glicerol se adiciona a los 15°C en comparación con la adición a los 5°C (Gil *et al.*, 2003). Por esta razón, el diluyente es dividido en dos fracciones, en donde la segunda fracción contiene el doble de la concentración deseada de glicerol, para que al ser mezclado con igual volumen del semen diluido en la primera fracción, se obtenga la concentración deseada de dicho agente crio protector.

2.4. REFRIGERACIÓN

La reducción gradual de la temperatura disminuye el nivel de metabolismos celular prolongando así, la vida útil de los gametos masculinos. Los espermatozoides de mamíferos, especialmente los pertenecientes a los ungulados, son extremadamente sensibles al enfriamiento rápido. Este fenómeno conocido como choque frío depende de

la velocidad de enfriamiento, del rango absoluto de temperatura que se descienda y de la temperatura final que se alcance. Para evitar los efectos adversos del choque frío emplean velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas ($-0.1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. a $-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$), las cuales descienden la temperatura del semen de 30°C a $^{\circ}\text{C}$ en periodos de tiempo de una o dos horas (Watson, 1995).

2.5. CRIOPRESERVACION DE SEMEN

A fin de realizar muchas de las ventajas potenciales de la inseminación artificial (IA), el almacenamiento a largo plazo de semen es necesario. Esto sólo es posible mediante la congelación de un sistema que detiene los procesos metabólicos de los espermatozoides, lo que permite el almacenamiento indefinido sin una pérdida significativa de la fertilidad. El descubrimiento de las propiedades crioprotectoras de glicerol ha hecho posible la criopreservación. Entre los muchos beneficios que resultan del proceso de criopreservación son la mejora genética de las especies agrícolas importantes y control de las enfermedades que afectan a los dos de los cuales tienen un impacto muy significativo sobre la sostenibilidad de la industria agroalimentaria (Bailey *et al.*, 2000). El éxito de la crioconservación depende de muchos otros factores, como las interacciones entre crioprotector, tipo de diluyente, velocidad de enfriamiento, velocidad de descongelación y embalajes, así como la variación individual del animal (Andrabi, 2007) una cierta pérdida de la viabilidad espermatozoide es inevitable debido a los procedimientos de procesamiento antes de congelación, así como durante el proceso de congelación real. Los informes de investigación del éxito de semen criopreservado varían significativamente a menudo afectadas por el método de la experimentación, que no es estandarizada en muchas investigaciones reproductivas. Información sobre la tasa de preñez a una sola inseminación, el momento de la inseminación, el número de espermatozoides inseminados, volumen de la inseminación,

el momento de la inseminación, el número de espermatozoides inseminados, volumen de inseminar utilizado o el tipo de diluyente utilizado todavía están incompletos. Por otra parte, la motilidad de los espermatozoides ha demostrado ser unos indicadores aún más pobres de la fertilidad en las muestras de congelado-descongelado (Samper *et al*, 1991). Independientemente de todas estas consideraciones, la criopreservación para ser considerado un éxito debe permitir al espermatozoide conservar su capacidad de fertilización después de descongelación. Para lograr esto debería retener su capacidad para producir energía a través de metabolismo; para mantener la configuración de la membrana plasmática normal y la integridad, conservar su motilidad y enzimas, tales como acrosina, dentro del acrosoma para permitir la penetración de los óvulos. La alteración de cualquiera de estas funciones o habilidades afectará significativamente la capacidad de los espermatozoides para lograr la fertilización. El mayor riesgo para el mantenimiento de estos atributos se presenta por la formación de cristales de hielo y el movimiento resultante de agua de hasta gradientes osmóticos durante el proceso de criopreservación (Andrabi, 2007).

Durante el proceso de congelación, varios cambios biofísicos son evidentes dentro de la muestra de semen. A medida que la temperatura cae por debajo de la congelación; la muestra sufre un sobre enfriamiento, como la temperatura desciende más allá de sobre enfriamiento, cristales de hielo extracelular se empiezan a formar desde el agua dentro del medio circundante. Esta formación de hielo aumenta la concentración de solutos, tales como azúcares, sales y proteínas. En respuesta a este gradiente de presión osmótica de nuevo desarrollo y el hecho de que el agua dentro del espermatozoide es más lento para formar cristales de hielo que el agua en el medio que se encuentra, el agua pasa hacia fuera de los espermatozoides, en particular del espermatozoide se vuelve cada vez deshidratado (Watson, 2000). La tasa de agua de los espermatozoides también depende

de la velocidad de descenso de la temperatura, , tanto mayor será el tiempo necesario para el flujo de salida de agua, y por lo tanto una mayor deshidratación. Esto reduce la probabilidad de la formación de cristales de hielo dentro de la espermatozoide que podría causar considerable daño físico (Woeldres, 1997), pero un daño aún mayor se produce debido al aumento de la deshidratación intracelular y salir del espermatozoide y por lo tanto gran forma cristales de hielo intracelular, causando daño físico a las membranas celulares y otros componentes intracelulares. Sin embargo, la crio preservación, tienen como objetivo lograr una velocidad de enfriamiento óptimo que proporcionará un compromiso entre todos estos factores.

Hay dos rangos de temperatura principales motivos de preocupación respecto, el daño a los espermatozoides durante la congelación; el período de sobre-enfriamiento (0°C a -5°C) y la formación de cristales de hielo (6°C a -15°C) () resultados de sobre-enfriamiento excesivos en una rápida formación de hielo con la posibilidad de daño físico. En otras muestras de semen, este problema se puede superar mediante la técnica denominada de la siembra, el cual está diseñado para inducir la formación de hielo más gradualmente durante un mayor intervalo de temperatura. Sin embargo, hay poca o ninguna evidencia de que la siembra de una muestra de semen durante el proceso de congelación tiene efectos ventajosos. La segunda área de preocupación es conocida por tener un efecto significativo sobre espermatozoide funcional a la descongelación. En un intento de superar algunos de estos problemas (Medeiros *et al.*, 2002; Watson y Duncan, 1988).

2.5.1. Efecto de la criopreservación en los espermatozoides

Los espermatozoides cambian continuamente y desarrollar desde sus orígenes como células somáticas hasta su destino como células altamente especializadas capaces de fertilización. Ellos tienen básicamente tres regiones funcionales

comprometedoras una cabeza que contiene el material nuclear condensado, la zona mitocondrial que sirve como una potencia y una cola que es la región de propulsión. La maduración subsiguiente se produce dentro del epidídimo, seguido por un mayor desarrollo inducido primero por contacto con plasma seminal y luego por las secreciones del tracto femenino (Curry, 2000) las etapas finales de desarrollo espermatozoides son inducidas por el entorno inmediato del ovocito y su zona. En el proceso, la mayoría de los orgánulos se pierden junto con el citoplasma, y la cromatina espermatozoides se remodela, esta especialización, sin embargo, se consigue a un costo, reduciendo la capacidad de repararse a sí mismo al espermatozoide que conduce a una mayor susceptibilidad a los cambios ambientales. Por lo tanto, incluso bajo condiciones ideales, es inevitable que algo de daño se producirá a los espermatozoides durante el proceso de congelación (Andrabi, 2007).

2.5.1.1. Efecto sobre el metabolismo espermático

Dado que durante el proceso de crio preservación el metabolismo de los espermatozoides es reducido y por ende presentan poca actividad biológica antioxidante, es de esperar que se den condiciones para un incremento de especies reactivas de oxígeno. Tal como ha sido evidenciado en la crio preservación de semen de ovinos (Santiani, 2003), y bovinos (Morani *et al.*, 2004). En dichos casos, una fuente probable de para que esto se presente sería a partir de los dilutores empleados y los cuales normalmente son expuestos a al aire durante su preparación y almacenamiento y también porque presentan sustancias pro-oxidantes (Foote, 2002),

Por lo tanto, es de esperar un aumento de las especies reactivas de oxígeno principalmente durante la fase de enfriamiento, llegando a niveles máximos cuando

el semen es mantenido a temperaturas cercanas a los 5°C por periodos prolongados (Santiani, 2003). Esto puede deberse a la disminución de la actividad enzimática antioxidante por el descenso de la temperatura (Lasso *et al.*, 1994). El incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno durante la fase de enfriamiento podría ser el resultado de cambios en la integridad estructural y funcional de la membrana espermática (Wang *et al.*, 1997). El descenso de la temperatura produce cambios en el patrón de distribución de los grupos sulfhídricos de la superficie que podrían activar algunos de los mecanismos propuestos para la producción de especies reactivas de oxígeno (Chatterjee *et al.*, 2001).

Elevados niveles de peroxidación lipídica han sido observados luego del proceso de criopreservación en espermatozoides ovinos (Santiani, 2003).

Es probable que la peroxidación lipídica observada luego del descongelamiento haya sido causada durante el proceso de enfriamiento, particularmente en temperaturas cercanas a los 4°C, en donde se producen las mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno (Saleh y Agarwal, 2002).

El estrés oxidativo durante el proceso de criopreservación está relacionado con la pérdida de la función espermática. Los espermatozoides criopreservados presentan disminución de la motilidad progresiva (Wang *et al.*, 1997), viabilidad, alteración en la integridad de sus membranas (Wang *et al.*, 1997; Tselkas *et al.*, 2000) y daño en la estructura del ADN espermático (Baumber *et al.*, 2003). Es por ello, que la prevención de la producción de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de criopreservación es importante para mantener una buena calidad espermática, (Santiani, 2003).

2.5.1.2. Efecto sobre la ultra estructura espermática

Durante el proceso de criopreservación se produce diversos daños en el espermatozoide, un daño letal y un daño sub-letal. El daño letal, disminuye la proporción de células viables. Este daño es producido principalmente por las siguientes causas: el cambio de temperatura, el estrés tóxico y osmótico, y la formación de hielo extracelular. El daño sub-letal produce una disfunción en la población de células sobrevivientes. Este es principalmente producido por: la desestabilización de las membranas, y el estrés oxidativo (Watson, 2000).

En condiciones normales, entre un 40 a 50% de espermatozoides sometidos al proceso de criopreservación no sobreviven. De la proporción sobreviviente solo una minoría de espermatozoides muestra una motilidad progresiva vigorosa, presentándose en la mayoría diferentes grados de daño en la motilidad (Watson, 2000). Después del proceso de criopreservación puede conseguirse un aceptable porcentaje de espermatozoides motiles, sólo una pequeña proporción de estos permanece sin cambios funcionales (Salamon y Maxwell, 2000). Durante el proceso de criopreservación se incrementa la capacitación espermática en comparación con espermatozoides de semen fresco (Watson, 2000). En ovinos, el porcentaje de espermatozoides capacitados en el semen fresco varía entre 5 a 20%, mientras que en espermatozoides descongelados el porcentaje de capacitación puede llegar hasta 90%, aunque varía entre 40 a 60% (Gil *et al.*, 2003).

La baja viabilidad se debe a factores como: cambio de temperatura, estrés osmótico, la formación de hielo intracelular y la toxicidad. El cambio de temperatura produce un estrés en la membrana, posiblemente relacionado con un cambio de fase en los lípidos (Watson, 2000). Las lesiones producidas por el congelamiento de las membranas antes y durante el congelamiento sólo se invierten parcialmente después

del descongelamiento. Las proteínas integrales de la membrana son agrupadas por la separación de la fase lipídica, y esto puede alterar su función, especialmente la función de las proteínas de canales iónicos.

Es por eso que la permeabilidad de la membrana aumenta después del congelamiento (Watson, 2000). La regulación de calcio es claramente afectada y altera la función celular. En casos severos, es incompatible con la viabilidad celular (Bailey y Buhr, 1994). Como ya se mencionó anteriormente el estrés osmótico y la formación de hielo intracelular producen una disminución de la viabilidad espermática. Finalmente la toxicidad de algunas sustancias como el glicerol también producen la muerte de los espermatozoides (Watson, 2000).

Un porcentaje de los espermatozoides sobrevivientes presenta un daño funcional que está relacionado con la calidad de la membrana, daños oxidativos, integridad de los receptores de membrana e integridad de la estructura nuclear, (Watson, 2000). Esto se ve reflejado en la motilidad, capacitación espermática e integridad acrosomal.

2.6. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD SEMINAL POST-DESCONGELAMIENTO

La evaluación de la calidad seminal es con el objetivo de predecir la fertilidad, la respuesta de los espermatozoides a los procesos de congelación descongelación varía entre especies e incluso entre individuos (Evans y Maxwell, 1990).

2.6.1. Características de la membrana espermática

Se considera que el principal sitio de daño asociado a los cambios de temperatura son las membranas espermáticas (Watson, 2000). Cuando la membrana plasmática es afectada por el frío puede sufrir modificaciones en su permeabilidad, que resultan en alteraciones de las funciones metabólicas, perjudicando la motilidad y

capacidad fecundante de los espermatozoides (Amann *et al.*, 1993). Para poder interactuar con el ovocito, los espermatozoides deben estar vivos, motiles y poseer las membranas plasmáticas y acrosomal intactas y funcionales.

Las membranas de los espermatozoides están compuestas principalmente por una cadena doble de fosfolípidos en la cual se localizan complejos proteicos distribuidos aleatoriamente. Cuando están inalterados, se encuentran en estado fluido, esencial para su función. Con el enfriamiento los lípidos sufren una transición a la fase líquida cristalina y posteriormente a una de gel. Una vez que se encuentran en estado de gel, los lípidos tienden a agregarse, formando microdominios en áreas aun fluidas. Estos lípidos agregados no se integran comúnmente con las proteínas asociadas con otros lípidos. Los bordes de estos microdominios se convierten en áreas más frágiles sujetas a la fusión o ruptura además de volverse más permeables a los iones (Hammersted *et al.*, 1990; Amman *et al.*, 1993; Morel, 1999). Cuando los espermatozoides están alterados los iones Na y Ca que entran a las células espermáticas son retirados por medio de transporte activo. A 5°C la permeabilidad al Ca crece significativamente superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca. Así el Ca se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos. Es posible que el Acrosoma sufra mas, con estas alteraciones, una perdida mayor de capacidad fecundante de la que seria esperado de la reducción de la motilidad (Amman *et al.*, 1993).

El hecho de que el shock de frio es causado por un cambio de fase de los lípidos de la membrana fue propuesto por Dobrins (1993). El estrés de la membrana puede continuar por debajo del 0 ° sin que el cambio de fase sea completo, sin embargo, es bien conocido que los cambios de fase ocurran en su mayoría entre los 5°C y

15°C (Dobrins 1993). Las proteínas intracelulares también se ven afectadas por la criopreservación. Es decir que tanto las proteínas involucradas en el transporte de sustancias a través de la membrana; como las funciones enzimáticas, reducen su actividad a bajas temperaturas (Amman *et al.* 1993).

La susceptibilidad al shock térmico es en parte determinada por el contenido de membranas en colesterol y por la proporción de ácidos grasos poli insaturados que están presente en los fosfolípidos, ya que ambos fenómenos influyen en la fluidez de las membranas celulares (Watson, 2000). La relación colesterol/fosfolípidos es un hecho determinante de la fluidez de las membranas.

El colesterol modula la fluidez de membranas por interacción con los ácidos grasos de los fosfolípidos. Las especies que tienen elevadas relaciones colesterol/fosfolípidos son las que mejor resisten los cambios de temperatura. Así Darin-Bennet and White (1997) observaron que en las especies resistentes al shock térmico (conejo y hombre), la relación es inferior a 0,46 (ejem. el toro 0.45 y carnero 0.3). Con concentraciones similares de ambos grupos de lípidos se mantiene la fluidez de la membrana y no se produce la separación lateral de las cadenas lipídicas, por lo que las proteínas intrínsecas no son desplazadas conservándose así la integridad del plasmolema.

2.6.1.1. Test de endosmosis celular (jeyendran *et al.*, 1992).

La membrana celular de los espermatozoides de carnero tiene una particular composición que hace dificultosa la criopreservación (Aisen *et al.*, 2002). Los espermatozoides de mamíferos bajo condiciones hipo-osmóticas se “hinchan” debido al flujo de agua extracelular que origina la expansión de las membranas, por lo tanto, sometiendo a los espermatozoides a estos medios se puede evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática, ya que aquellos espermatozoides

que aparecen con el flagelo hinchado y plegado helicoidalmente sobre la porción intermedia son los que mantienen su membrana plasmática funcional y permite el paso de agua al interior, para establecer el equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular (Jeyendran *et al.*, 1992; Randall *et al.*, 1997). El hinchamiento se evidencia más fácilmente en el flagelo espermático por ser en esta porción la membrana plasmática más flexible y estar más separada de las estructuras inferiores que en la cabeza (Jeyendran *et al.*, 1992). El test de endósmosis se ha aplicado para el control de la calidad seminal en varias especies animales, entre ellas la ovina, porcina y bovina (Vázquez, 1980; Watson y Duncan, 1988; Anel, 1990). Las presiones osmóticas de los medios empleados para realizar esta prueba en la especie ovina oscilan entre 75mOsmKg. (Vázquez, 1980) y 150 mOsmKg. (Watson y Duncan, 1988), habiéndose observado que por debajo de dichas presiones los “lazos” formados en los flagelos se pierden al reventar las membranas plasmáticas (Jeyendran *et al.*, 1992). La identificación se puede hacer por microscopia de contraste de fases (Jeyendran *et al.*, 1992) o con contadores electrónicos que clasifican los espermatozoides de una muestras espermática en distintas subpoblaciones en función del tamaño (Vázquez, 1980).

Cuadro 3: Composición de Medio hipo-osmotico

Citrato de sodio (di hidratado)	0.735g.
Fructuosa	1.351g.
Agua bidestilada	100 mL.

FUENTE: Santiani, (2003)

El efecto de la temperatura de empajillado (20°C y 5°C) y raza en la motilidad individual e integridad de membrana utilizando dilutor Tris, obtuvo como promedio general 37.6%, además que evaluó la integridad de membrana por razas Criollo,

Corriedale y Merino y obteniendo 40.84%, 38.40% y 36.79% de espermatozoide con la membrana intacta a la descongelación, respectivamente Huamani (2010).

El efecto del uso de dos crioprotectores (etilenglicol y glicerol) y el envasado en pajillas de 0.25ml, 0.50ml y pellet, sobre las características de motilidad e integridad de membrana del espermatozoide en época de invierno; reportando 39.91% de espermatozoides con la membrana celular intacta, además que evaluó también por razas obteniendo 39.69%, 39.66% y 46.84% para las razas razas Corriedale, Merino y Criollo respectivamente Mamani (2011).

Se evaluó el efecto de tres temperaturas de congelación en semen de carnero las muestras fueron colectadas de 5 carneros adultos de las razas Merino y Criollo por vagina artificial diluidas con el dilutor tris-yema-glicerol, cargadas en pajillas de 0.25 mL; en el cual los resultados para el test hiposmótico en semen refrigerado fue 60.28% de espermatozoides con membrana celular intacta y para semen descongelado fue de 35.86 en -80°C , 36.97 en -100°C , 41.14 en -120°C y 37.88 en grupo control, Perez (2010).

Con la finalidad de determinar el incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando un antioxidante (Tempo) durante la criopreservación, descrito anteriormente, encontrándose resultados de 33.65% y 40.53% a la prueba de integridad de membrana para el semen congelado sin el antioxidante y con el antioxidante respectivamente, Santiani *et al.*, (2007).

Se evaluó el comportamiento de los dilutores Tris-yema y Citrato-yema utilizando yema de huevo de codorniz, en el congelamiento de semen de ovino y la integridad de la membrana espermática del semen congelado en pajillas de 0.5 ml, En semen refrigerado los valores de la integridad de membrana (HOST) fueron de 78.0% con Tris y 73.2% con Citrato para semen descongelado (descongelamiento se realizó a

38 °C por 15 segundos) fue de 49.8 % y 41.3 % para los dilutores Tris y Citrato, respectivamente, Cabrera *et al.*, (2011).

Evaluó el efecto de dos dilutores, Tris- Fructosa-Yema de huevo (Tris) y Citrato-Glucosa-Yema de huevo (citrato), (yema de huevo de codorni) sobre la motilidad espermática e integridad de la membrana espermática (HOST) en semen congelado de ovinos bajo la forma de pellets. En ovinos Assaf, los valores de HOST del semen descongelado fueron de 43.56 y 40.38% con Tris y citrato respectivamente, Cabrera *et al.* (2010).

2.6.2. Características del acrosoma del espermatozoide

El acrosoma es una estructura membranosa que ocupa la región anterior de la cabeza del espermatozoide, englobando al núcleo y que se origina a partir del complejo de Golgi durante la fase de espermátide. Este orgánulo contiene los enzimas que permiten al espermatozoide atravesar las envolturas que recubren al ovocito. Dichos enzimas se liberan al exterior mediante un proceso de exocitosis denominado Reacción Acrosómica. Un nuevo parámetro, introducido en 1968 por Saacke y Marshall, empleado para la evaluación morfológica del eyaculado consiste en la descripción de la secuencia de alteraciones que presenta el acrosoma del espermatozoide del toro con el transcurso del tiempo. A partir de aquí, la integridad del acrosoma se ha utilizado como prueba de evaluación de la calidad seminal en la mayoría de las especies de animales mamíferos. El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación. En el acrosoma se puede distinguir tres regiones claramente diferenciadas: la zona acrosomal con su borde apical, la zona post acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas, los mismos que tienden a romperse en el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento. Muestras seminales con alta proporción de alteraciones acrosomales suelen tener una

fertilidad baja (Peña y Linde-Forsberg, 2000). La reactividad de la membrana acrosomal representa un requisito absoluto para la fertilización y sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal (RA) de manera sincronizada con la fase de penetración del oocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con este para formar un embrión (Januskauskas *et al.*, 2000).

La normalidad acrosómica se valora de diversas formas según los distintos autores. Así algunos de ellos emplean la microscopia de campo claro para el examen de las muestras previamente teñidas con una solución de Giemsa al 6%. Otros, como Carbonero y Vázquez, utilizan una solución de glutaraldehído para fijar las muestras y evalúan, por medio de la microscopia de contraste de fases, el estado del borde apical del acrosoma. También se ha empleado la microscopia electrónica de transmisión para tal fin.

2.6.2.1. Tinción triple (eosina-nigrosina-giemsa) (Tamuli y Watson, 1994).

El contenido en espermatozoides vivos de una muestra de semen puede determinarse fácilmente mediante el empleo de técnicas de tinción en las cuales los espermatozoides muertos aparecen teñidos al presentar sus membranas mayor permeabilidad al paso de colorantes (Fiser y Marcus, 1989). El porcentaje de células espermáticas muertas, en el semen de morueco, se ha estimado por diversas tinciones: Eosina-Nigrosina (Colas *et al.*, 1980), Tripán azul, Amaranto (Fiser y Marcus, 1989) y una de estas últimas es la triple tinción NEG, ésta tinción desarrollada mediante la combinación de dos técnicas de tinción tradicional (eosina-nigrosina y Giemsa), ha demostrado ser confiable en la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos además de su estado acrosomal (Tamuli y Watson 1994).

Para la tinción triple, se realizará el siguiente procedimiento:

- Se tomó una gota de semen (5ul) que será mezclada con una gota de eosina (5uL) y dos gotas de nigrosina (10uL) sobre un portaobjetos en una platina temperada a 37°C, se realizará la mezcla de todos ellos y el frotis que será secado al aire.
- El frotis será fijado en una solución al 4% de formaldehído en PBS por diez minutos.
- Posteriormente se lavará durante 7 a 10 minutos en agua corriente y luego una vez con agua destilada, a continuación se secará al aire.
- Una vez seco se sumergirá en una solución al 20% de Giemsa en agua destilada por un tiempo de 60 minutos.

Finalmente el frotis se lavará con agua destilada y se secará al aire para ser observado con un microscopio óptico a 800 aumentos usando aceite de inmersión. Las células vivas serán teñidas de un color rosado y las células muertas se teñirán de color púrpura todo ello en la región post acrosómica, el estado del acrosoma será claramente observado por la tinción púrpura del mismo.

Evaluó el efecto de cuatro combinaciones de dos agentes crioprotectores permeantes más dos no permeantes 1)Glicerol - Trehalosa, 2)Glicerol - Sacarosa, 3)Etilenglicol - Trehalosa y 4)Etilenglicol - Sacarosa usando dilutor tris sobre la calidad del semen ovino post-descongelamiento. Los resultados fueron para glicerol-trehalosa 62.7%; para el dilutor leche descremada trehalosa efecto sobre el Acrosoma obtuvo 23.22%, Sandoval (2005).

Se evaluaron el efecto de la dilución, refrigeración y criopreservación del semen ovino sobre cambios celulares relacionados con la capacitación espermática, cada eyaculado se diluyó con citrato de sodio, fructosa, yema de huevo y penicilina-

estreptomicina, para semen diluido y refrigerado por más de tres horas, sobre el acrosoma se obtuvo un 32.8% de espermatozoides con el acrosoma intacto, Ávila (2008).

Compararon dos diluyentes leche descremada y Tris para la criopreservación de semen ovino utilizando yema de huevo fresca y yema de huevo pasteurizada en polvo, para ser empacados en pajillas de 0.25 ml para evaluar el acrosoma utilizaron la coloración de la triple tinción de Tripán; observando al mismo tiempo integridad acrosómica, morfología y diferenciación de espermatozoides vivos y muertos dilutores obteniendo como resultados como promedio general para ambos dilutores 34.27% a 5°C y 28.28% de espermatozoides con acrosoma intacto en semen descongelado, Buitrago y Perez (2008).

El uso de diferentes dilutores comerciales a los que además adicióno dodecil sulfato ionico DSI, una sustancia surfactante; para evaluar el acrosoma atravez HORT (test de resistencia osmotica) obtuvo los siguientes resultados para semen descongelado 44.97%, 39.72%, 46.00% y 50.60% de espermatozoides con acrosoma intacto, para dilutores Andromed, Andromed+DSI, Triladyl, y Triladyl+DSI respectivamente, Valdez (2013).

En un trabajo de investigación, adicionando dos antioxidantes: Tempo (2, 2, 6, 6 tetrametil-1- piperidiniloxil) y Tempol (4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1- piperidiniloxil) a los dilutores, cada uno en concentración de 0.5, 1.0 y 2.5 mM con la finalidad de evaluar el efecto post-descongelamiento que pudiera tener sobre la motilidad progresiva, la viabilidad e integridad acrosomal, los resultados fueron los siguientes: 22.69%, de espermatozoides con acrosoma intacto con antioxidante Tempol en una concentración de 2.5mM. Así mismo, obtuvo un 68.86% de

espermatozoides con el acrosoma intacto utilizando el antioxidante Tempo en una menor concentración (0.5mM) Ruiz (2005).



III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. AMBITO DE ESTUDIO

El trabajo de investigación se realizó en el Banco de Semen y en la Sala de Inseminación de ovinos de la Cabaña Buenavista, del C.I.P Chuquibambilla, de la Universidad Nacional del Altiplano, conducido por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar y región de Puno a 3974 m.s.n.m. en las coordenadas geográficas 14°47'37", latitud Sur y 70°47'50", longitud Oeste. A 17 km de la ciudad de Ayaviri, a la altura del km 1200 de la carretera (Puno - Cusco). En el 2013 se tuvo una precipitación pluvial promedio 700 mm en la temperatura máxima fue de 22° C en los meses de Agosto, Octubre y Noviembre, y una mínima de -6° C, (SENAMHI, 2013).

3.2. MATERIAL DE ESTUDIO

3.2.1. Animales

Para el presente trabajo se utilizaron 3 carneros: 1 de la raza Criollo, 1 de la raza Corriedale, y 1 híbrido Texel (cruce Criollo con Texel) de 3 años de edad en promedio.

3.2.2. Manejo de los carneros

Los carneros utilizados se mantuvieron cerca de la sala de inseminación de ovinos y junto a los demás reproductores del CIP Chuquibambilla, donde fueron alimentados al pastoreo en praderas naturales compuesta por las siguientes especies: *Festuca dolichophilla*, *Trifolium amabili*, *Calamagrostis spp.*, *Mullenbergia fastigiata*, *Medicago sativa* entre las más importantes, Además de la suplementación con ensilado de avena (*Avena sativa*), heno de alfalfa y agua *ad libitum*.

3.3. METODOLOGÍA DE TRABAJO

Se inició con una fase de de acostumbramiento y entrenamiento de los carneros, para la colección de semen que tuvo una duración de 2 semanas. Las colecciones de semen se realizaron de la siguiente manera; dos colecciones por semana

3.3.1. Manejo el semen

3.3.1.1. Colección de semen

- ✓ Preparación del carnero; antes de cada colección se realizó la higienización del área circundante al prepucio, recorte de lana y de los pelos prepuciales, (tricotomía) se lavó el prepucio y finalmente fue secado cuidadosamente.
- ✓ Preparación de la vagina artificial; para la colección se utilizó una vagina artificial Walmur® que consta de un cuerpo rígido de aluminio, fundas de látex y copa de colección, antes de la colección el cuerpo de la vagina fue calentada en una estufa a 40°C y luego se procedió al armado, colocando la funda látex y la copa de colección
- ✓ La vagina artificial se cargó con agua caliente a 40°C en una cantidad de 60 a 80 mL, para obtener una temperatura interna de 37°C. Luego se insufló con aire, con la finalidad de estrechar la luz de la vagina artificial y obtener la presión necesaria (hasta obtener un diámetro de 1cm de luz interna aproximadamente).

Para la estimulación del carnero, se utilizó una borrega en celo y un brete de monta, en el que se sujetó la borrega.

3.3.2. Dilución

3.3.2.1. Preparación de los dilutores

a) Dilutor tris-yema de huevo (Evans y Maxwell, 1990).

Para la preparación del dilutor Tris - yema de huevo-glicerol, se utilizó una balanza analítica con la que se realizó el pesado de los componentes sólidos, y jeringas de 5 y 20 mL para medir los componentes líquidos, dichos componentes se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1: Componentes del dilutor tris-yema de huevo

Ingrediente	Cantidad
Tris	3.634(g)
Glucosa	0.500(g)
Acido Cítrico	1.990(g)
Penicilina	100 000(UI)
Estreptomina	100(mg)
Yema de huevo	15(mL)
Glicerol	5(mL)
Agua bidestilada(enrasar)	100(mL)

FUENTE: (Evans y Maxwell, 1990).

Estos componentes calculados fueron colocados en un Erlenmeyer, al cual después se le adiciono agua bidestilada para su dilución.

b) Dilutor agua de coco (Vale, 2011)

Para la preparación del dilutor Agua de coco primero se extrajo el liquido; se hizo limpieza del coco, en la superficie tiene un pequeño orificio, siendo esta la única área que no tiene la cascara dura, se procedió con la higienización respectiva, con alcohol de 96°. Una vez limpio con mucho cuidado se obtuvo el liquido con ayuda de una jeringa, para lo cual, se introdujo la aguja de la jeringa estéril y se absorbió el líquido contenido en el coco, luego este se depositó en un tubo Falcon® de 15mL

de capacidad.

El agua de coco provenía de un fruto con aproximadamente seis meses de maduración, lo que corresponde con el inicio de la formación de una cutícula del endocarpo.

La preparación del dilutor se realizó tomando en consideración lo descrito por Vale (2011) y se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se preparó 2 soluciones que se denominaron como: solución Stock 1 y solución Stock 2 las que se describen a continuación:

Solución stock 1: Esta solución consistió de una parte de agua de coco y una parte de solución de citrato de sodio al 5%; (relación de volumen 1:1).

Solución stock 2: Esta solución fue de 90% de la solución stock 1 y 10% de yema de huevo obtenida con una adecuada asepsia descrita posteriormente.

Solución stock 3: Una vez que se preparó la solución stock 2 se extrajo 93ml de esta y se le adiciono glicerol 7mL; esta solución es la que se utilizo como dilutor para la congelación de semen.

- Para la obtención de la yema de huevo (huevos de no más de 24h de postura) se desinfecto la cascara con alcohol a 96°, se rompió la cascara se procedió a eliminar toda la clara; se trasvaso la yema sobre un papel toalla y con movimientos suaves se hizo desplazar la yema eliminando todos los restos de la clara; una vez limpio se hizo una incisión en la membrana nuclear con ayuda de una aguja hipodérmica estéril y la yema fue vertida en un tubo Falcon® estéril.

c) Dilutor leche UHT

Se utilizó leche UHT (*Ultra High Temperature*) comercial de marca Gloria®. Previa verificación del vencimiento la leche se obtuvo directamente del envase para lo cual primero se desinfectó la tapa con alcohol de 96° y con la ayuda de una

jeringa de 10mL estéril, se aspiró la cantidad de 10mL de leche que fue vertida a un tubo Falcom® luego se agregó 0.5mL de glicerol, con el cual se diluyo el semen para la congelación.

3.3.2.2. Técnica de dilución

Una vez que se tuvo el eyaculado se procedió a efectuar la dilución de un solo paso para la congelación de semen, dicha dilución se realizo de la siguiente manera:

- Antes de la dilución y con el objetivo de reducir el efecto de muestra, el eyaculado fue dividido en tres partes iguales. Cada parte fue diluida en una proporción de 1:1 con cada uno de los tres diluyentes.
- Calculado el volumen final (formula 2) se completó la dilución incrementando el dilutor en el semen pre-diluido de acuerdo al cálculo, agregando el dilutor lentamente por las paredes del tubo según corresponda a cada tratamiento
- La pre-dilución y la dilución se realizó teniendo en cuenta que tanto el semen como el dilutor se encontraron a la misma temperatura que en este caso fue a 37°C.

Fórmula 1. Determinación del número de dosis.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de dosis} = \frac{\text{mot. individual} \times \text{concen. del eyaculado} \times \text{vol.} \times \% \text{ de vital.}}{\text{concentracion dosis}}$$

FUENTE: De Alba (1985)

- Una vez obtenido el número de dosis que se obtendrían del eyaculado, se procedió a realizar el cálculo para hallar el volumen necesario de dilutor, utilizando la fórmula 2:

Fórmula 2. Determinación del volumen de dilutor a utilizar

$$\text{Volumen dilutor} = (\text{N}^{\circ} \text{ de dosis} \times \text{vol. dosis}) - \text{Volumen de semen}$$

FUENTE: Quispe, (2011)

3.3.3. Refrigeración

Una vez terminada la dilución, se procedió al enfriamiento o refrigeración del semen, con el objetivo de lograr que el semen baje de una temperatura de 37°C a 5°C en un tiempo promedio de 1.5 horas.

Para transportar el semen diluido se adecuó una caja de tecnopor para evitar los rayos de luz, en el cual en su interior habían tres envases adecuados con agua temperada a 37°C, cada envase era de un carnero en el cual se encontraban los tres tubos Falcon® identificados con cada dilutor utilizado. Al mismo tiempo que se transportaba el semen diluido de la Cabaña Buenavista hasta llegar al Laboratorio del Banco de Semen, se procedió a descender la temperatura del agua, a una velocidad aproximada de 1°C cada 3 min, lo cual se logró agregando cubos de hielo al baño María. Una vez en el laboratorio del Banco de Semen se continuó con el descenso de la temperatura hasta llegar a 5°C, para ello se utilizó la refrigeradora.

3.3.4. Fase de equilibrio

Al terminar el proceso de enfriamiento (5°C) se realizó la fase de equilibrio del semen por espacio de 30min.

3.3.5. Etiquetado de las pajillas

Las pajillas utilizadas fueron las de 0.5mL de capacidad, se identificaron el número necesario de las pajillas utilizando tinta indeleble en diferentes colores de acuerdo al tratamiento la información inscrita en las pajillas detalló el tratamiento de los dilutores (TRIS, Agua de coco y Leche UHT), las pajillas se colocaron en la refrigeradora con el fin de que la temperatura de estas también estuviera a 5°C.

3.3.6. Envasado de semen en pajillas

- Para el llenado de las pajillas se utilizó una jeringa de tuberculina con un adaptador que coincidiera con el extremo posterior de la pajilla.

- Se absorbió el semen en las pajillas de 0.5ml y finalmente se selló con alcohol polivinílico haciendo 3 a 4 golpes y se sumergió rápidamente en el agua a 5°C este proceso se realizó lo más rápido posible para evitar cambios de temperatura.

3.3.7. Congelación de semen

- Se preparó una caja de teknoport, donde se agregó nitrógeno líquido hasta una altura de 5 cm de la caja.
- Se sacaron las pajillas de la refrigeradora, se secaron con papel toalla y se colocaron sobre la rejilla de congelación, uniformemente.
- Se colocó la rejilla de congelación sobre los vapores de nitrógeno líquido en suspensión a 5cm respecto del borde de la caja de teknoport y a 10cm respecto del nivel de nitrógeno líquido, donde recibió el vapor estático del nitrógeno líquido, y logrando descender la temperatura a una velocidad de 20°C por minuto hasta una temperatura de -140°C, luego de lo cual las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido.

Finalmente las pajillas se colocaron en globets y fueron llevados al tanque criogénico para su almacenamiento.

3.3.8. Descongelación

- Para la descongelación de semen se sacó al azar una pajilla del tratamiento correspondiente y se sumergió inmediatamente en agua tibia a 37°C contenida en un termo de descongelación, las pajillas de 0.50ml fueron sumergidas por un tiempo de 30seg.
- Cumplido el tiempo se sacó la pajilla del agua se secó con ayuda de papel toalla.
- Se cortó un extremo de la pajilla con ayuda de una tijera y se colocó una gota de semen sobre una lámina portaobjetos temperada a 37°C.

3.3.9. Evaluación del semen descongelado

Una vez descongelado el semen se procedió a la evaluación: motilidad individual, vivos y muertos; además se realizaron las pruebas de integridad de membrana espermática (HOST), y de acrosoma (Tinción Giemsa).

a) Evaluación de la integridad de la membrana espermática (HOST) (Jeyendran et al., 1992)

Esta evaluación se realizó por medio de la prueba de hiposmosis (HOST, por sus siglas en inglés).

Para determinar la integridad de la membrana plasmática, los espermatozoides fueron expuestos al medio hiposmótico para ello las muestras fueron evaluadas a un aumento de 100X, se realizó el siguiente procedimiento:

- En un tubo Falcon® de 10mL de capacidad se colocó 1mL de solución hipo osmótica, la misma que estuvo temperada a 37°C en baño María.
- Se colocó una alícuota de 0.05mL del semen descongelado a la solución hiposmótica, se homogenizó suavemente y se dejó incubar por un tiempo de 30 min, pasado este tiempo se agregó 0.1mL de solución de formaldehído al 40% con la finalidad de fijar la reacción
- Inmediatamente después en una placa temperada a 37°C se colocó una gota de la muestra, también se colocó una gota de eosina y una gota de nigrosina se homogenizó con el semen y se hizo un frotis con la finalidad de tener una mejor apreciación de la reacción de la hiposmosis.
- Se observó al microscopio óptico con aceite de inmersión a 100X. Se contabilizaron como reacción positiva a todos aquellos espermatozoides que tenían la cola hinchada y enrollada; se determinó el porcentaje de espermatozoides con

membrana intacta con la siguiente formula; habiendo contado no menos de 100 espermatozoides.

Fórmula 3. Determinación del % de espermatozoides con la membrana intacta

$$n = \frac{x}{y} \times 100$$

FUENTE: Elaboración propia

Donde:

n= % de espermatozoides con reacción positiva

X= Numero de espermatozoides con reacción positiva

Y= Numero total de espermatozoides contados

b) Evaluación del acrosoma intacto del espermatozoide tinción triple (eosina–nigrosina–Giemsa) (Tamuli y Watson 1994).

Para la tinción triple, se realizó el siguiente procedimiento:

- Se tomo una gota de semen (5ul) que fue mezclada con una gota de eosina (5uL) y dos gotas de nigrosina (10uL) sobre un portaobjetos en una platina temperada a 37°C, se realizo la mezcla de todos ellos y el frotis fue secado al aire.
- El frotis fue fijado en una solución al 4% de formaldehido en PBS por diez minutos.
- Posteriormente se lavo durante 60 segundos en agua corriente y luego una vez mas con agua destilada, para luego dejarla secar al aire.
- Una vez seco se sumergió en una solución al 20% de Giemsa en agua destilada por un tiempo de 60 minutos.
- Finalmente el frotis se lavo con agua destilada y se seco al aire para ser observado con un microscopio óptico a 100X aumentos usando aceite de inmersión.

- Las células vivas fueron teñidas de un color rosado y las células muertas fueron teñidas de color púrpura todo ello en la región post acrosómica el estado del acrosoma fue claramente observado por la tinción púrpura del mismo, se determinó el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta con la siguiente fórmula habiendo contado no menos de 100 espermatozoides.

Fórmula 4. Determinación del % de espermatozoides con el Acrosoma Intacta

$$n = \frac{x}{y} \times 100$$

Fuente: Elaboración propia

Donde:

n= % de espermatozoides con acrosoma intacto

X= Numero de espermatozoides con acrosoma intacto

Y= Numero total de espermatozoides contados

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinaron las medidas de tendencia central (promedio), se realizó el análisis de varianza ANVA y la prueba estadística de Tuckey para determinar diferencias significativas entre medias de tratamientos; en lo referente a integridad de membrana y acrosoma en semen refrigerado y congelado-descongelado; se realizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de 3x3 (factor raza con tres niveles: Criollo Corriedale Texel y factor dilutor con tres niveles: Tris-yema, Agua de coco, Leche UHT) con 5 repeticiones, cuyo modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = u + D_i + R_j + (DR)_{ij} + e_{ijk}$$

Dónde:

$i = 1, 2, 3$ Dilutor (tris, agua de coco, leche UHT)

$j = 1, 2, 3$ Razas de carneros (Criollo, Corriedale, Texel)

$k = 1, 2, 3, 4, 5$ repeticiones (colectas)

Y_{ij} = Variable respuesta (espermatozoides con membrana y acrosoma intacto)

$u_{...}$ = Efecto de la media general

D_i = Efecto del i -esimo dilutor utilizado

R_j = Efecto de la j -esima raza

$(DR)_{ij}$ = Efecto medio de la interacción del i -esimo dilutor con la j -esima raza

eE_{ijk} = Error experimental

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS (Statistical Analysis System), para el análisis de varianza sobre el procedimiento GLM (General Lineal Model) la comparación de medias para determinar la diferencia estadísticamente significativa se realizó utilizando la prueba de Tuckey, considerando como diferencia estadísticamente significativa $P \leq 0.05$ (SAS Institute 2004).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA ESPERMÁTICA EN SEMEN REFRIGERADO

4.1.1. Efecto del dilutor sobre la integridad de membrana celular en semen refrigerado

En la tabla 1 se muestra el porcentaje de espermatozoides con membrana celular intacta en semen diluido con tres dilutores y refrigerado a 5°C evaluada a través de la prueba de hiposmosis (HOST).

Tabla 1. Efecto del dilutor sobre el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta a 5°C

Dilutor	n	Membrana espermática intacta (%)	Valores extremos (%)
Tris	15	67.33 ^a	57.00-89.00
Agua de coco	15	49.93 ^b	36.00-69.00
Leche UHT	15	46.93 ^b	34.00-60.00

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

La superioridad ($P \leq 0.05$) de espermatozoides con membrana celular intacta observada en semen diluido con Tris, en comparación al semen diluido con agua de coco y leche UHT a la refrigeración podría ser consecuencia de que el Tris estaría brindando una mejor protección a la membrana celular, gracias a su acción tampón, que actúa proporcionando estabilidad a la membrana espermática en el proceso de enfriamiento, atenuando los efectos del shock de frío que es uno de los principales efectos negativos de dicho proceso, el cual causa daños a nivel de la membrana celular, la cual es la más seriamente afectada en los procesos de criopreservación Watson, (1995) pues cambios en la membrana plasmática como consecuencia del shock frío puede generar importantes modificaciones en su permeabilidad, que

resultan en alteraciones de las funciones metabólicas, perjudicando la motilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Amann *et al.*, 1993), hecho que podría ser reducido cuando el semen es diluido con dilutor Tris en comparación al semen diluido con agua de coco y leche UHT.

El resultado obtenido con Tris es superior al reportado por con Pérez (2010), quien obtuvo 60.28% de espermatozoides con membrana celular intacta pueda deberse tal vez a un mejor manejo de las muestras ya que se trabajaron en condiciones similares y con el mismo dilutor; sin embargo, los resultados del presente trabajo son, inferiores a lo reportado por Cabrera *et al.* (2011) quienes obtuvieron 78.0% a la prueba de hiposmosis esto probablemente sería consecuencia de que los investigadores mencionados adicionaron yema de huevo de codorniz como agente crioprotector, la cual podría generar una mejor protección a la membrana del espermatozoide gracias a la adhesión de las proteínas de baja densidad a la membrana plasmática del espermatozoide.

4.1.2. Efecto de la raza sobre la integridad de membrana celular en semen refrigerado

Los porcentajes de espermatozoides con membrana intacta, observados según el efecto de la raza en semen diluido a 5°C se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la Raza sobre el porcentaje de espermatozoides con membrana celular intacta a 5°C.

Raza	n	Membrana espermática intacta (%)	Valores extremos (%)
Criollo	15	59.33 ^a	39.00-89.00
Corriedale	15	56.87 ^a	41.00-78.00
Texel	15	48.00 ^b	34.00-67.00

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Tanto el semen del carnero Criollo como el del Corriedale mostraron tener una mayor porcentaje de espermatozoides con membrana celular intacta al momento de la refrigeración (5°C), en comparación a los espermatozoides del híbrido Texel ($P \leq 0.05$), la literatura actual disponible no otorga una clara explicación del efecto de la raza del carnero sobre las características seminales, sin embargo, en el trabajo de investigación realizado se pudo apreciar que el semen colectado del híbrido Texel mostraba una mayor concentración espermática, agregado a ello su motilidad masal evaluada al momento de la colección mostraba ser más intensa respecto de las otras dos razas evaluadas en el presente estudio, ello llevaría a asumir que estas dos características estarían comprometidas con una mayor tasa metabólica consecuencia de un movimiento más vigoroso y de una mayor cantidad de desechos metabólicos como el anhídrido carbónico y especies reactivas de oxígeno consecuencia de su mayor concentración espermática, tales condiciones si se sabe, que tienen efectos nocivos sobre la membrana espermática.

4.1.3. Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre la integridad de membrana celular en semen refrigerado

En la tabla 3 se observan los porcentajes de espermatozoides con membrana celular intacta como consecuencia de la interacción del tipo de dilutor y de la raza de carnero, en semen a 5°C.

Tabla 3. Efecto de la interacción dilutor-raza en la integridad de membrana espermática
(%) a 5°C

Dilutor	Raza	n	Membrana espermática intacta (%)	Valores extremos (%)
Tris	Criollo	5	70.2	62.00-89.00
	Corriedale	5	70.4	60.00-78.00
	Texel	5	61.4	57.00-67.00
Agua de coco	Criollo	5	55.2	43.00-69.00
	Corriedale	5	51.2	46.00-60.00
	Texel	5	43.4	36.00-53.00
Leche UHT	Criollo	5	52.6	39.00-59.00
	Corriedale	5	49.0	40.00-60.00
	Texel	5	39.2	34.00-48.00

No se observa diferencia significativa ($P>0.05$) en las diferentes interacciones entre el factor dilutor y raza del carnero sobre la integridad de membrana de los espermatozoides; siendo posible asumir que la membrana de los espermatozoides no se encuentran afectados por la interacción de los dos factores evaluados, sino como ya se vio en los puntos anteriores son consecuencia de los efectos principales más no de los secundarios.

4.2. ACROSOMA EN SEMEN REFRIGERADO

4.2.1. Efecto del dilutor sobre el acrosoma en semen refrigerado

En la tabla 4 se muestran el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto en semen diluido con tres dilutores; a 5°C evaluado a través de la prueba de Tinción Giemsa.

Tabla 4. Efecto del dilutor sobre el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto a 5°C.

Dilutor	n	Acrosoma intacto (%)	Valores extremos (%)
Tris	15	50.60 ^a	42.00-61.00
Agua de coco	15	44.27 ^b	21.00-63.00
Leche UHT	15	48.93 ^b	31.00-70.00

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

El dilutor Tris muestra un mejor porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, en comparación con los demás dilutores, esto podría ser consecuencia a que hubo una mejor protección del acrosoma durante el proceso de enfriamiento, por parte del dilutor Tris, ya que los espermatozoides experimentan daños a nivel de la membrana plasmática, con inevitable reducción de la motilidad y probablemente también a nivel del acrosoma durante su conservación.

Los porcentajes obtenidos en los diferentes dilutores son superiores a lo comparado por Ávila (2008) que obtuvo un 32.8% de espermatozoides con el acrosoma intacto, este porcentaje podría deberse al tipo de dilutor utilizado Citrato y también al tiempo de refrigeración de semen a 5°C por más de tres horas donde aumenta los niveles intracelulares de calcio ocasionando cambios de permeabilidad en la membrana, coincidiendo con lo descrito por Amman *et al.*, (1993), quienes indican que a 5° C la permeabilidad al Ca⁺⁺ crece significativamente, superando la capacidad de eliminación de los iones por medio de las bombas de Ca⁺⁺. Así, el Ca⁺⁺ se acumula en el espermatozoide alcanzando niveles tóxicos. Es posible que el acrosoma sufra más, con estas alteraciones, una pérdida mayor de capacidad fecundante de la que sería esperado de la reducción de la motilidad. Así mismo, los resultados del presente trabajo son superior a lo reportado por Buitrago y Perez (2008), quienes trabajaron con diferentes dilutores como es leche descremada y Tris

obteniendo como promedio general para ambos dilutores 34.27% de espermatozoides con acrosoma intacto, utilizando para su evaluación la tinción tricromica.

Los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intacto en este trabajo son inferiores, a lo reportado por Córdova *et al.* (2015), quienes obtuvieron un 82% de positividad, cabe recalcar que en sus resultados tomaron en cuenta espermatozoides vivos y muertos con Acrosoma intacto, a diferencia de lo reportado en este estudio que solo se tomo en cuenta los espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

4.2.2. Efecto de la raza sobre el acrosoma en semen refrigerado

Los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intacto, observados según el efecto de la raza en semen diluido a 5°C se observan en la tabla 5.

Tabla 5. Efecto de la Raza sobre el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto a 5°C.

Raza	n	Acrosoma intacto (%)	Valores extremos (%)
Criollo	15	39.73 ^c	21.00-58.00
Corriedale	15	55.47 ^a	45.00-70.00
Texel	15	48.60 ^b	38.00-62.00

^{a, b, c}, Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Se observa que el semen de Carnero Corriedale muestra un mayor porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, ($P \leq 0.05$); que tuvieron una mayor resistencia al proceso de refrigeración frente a las demás razas Criollo y Texel.

No se reportan publicaciones o estudios que mencionen el efecto que pueda tener la raza sobre los espermatozoides con el Acrosoma intacto condición que estimula a seguir trabajando en la conservación del semen en refrigeración de esta especie.

4.2.3. Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre el acrosoma en semen refrigerado

En la tabla 3 se observan los porcentajes de espermatozoides con el acrosoma intacto como consecuencia de la interacción del tipo de dilutor y de la raza de carnero, en semen refrigerado a 5°C.

Tabla 6. Efecto de la interacción dilutor-raza sobre el Acrosoma (%) a 5°C.

Dilutor	Raza	n	Acrosoma intacto (%)	Valores extremos (%)
Tris	Criollo	5	53.6 ^{ab}	47.00-58.00
	Corriedale	5	54.0 ^{ab}	47.00-61.00
	Texel	5	44.2 ^b	38.00-57.00
Agua de coco	Criollo	5	26.6 ^d	21.00-30.00
	Corriedale	5	56.8 ^a	49.00-63.00
	Texel	5	49.4 ^b	46.00-55.00
Leche UHT	Criollo	5	39.0 ^c	31.00-47.00
	Corriedale	5	55.6 ^{ab}	45.00-70.00
	Texel	5	52.2 ^{ab}	41.00-62.00

^{a, b, c, d}, Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Se observa una mejor respuesta sobre el acrosoma, en la interacción dilutor agua de coco-raza Corriedale lo que nos indicaría que esta interacción si estaría influyendo sobre el acrosoma de los espermatozoides; esto probablemente ocurra gracias a la influencia del diluyente agua de coco que le estaría brindando una mejor protección al espermatozoide; este dilutor que es pobre en fosfolípidos pero rica en moléculas orgánicas complejas, tales como prolina, glicina, ácido glutámico y ácido 3 – indol – acético (IAA); que protegerían y prolongarían la vida útil de los espermatozoides, basándose en la protección de la membrana espermática y reforzando su estructura molecular, logrando también proteger al acrosoma (Nunes y Combarrous, 1995) además que este dilutor agua de coco parece tener un mejor desempeño para el procesamiento en fresco y refrigerado.

4.3. INTEGRIDAD DE MENBRANA EN SEMEN DESCONGELADO

4.3.1. Efecto del dilutor sobre la integridad de membrana celular en semen descongelado

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de espermatozoides con membrana celular intacta en semen diluido con tres dilutores descongelado, evaluada a través de la prueba de hipoosmosis (HOST).

Tabla 7. Efecto del dilutor sobre el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta a la descongelación.

Dilutor	n	Membrana espermática intacta (%)	Valores extremos (%)
Tris	15	34.47 ^a	16.00-51.00
Agua de coco	15	24.73 ^b	15.00-42.00
Leche UHT	15	20.93 ^b	9.00-36.00

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Esta superioridad mostrada por el dilutor Tris frente a los demás dilutores podría ser debido al menor daño estructural a nivel de membranas y organelas de los espermatozoides durante los procesos de congelación y descongelación; el compuesto Tris tiene una gran acción buffer o tampón, que actúa dando estabilidad a la membrana al neutralizar al ácido láctico producto del metabolismo celular, manteniendo el pH del semen muy cercano a la neutralidad, además que el dilutor Tris tiene la propiedad de neutralizar los productos de desecho resultantes del metabolismo de los espermatozoides fundamentalmente las especies reactivas de oxígeno las cuales generan serios daños sobre la membrana celular (Salamon and Maxwell, 1995), es por esta razón que el Tris tendría una mejor respuesta en la protección de la membrana celular de los espermatozoides de carneros a la congelación.

La poca efectividad de los dilutores Agua de coco y Leche UHT como protectores de la membrana celular a la descongelación pueda deberse a que no tienen los mismos componentes que el dilutor Tris; el Agua de coco como dilutor tiene propiedades benéficas para el espermatozoide al procesamiento de semen fresco; este dilutor no estaría proporcionando una adecuada protección a la membrana del espermatozoide a la congelación-descongelación. Así mismo las proteínas de la leche que actúan como amortiguadores evitando los cambios de pH en semen refrigerado no estarían actuando igual a la descongelación desequilibrándose la estructura de la membrana del espermatozoide.

Se observan trabajos con resultados similares utilizando dilutor Tris, como lo reportado por Huamani,(2010) con 37.6%, Mamani,(2011) en época de invierno con 39.91%; ambos reportan datos similares, debido posiblemente a las condiciones parecidas donde se realizaron los trabajos; finalmente comparado con Pérez (2010), que evaluó el efecto de tres diferentes temperaturas de congelación quién obtuvo 35.86% para -80°C , 36.97% para -100°C , 41.14% para -120°C y 37.88% en el grupo control; esta ligera superioridad para el grupo de -120°C se puede deber por el control estricto en la curva de congelación que tendría también un efecto benéfico sobre la integridad de membrana del espermatozoide

Sin embargo Sandoval (2005) reporta resultados superiores 62.7% de espermatozoides que tuvieron respuesta positiva a la prueba de hiposmosis quien también utilizo dilutor Tris y Trealosa, esta diferencia probablemente sea por la acción de la Trehalosa que interactúa con la membrana celular del espermatozoide, reemplazando el agua alrededor de los fosfolípidos, previniendo el daño de esta durante la deshidratación celular a la congelación (Aisen, *et al.*2002), comparado con lo reportado por Santiani *et al.* (2007) quienes lograron un 40.53% de

espermatozoides de membrana celular intacta, probablemente se deba a la acción del antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempo), el cual impide la producción de radicales de oxígeno, evitando la peroxidación lipídica de la membrana espermática, confiriéndole así una mayor protección a la membrana plasmática. Así mismo Cabrera *et al* (2010) quienes reportan porcentajes mayores 43.56%, utilizando dilutor Tris con la adición de yema de huevo de codorniz esto posiblemente se deba al uso de la yema de huevo de codorniz que se caracteriza por ser mas rica que la yema de huevo de gallina en fosfatidilcolina y por tener una relación baja de ácidos grasos saturados e insaturados (Trimeche *et al.* 1997) los cuales estarían ejerciendo la protección adecuada al espermatozoide gracias a la adhesión de las lipoproteínas de baja densidad a la membrana espermática.

4.3.2. Efecto de la raza sobre la integridad de la membrana espermática en semen descongelado

Los porcentajes de espermatozoides con membrana espermática intacta, observados según efecto de la raza sobre la integridad de membrana de los espermatozoides en semen descongelado se observa en la tabla 8.

Tabla 8. Efecto de la raza sobre el porcentaje de espermatozoides con membrana celular intacta a la descongelación.

Raza	n	Membrana espermática intacta (%)	Valores extremos (%)
Criollo	15	29.13 ^a	17.00-42.00
Corriedale	15	21.73 ^b	9.00-41.00
Texel	15	29.27 ^a	10.00-51.00

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Se observa superioridad por parte de las razas Criollo y Texel sobre la integridad de la membrana espermática frente a la raza Corriedale; no existen publicaciones o

referencias bibliográficas que especifiquen el por que de las diferencias entre razas; sin embargo, según los resultados de este estudio podemos asumir que el criollo podría tener una mejor respuesta a la congelación consecuencia de su mayor rusticidad y adaptación al medio ambiente local, por otro lado el Texel resultado de la hibridación del Criollo y Texel puro podría tener además un efecto de vigor híbrido que podría estar influyendo en una buena calidad seminal, por tanto una mejor capacidad reproductiva. Es por esta razón que las razas Criollo y Texel tendrían una mejor respuesta.

Los porcentajes obtenidos comparado con trabajos parecidos sobre todo en el uso de carneros de la misma raza, muestran ser inferior a lo reportado por Huamani (2010), quien trabajo con las razas Criollo, Corriedale y Merino y a diferentes temperaturas de empajillado (20°C y 5°C) , obteniendo 40.84%, 38.40% y 36.79% respectivamente; también es inferior a lo reportado por Mamani (2011), quien utilizo carneros de las razas Corriedale ,Merino y Criollo obteniendo 39.69%, 39.66% y 46.84% respectivamente. Esta superioridad, de ambos autores, podría deberse al efecto de la época reproductiva a comparación de este trabajo que se realizó fuera de época, la estación reproductiva influye en la calidad espermática; del mismo modo se le puede atribuir a que los autores solo utilizaron un solo dilutor que fue Tris-yema de huevo, a comparación con este trabajo que utilizo tres diferentes dilutores.

Algo en común que tienen los resultados de Huamani y Mamani con el presente trabajo es que el mayor porcentaje de espermatozoides con la membrana espermática intacta lo obtiene la raza Criolla, lo que respaldaría que la raza Criolla por su característica de mayor rusticidad y adaptación también influiría en la calidad seminal.

4.3.3. Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre la integridad de membrana celular en semen descongelado

La tabla 9 se muestra los porcentajes para el efecto de interacción del dilutor-raza sobre la integridad de membrana de los espermatozoides a la prueba de hiposmosis.

Tabla 9. Efecto de la interacción dilutor-raza sobre la integridad de la membrana espermática (%) a la descongelación

Dilutor	Raza	n	Membrana espermática intacta (%)	Valores extremos (%)
Tris	Criollo	5	35.4 ^b	31.00-41.00
	Corriedale	5	23.0 ^c	16.00-41.00
	Texel	5	45.0 ^a	38.00-51.00
Agua de coco	Criollo	5	28.6 ^c	20.00-42.00
	Corriedale	5	23.8 ^c	18.00-28.00
	Texel	5	21.8 ^c	15.00-29.00
Leche UHT	Criollo	5	23.4 ^c	17.00-28.00
	Corriedale	5	28.4 ^c	9.00-25.00
	Texel	5	21.0 ^c	10.00-36.00

^{a, b, c} Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Se observa una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en las diferentes interacciones dilutor-raza sobre la integridad de la membrana espermática en semen descongelado, lo que nos indicaría que existe influencia por parte de esta interacción sobre esta característica, especialmente la interacción dilutor Tris raza Texel, esto debido a que el dilutor tris tiene un mejor efecto protector a la congelación y que los carneros de la raza texel a ser híbridos tienen una buena adaptabilidad y rusticidad que influiría en la calidad seminal.

4.4. ACROSOMA EN SEMEN DESCONGELADO

4.4.1. Efecto del dilutor sobre la integridad del acrosoma en semen descongelado

En la tabla 10 se muestra el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto, mediante la prueba de Tinción Giemsa, en semen descongelado.

Tabla 10. Efecto del dilutor sobre el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto a la descongelación.

Dilutor	n	Acrosoma intacto (%)	Valores extremos (%)
Tris	15	24.33 ^a	17.00-33.00
Agua de coco	15	24.00 ^a	11.00-35.00
Leche UHT	15	28.20 ^a	11.00-48.00

^a. Letras iguales en la misma fila no difieren significativamente ($P \geq 0.05$)

Se observan porcentajes que no muestran diferencia estadística entre dilutores ($P \geq 0.05$), pero si se observa una ligera ventaja numérica mostrada por el dilutor Leche UHT.

En los diferentes dilutores se muestra el porcentaje de espermatozoides fertilizantes (vivos con acrosoma intacto), que fue muy bajo, lo cual posiblemente sea atribuido a que las estructuras de la célula sean más sensibles a los cambios de temperatura siendo dañados por el proceso de crio conservación. El aumento excesivo de espermatozoides con el acrosoma dañado a la descongelación pudiera indicar algún problema en la composición lipídica de la membrana anormal que incide en una mayor susceptibilidad del espermatozoide al enfriamiento o al proceso de congelación Vera (2003).

Los resultados obtenidos para los tres dilutores fue ligeramente superior a lo reportado por Sandoval (2005), que obtuvo un 23.22% de espermatozoides con acrosoma intacto, esta diferencia puede deberse al tipo de dilutor y combinación de

crio protector que utilizo el investigador comparado con este trabajo; fue la combinación de leche descremada con Trehalosa, lo cual indicaría que los altos niveles de calcio presente en la leche afectarían negativamente la acción crio protectora de la Trealosa, lo que alteraría la estabilidad de las membranas de los espermatozoides durante el congelamiento. Comparado con lo reportado por Ruiz (2005) que obtuvo 22.69%, podemos indicar que el mencionado autor utilizo un tipo de antioxidante Tempol en una concentración de 2.5nM, la alta concentración de este tipo de antioxidante disminuiría la motilidad, viabilidad y el acrosoma del espermatozoide a la descongelación. Así mismo en el mismo estudio existe una marcada superioridad que fue de 68.86% de espermatozoides con el Acrosoma intacto, utilizando otro tipo de antioxidante Tempo en una menor concentración 0.5mM que actuaría inhibiendo el daño oxidativo.

Comparado con los resultados de Buitrago y Perez (2008), quienes utilizaron dos diferentes dilutores leche descremada y Tris son similares obteniendo como promedio general para ambos dilutores 28.28% de espermatozoides con acrosoma intacto.

El porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto a la descongelación es inferior a lo reportado por Valdez (2013) quien trabajo con diferentes dilutores comerciales obteniendo 44.97%, 39.72%, 46.00% y 50.60% para dilutores Andromed, Andromed+DSI, Triladyl, y Triladyl+DSI respectivamente, esta marcada superioridad pueda deberse a que los dilutores utilizados son comerciales además de la adición de una sustancia surfactante DSI la cual aumenta la solubilidad de los fosfolípidos de la yema de huevo, mejorando así la capacidad de protección a la membrana espermática y acrosomal de los espermatozoides contra

el choque térmico y las alteraciones promovidas por el proceso de crío conservación.

4.4.2. Efecto de la raza sobre el acrosoma en semen descongelado

Los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intacto observados según el efecto de la raza a la descongelación se observa en la tabla 11.

Tabla 11. Efecto de la Raza sobre el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto a la Descongelación.

Raza	n	Acrosoma intacto (%)	Valores extremos (%)
Criollo	15	20.93 ^b	11.00-30.00
Corriedale	15	29.53 ^a	21.00-48.00
Texel	15	26.07 ^{ab}	11.00-36.00

^{a, ab, b} Letras diferentes en la misma fila difieren significativamente ($P \leq 0.05$)

Existe una ligera superioridad mostrada por parte de las razas Corriedale y Texel frente a la raza Criolla, lo cual nos indica que si existe un efecto de la raza sobre la integridad del acrosoma a la descongelación, asumiendo que el acrosoma de los espermatozoides de estas razas serian mas resistentes al proceso de criopreservación; no se reportan publicaciones o estudios que mencionen el porque de esta influencia.

4.4.3. Efecto de la interacción del dilutor y la raza sobre el acrosoma en semen descongelado

En la tabla 12 se observan los porcentajes de espermatozoides con el acrosoma intacto como consecuencia de la interacción del tipo de dilutor y de la raza de carnero, en semen descongelado.

Tabla 12. Efecto de la interacción dilutor-raza sobre el acrosoma a la Descongelación.

Dilutor	Raza	n	Acrosoma intacto (%)	Valores extremos (%)
Tris	Criollo	5	22.4	17.00-29.00
	Corriedale	5	26.6	21.00-33.00
	Texel	5	24.0	21.00-27.00
Agua de coco	Criollo	5	15.8	11.00-21.00
	Corriedale	5	29.4	27.00-32.00
	Texel	5	26.8	19.00-35.00
Leche UHT	Criollo	5	24.6	18.00-30.00
	Corriedale	5	32.6	22.00-48.00
	Texel	5	27.4	11.00-36.00

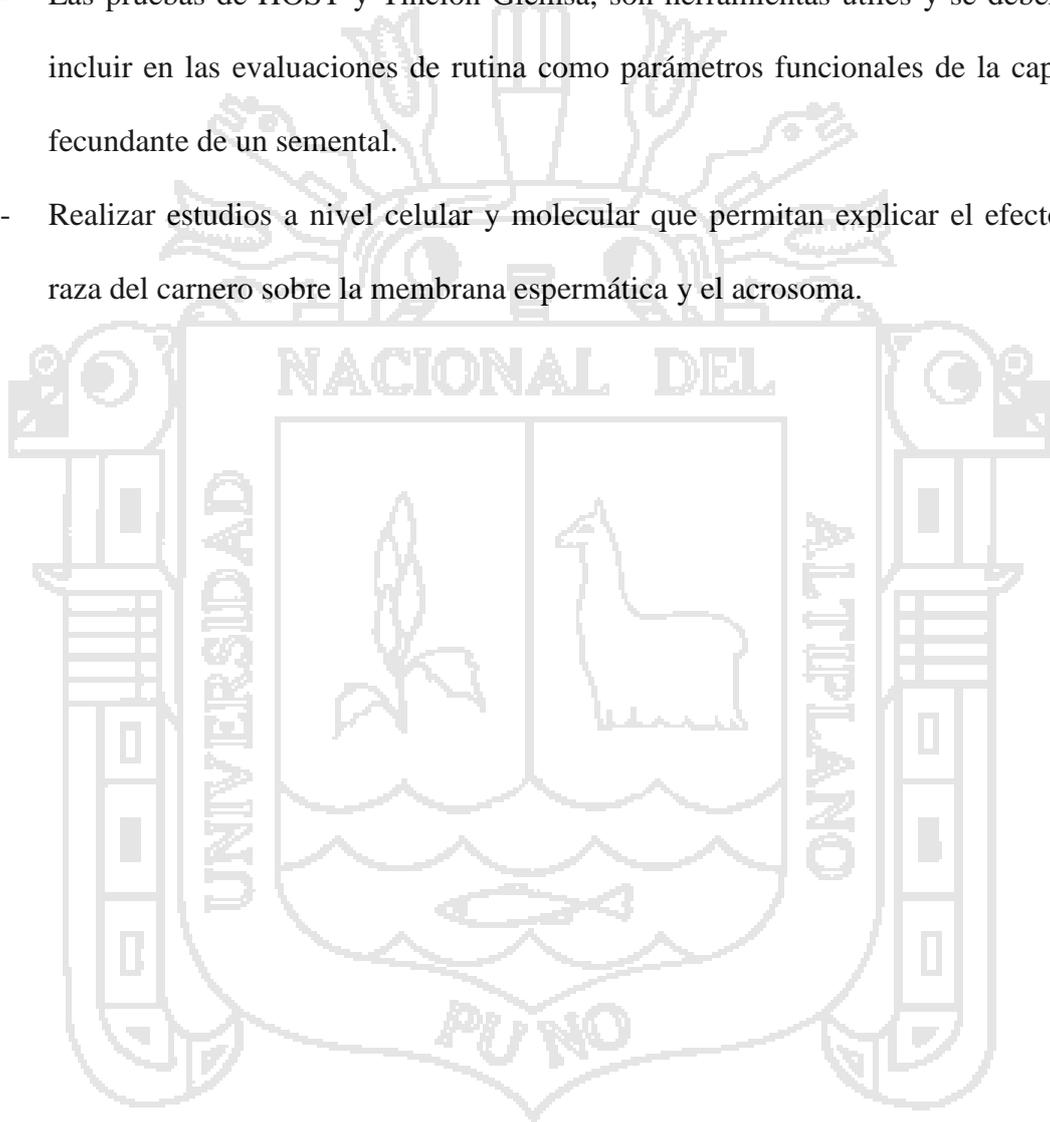
No se observa diferencia significativa ($P>0.05$) en las diferentes interacciones entre el factor dilutor y raza del carnero, sobre la integridad de membrana espermática; asumiendo que el acrosoma de los espermatozoides no estarían influenciados por la interacción de los dos factores evaluados.

V. CONCLUSIONES

- En semen refrigerado a 5°C el dilutor Tris muestra un mejor efecto protector sobre la membrana espermática y acrosomal; así mismo, son las razas Criollo y Texel las que mantienen intacto la membrana espermática en un mayor porcentaje; mientras que un mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto fue observado en la raza Corriedale.
- En semen congelado-descongelado el dilutor Tris fue el que mostro un menor daño en la membrana espermática, no existiendo diferencia significativa entre dilutores para la integridad de acrosoma; en cuanto al efecto raza, Criollo y Texel fueron los que se comportaron mejor manteniendo su membrana intacta en un mayor porcentaje respecto del Corriedale; de otro lado la raza Corriedale fue la que mejor respuesta tuvo sobre la integridad del acrosoma.
- Para las interacciones a 5°C solo hubo diferencia significativa para acrosoma siendo la interacción dilutor agua de coco-raza Texel la que mostro un mayor porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto; en semen congelado-descongelado la interacción dilutor Tris-raza Texel tuvo un mejor efecto sobre la membrana espermática.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar el dilutor Tris-yema de huevo para refrigerar y congelar semen de carneros.
- Las pruebas de HOST y Tinción Giemsa, son herramientas útiles y se deberían de incluir en las evaluaciones de rutina como parámetros funcionales de la capacidad fecundante de un semental.
- Realizar estudios a nivel celular y molecular que permitan explicar el efecto de la raza del carnero sobre la membrana espermática y el acrosoma.



VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Aisen, E.; V. Medina, and A. Venturino, 2002. Cryopreservation and post – thawed fertility of ram frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801 – 1808.}
- Amann, R. J. Graham, A. McKinnon, and J. Voss. 1993. Spermatozoal function Equine Reproduction, Philadelphia, Lea &Febiger, 715-45.
- Anel, E. 1990. Inducción experimental de la nucleación en la congelación del semen de morueco: Efectos sobre motilidad, endósmosis celular e integridad acrosómica. Tesis Universidad de León.
- Andrabi, S., 2007. Fundamental principles of cryopreservation and a review of bos taurus and bos indicus bull spermatozo. Mini review. *Int. j. Agri., and Biol.*; 9: 367-369
- Ávila, C. 2008. Efecto de la dilución, refrigeración y criopreservación del semen ovino sobre cambios celulares relacionados con la capacitación espermática. Tesis de Maestría, Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua- México.
- Bailey, J. and M. Buhr. 1994. Cryopreservation alters the Ca⁺⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 74, 45-51.
- Bailey, J., J. Bilodeau and N. Cornier. 2000. Semen Cryopreservation in domestic animals: A damaring and capacitating phenomenon. *J. Androl.*; 21:1-7.
- Baumber, J., B. Ball, J. Linfor, and S. Meyers. 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl.* 24, 621-628.
- Bearden, H. J., and J. W. Fuquay. 1997. *Appllied Animal Reproduction*. New Jersey: Prentice-Hall, 4^a ed., 307p.

- Bittencourt, R., A. Ribeiro, A. Santos, and R. Furst. 2004. Freezing goat semen with glycerol and ethylene glycol as the cryoprotective agents. In 15th International Congress on Animal Reproduction. Brazil.
- Boiso, I. 2001. Principios básicos de criobiología. Revista Iberoamericana de Fertilidad. 18, 127-131.
- Buitrago, J. and L. Perez. 2008. Comparación de dos diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Tesis de pregrado. Facultad de medicina veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá- Colombia.
- Cabrera, P.; J. Orellana, and C. Pantoja. 2010. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. Rev Inv Vet Perú. 21 (2): 154-160.
- Cabrera, P., A. Ayulo, and C. Pantoja 2011. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. Rev Inv Vet Perú 2011; 22 (2): 105-113
- Colas, G., Y. Guerin, M. Briois, and R. Ortavani. 1980. Photoperiodic control of testicular growth in the ram lamb. Anim. Repro. Sci. 13, 255-262.
- Córdova, A., S. Cortez, C. Córdova, M. Méndez, and M. Juárez. 2015. Efecto de tres diluyentes sobre la calidad espermática del semen ovino refrigerado.
- Curry, M.. 2000. Criopreservation of semen from domestic livestock. Reviews of Reproduction. 5, 46-52.
- Chatterjee, S., E. De Lamirande, and C. Gagnon. 2001. Cryopreservation alters membrane sulphhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. Mol. Reprod. Dev., 60: 498-506.
- Darin Bennett, A. and I. White. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. Cryobiology 14,466-70

- De Alba, J. 1985. Reproducción Animal. Editorial La Prensa Medica Mexicana, México, D. F. 538 pp.
- Derivaux, J. 1982. Reproducción de los animales domésticos: I fisiología II el macho e inseminación artificial, III patología. Editorial Acriba S.A. Zaragoza- España.
- Dinatolo, E. F. 2011. Efecto de la trehalosa en la viabilidad de semen ovino refrigerado [en línea]. Trabajo Final de Ingeniería en Producción Agropecuaria. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Católica Argentina.
- Dobrins, E., L. Crowe, T. Berger, T. Anchoroguy, J. Oversteet, and J. Crowe. 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *Journal of Experimental Zoology*. 265: 432- 37.
- Dominguez, M., A. Falcinelli, F. Hozbor, E. Sanches, A. Cesari, and R. Albeiro. 2008. Seasonal variation in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology* 69. p 572
- El-Alamy, M., and R. Foote. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. *Animal reproduction science* 65: 245,254.
- Evans, G., and W. Maxwell. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras, Ed. Acriba S.A., Zaragoza. 192 páginas.
- Fernandez, M., S. Adan, C. Lopez, J. R. Justo, C. J. Rivero, J. J. Lama, and D. Rois. 2009. Caracterización Seminal de Moruecos de la Raza Ovella Gallega. *Archivos de Zootecnia*. 58 (Supl. 1): 533-536.
- Fiser, P.S., and G. J. Marcus. 1989. Continuous live-dead discrimination of ram sperm during freezing. *Carnete Res.* 22:301-305.
- Fiser, P., C. Hansen, H. Underhill, and G. Marcus. 1991. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. 28: 454-459.

- Foote, R. H. and J. E. Parks. 1993. Factors affecting preservation and fertility of bull semen: a brief review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5: 665-73.
- Foote, R. H. 2002. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Anim. Reprod. Sci.* 75:119 - 139.
- FUNCAP. 1999. Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico. Água de coco colabora com o melhoramento genético. Disponible en: www.funcap.ce.gov.br.
- Galina, C., A. Saltiel, and J. Valencia. 1988. *Reproducción de los animales domésticos*. 1ra Edición, Editorial Limusa Noriega Editores Mexico.
- Garner, D. L. and E. S. E Háfiez. 2000. Spermatozoa and Seminal Plasma. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds)., *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 96-109.
- Gibbons, A., M. Cueto, M. Wolf, J. Arrigo, J. Garcia. 2004. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. *Comunicación Técnica PA 200*. INTA. EEA Bariloche. 23 p.
- Gil, J., N. Lundeheim, L. Söderquist, and M. H. Rodríguez. 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology*. 59:1241-1255.
- Háfiez, E. S. E. 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds). *Reproduction in farm animals*, 7^{ma} edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp 431-442.
- Hammerstedt, R., J. Graham, and J. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11: 73-88.
- Huamani, H. 2010. Efecto de las temperaturas de empajillado y raza en la motilidad individual e integridad de membrana en semen congelado de carneros. Tesis

- pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
- Ishibashi, K.; M. Kuwanhara, Y. Gu, Y. Kageyama, A. Tohsaka, F. Suzuki, F. Marumo, and S. Sasaki. 1997. Cloning and functional expression of a new water channel abundantly expressed in the testis permeable to water, glycerol and urea. *Journal of Biological Chemistry*. 272, 20782–20786.
- Januskauskas, A., L. Johannisson, Soderquist, and H. Rodríguez-Martínez. 2000. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology* 53: 859-875.
- Jeyendran, R., H. Van der Venn, and L. Zaneveled. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. *Ach. Androl*. 29: 105-116.
- Lasso, J., E. Noiles, J. Álvarez, and B. Storey. 1994. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J. Androl*. 15, 255-265.
- Mamani, D. 2011. Efecto de dos agentes crioprotectores y tipo de envase sobre la motilidad e integridad de membrana del espermatozoide de carneros. Tesis pregrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano. Puno-Perú.
- Marti, E., L. Mara, J.I. Marti, T. Muiño-Blanco and J.A. Cebrián-Pérez. 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 67:1446 - 1454.
- Medeiros, C., F. Forell, A. Oliveira and J. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology* 57: 327-344.
- Meléndez, M.L. 2014. Caracterización seminal de tres razas ovinas baleares. Tesis de

Maestria. Universidad de Cordoba.

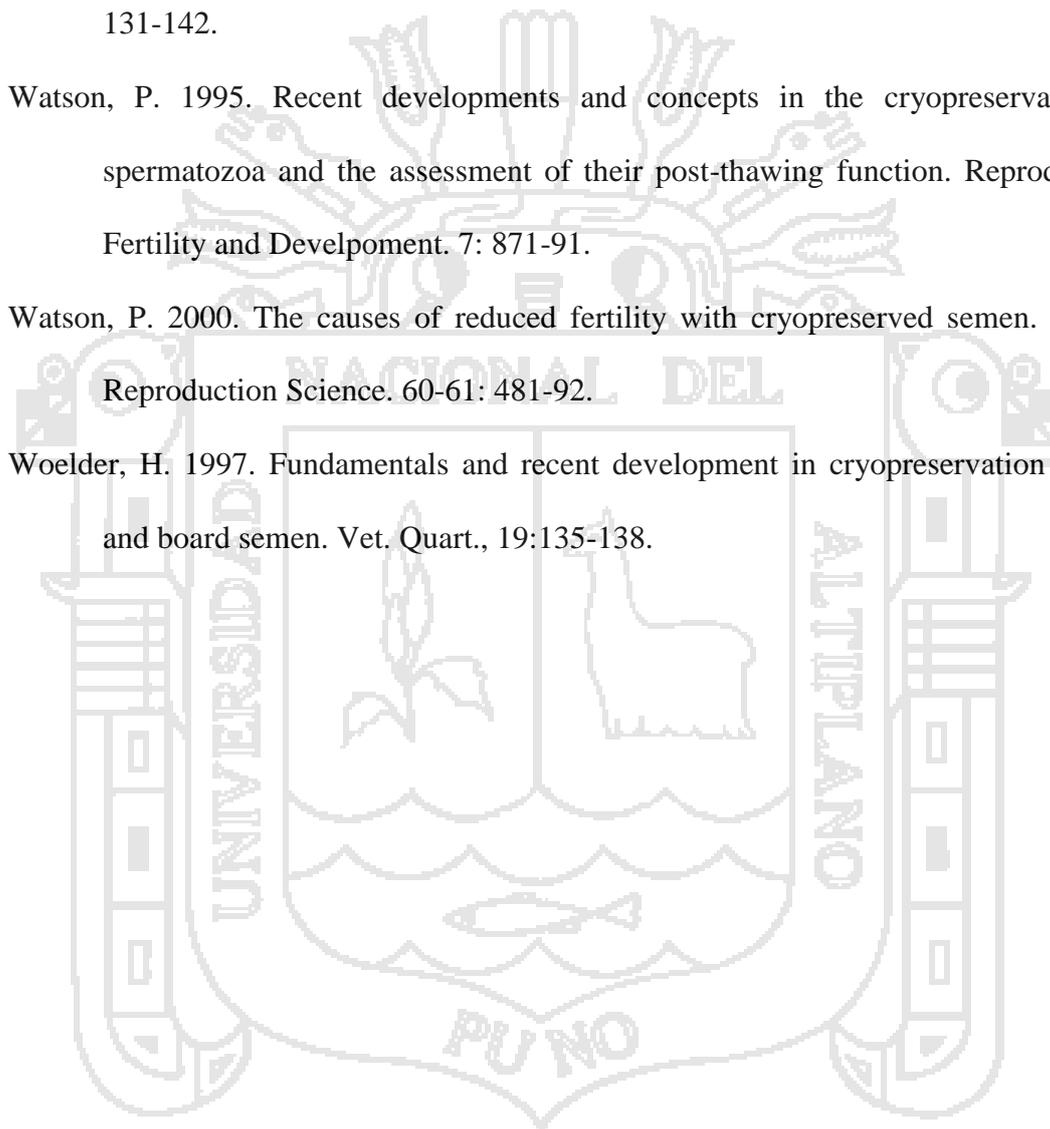
- Molinia, F., G. Evans, P. Quintana, and W. Maxwell. 1994. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, Acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 113-122.
- Morani, E., M. Roncoletta, K. Anciotto, P. Franceschini, and A. Tedesco. 2004. Production of reactive oxygen specie in bovine semen after freezing and thawing. 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil. 474p.
- Morel, M. 1999. Equine artificial insemination. Nueva York, CABI Publishing, 406 págs.
- Mylne, M., J. Hunton and B. Buckrell. 1997. Ovine Theriogenology. Citado por Youngquist, R. 1997. Current therapy in large animal theriogenology. United states of America. Saunder company. p. 569-650.
- Norman, C., C. E. Johnson, I. D. Porterfield, and S. R. Jr. Dunbar. 1958. Effect of pH on the life-span and metabolism of bovine sperm kept at room temperature. *J. Dairy Sci.* 41:1803.
- Nunes, J. F. A. 1986. Inseminación Artificial como método alternativo para el mejoramiento de la caprinocultura lechera. En: Simposio de Caprinocultura del estado de Rio.
- Nunes, J. F., Y. Combarous, and L. Priscila. 1994. Utilization d'une substance active (JYO) present dans léau de coco, pour la conservation in vitro et fertilité des spermatozoides de mammifers. S. N.
- Nunes, J. F., and Y. Combarous. 1995. Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos. 1994. In: Simpósio de

- Biotecnologia da Reprodução de Animais Domésticos, 1, Fortaleza, CE. Fortaleza, CE: SBRAD. 63p.
- Nunes, J. F. 1998. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais e do homem. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, 22:109-112.
- Nunes, J. F. and F. R. D. Fernández,. 2001. Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina. Gráfica y Editora 2M Ltda. , 105 Pp., Fortaleza-Ceará (Brasil)
- Peña, A., and C. Linde-Forsberg. 2000. Effects of spermatozoa concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology* 54: 703-718.
- Pérez, L.J., A. Valcárcel, M. A. De las Heras, D. Moses and, H. Baldassarre. 1996. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 46, 131-140.
- Pérez, G. 2008. Copias de cátedra inseminación artificial en ovinos y vacunos FMVZ – UNA – PUNO.
- Perez, U.H. 2010. Efecto de tres temperaturas de congelación de pajillas de semen de carnero en la viabilidad espermática. Tesis de Maestría. Facultad de Zootecnia de la Universidad Agraria la Molina. Lima Peru.
- Quispe, F. 2011. Manual de inseminación artificial en ovinos. FMVZ.UNAP. Puno – Perú.
- Randall, D., W. Burggren and K. French, 1997. *Animal physiology*. New York. W.H. Freeman and Company. p. 95.
- Ruiz, L.F. 2005: Efecto de dos antioxidants (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. Tesis de pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Mayor de San Marcos. Lima-Peru.
- Salamon, S. and W, Maxwell. 1995. Frozen storage of ram seme: Processing freezing

- thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Repro. Sci.* 37, 185-249.
- Salamon, S., and W. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Repro. Sci.* 62, 77-111.
- Saleh, R. and A. Agarwal. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl.* 23, 737-752.
- Salisbury, G. and N. Van Dermark. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial. De los bóvidos. Editorial Acriba. Zaragoza España.
- Samper, J., J Hellander and B. Crabo, 1991. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*; 44:107-114.
- Sandoval, R. S. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. Tesis de pregrado. Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Mayor de San Marcos. Lima-Peru.
- Santiani, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: Efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias mención en Biología de la Reproducción. Temuco-Chile. Universidad de la Frontera. p. 27-30.
- Santiani, A., F. Ruiz, R. Sandoval, S. Evangelista, M. Urviola, N. Catacora, L. Coronado y, A. Delgado. 2007. Incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (tempo) durante la criopreservación de semen. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano.
- SENAMHI, 2013. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología. <http://puno.senamhi.gob.pe/web/index.php?p=1021>.

- Silva, J. S. A. 1990. Utilização da água de coco e leiteglicozado como diluidor do sêmen ovino. Fortaleza. UECE, Monografía. Brasil.
- Sorensen, A. 1981. Reproducción animal principios y prácticas. 1ed. Mexico. Mc Graw Hill. 161p.
- Tamuli, M. and M. Watson. 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Rep. Sci.* 35, 247-254.
- Tribulo, H. 2009. Curso de congelado de semen bovino. Argentina. Instituto de Reproducción Animal Córdoba IRAC. Guía práctica. P 31-33.
- Trimeche, A. M. Anton, P. Renard, G. Gandemer, and, D. Tainturier. 1997. Quail egg yolk: a novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm *Cryobiology.* ;34(4):385-93.
- Tselkas, K., P. Saratsis, A. Karagianidis, and S. Samoulidis. 2000 Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed semen and their effects on some semen parameters. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 107, 69-72.
- Vale, W. G. 2011. Avances biotecnológicos en reproducción de búfalos, *Tecnología en Marcha*, Vol. 24, N° 5, Revista Especial, P. 89-104.
- Valdez, D. 2013. Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado. Tesis de Maestría. Facultad de ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca. Cuenca- Ecuador.
- Vasquez, I. 1980. Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores en ovinos y porcinos. Tesis doctoral. Universidad León.
- Vera, O. 2003. Evaluación seminal comparativa pre y post-congelación en machos bovinos. Capítulo XII. In: C. González-Stagnaro (Ed) *Reproducción Bovina*.

- Ediciones Astro data SA. Fundación GIRARZ, Maracaibo-Venezuela. Pp1-11.
- Wang, A., H. Zhang, I. Ikemoto, D. Anderson and K. Loughlin. 1997. Reactive oxygen generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49: 921-925.
- Watson, P., and A. G. Duncan. 1988. Effect of salt concentration and unfrozaen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology*; 25: 131-142.
- Watson, P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7: 871-91.
- Watson, P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 481-92.
- Woelder, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and board semen. *Vet. Quart.*, 19:135-138.



VIII. ANEXOS

Tabla 12. ANVA de la integridad de membrana espermática (IM) para semen refrigerado a 5°C.

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	IM 5°C Media
0.662423	14.97356	8.195527	54.73333

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	significancia
dilutor	2	3639.600000	1819.800000	27.09	<.0001	**
raza	2	1065.733333	532.866667	7.93	0.0014	**
dilutor*raza	4	39.466667	9.866667	0.15	0.9632	N.S
Error	36	2418.000000	67.166667			
Total corregido	44	7162.800000				

Tabla 13: Contrastación de medias de la prueba de Tuckey para dilutor

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	67.16667
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	7.3147

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	n	dilutor
a	67.333	15	Tris
b	49.933	15	Coco
b	46.933	15	Leche

Tabla 14: Contrastación de medias de la prueba de Tuckey para raza

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	67.16667
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	7.3147
Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.	



Tukey Agrupamiento	Media	N	raza
a	59.333	15	Criollo
a	56.867	15	Corriedale
b	48.000	15	Texel

Tabla 15: ANVA acrosoma intacto (AI) para semen a 5°C

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	AI Media
0.718234	13.56139	6.500427	47.93333

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	significancia
dilutor	2	323.333333	161.666667	3.83	0.0311	*
raza	2	1866.533333	933.266667	22.09	<.0001	**
dilutor*raza	4	1687.733333	421.933333	9.99	<.0001	**
Error	36	1521.200000	42.255556			
Total corregido	44	5398.800000				

Tabla 16: Contrastación de medias de la prueba de Tuckey para dilutor

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	42.25556
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	5.8018

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.				
Tukey Agrupamiento	Media	n	dilutor	
a	50.600	15	Tris	
b	48.933	15	Leche	
b	44.267	15	Coco	

Tabla 17: Contrastación de medias de la prueba de Tuckey para raza

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	42.25556
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	5.8018

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	n	raza
a	55.467	15	Corriedale
b	48.600	15	Texel
c	39.733	15	Criollo

Tabla 18: ANVA de la integridad de membrana espermática (IM) para semen descongelado.

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	IM Media
0.622189	26.01547	6.949021	26.71111

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	significancia
dilutor	2	1461.644444	730.822222	15.13	<.0001	**
raza	2	557.644444	278.822222	5.77	0.0067	**
dilutor*raza	4	843.555556	210.888889	4.37	0.0056	**
Error	36	1738.400000	48.288889			
Total corregido	44	4601.244444				

Tabla 19: Contrastación de Medias de la prueba de Tuckey para Dilutor.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	48.28889
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	6.2022

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	n	dilutor
a	34.467	15	Tris
b	24.733	15	Coco
b	20.933	15	Leche

Tabla 20: Contrastación de medias de la prueba de Tuckey para raza

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	48.28889
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	6.2022

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	n	raza
a	29.267	15	Texel
a	29.133	15	Criollo
b	21.733	15	Corrieda

Tabla 21: ANVA acrosoma intacto (AI) para semen descongelado.

R-cuadrado	Coef Var	Raíz MSE	AI Descongelado Media
0.373737	25.29247	6.452390	25.51111

Fuente	DF	Tipo I SS	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F	significancia
dilutor	2	163.5111111	81.7555556	1.96	0.1551	N.S
raza	2	561.6444444	280.8222222	6.75	0.0033	**
dilutor*raza	4	169.2888889	42.3222222	1.02	0.4118	N.S
Error	36	1498.800000	41.633333			
Total corregido	44	2393.244444				

Tabla 22: Contrastación de medias de la prueba de Tuckey para dilutor.

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	41.63333
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	5.7589

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	n	dilutor
a	28.200	15	Leche
a	24.333	15	Tris
a	24.000	15	Coco

Tabla 23: Contrastación de medias de la prueba de Tuckey para raza

Alpha	0.05
Grados de error de libertad	36
Error de cuadrado medio	41.63333
Valor crítico del rango estudentizado	3.45675
Diferencia significativa mínima	5.7589

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.			
Tukey Agrupamiento	Media	n	raza
a	29.533	15	Corrieda
b	26.067	15	Texel
b	20.933	15	Criollo

Grafico 1: Interacción plot integridad de la membrana espermática en semen descongelado.

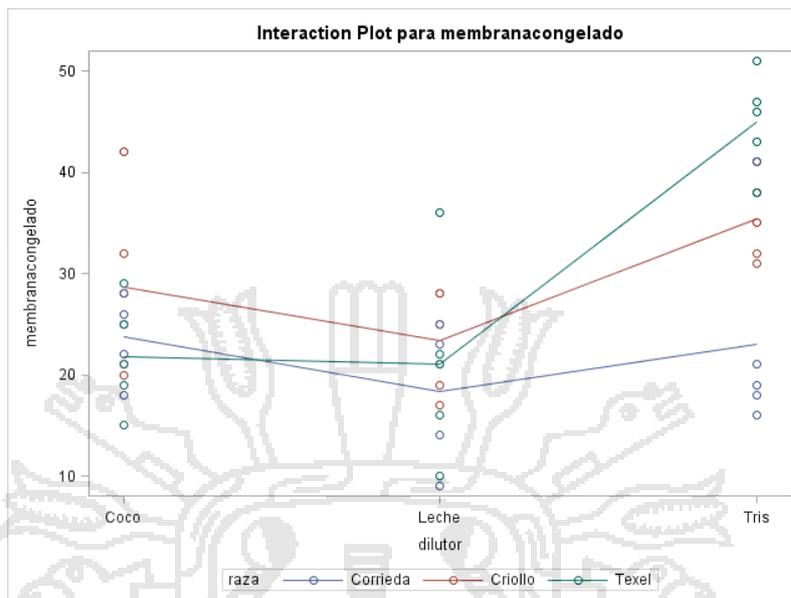


Grafico 2: Interacción plot acrosoma intacto a 5°C

