



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTECNIA

**“CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO DE LA RAZA
PELIBUEY Y BLACKBELLY EN LA PROVINCIA DE PASTAZA”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA ZOOTECNISTA

AUTORA: SANDRA PAULINA MULLO PAUCAR

DIRECTOR: Ing. CARLOS ANDRÉS MANCHENO HERRERA, Mag.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Sandra Paulina Mullo Paucar

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Sandra Paulina Mullo Paucar, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 04 de Julio del 2023




Sandra Paulina Mullo Paucar

C.I. 060496198-7

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
CARRERA ZOOTECNIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental “**CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO DE LA RAZA PELIBUEY Y BLACKBELLY EN LA PROVINCIA DE PASTAZA**”, realizado por la señorita: **SANDRA PAULINA MULLO PAUCAR**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Pablo Rigoberto Andino Najera, Mgs. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-07-04
Ing. Carlos Andrés Mancheno Herrera, Mag. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-07-04
Ing. Fabián Danilo Reyes Silva, PhD. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-07-04

DEDICATORIA

El actual trabajo de titulación se lo dedico a mis padres Rosa Paucar y José Mullo quienes hicieron posibles con grande esfuerzo y apoyo mi educación durante estos años, a toda mi familia y amigos que han estado presentes en cada momento de mi carrera por ser incondicionales en los momentos que más necesitaba.

Sandra

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios, por ayudarme a recordar que cada día difícil que puede existir en la vida hay que luchar y levantarse con más fuerza, a toda mi familia en especial a mis padres Rosa Paucar y José Mullo quienes cada día me enseñaron a no rendirme ante cualquier adversidad y hacer que este sueño de ser profesional se haga realidad. A los distinguidos profesionales con gratitud quiero expresar mi agradecimiento por brindar y compartir sus conocimientos conmigo y ayudar para que este trabajo de titulación se pueda realizar sin dificultades al Ing. Carlos Andrés Mancheno Herrera e Ing., Fabián Danilo Reyes Silva, gracias al proyecto PROPEA por incluirme en su trabajo de investigación y poder elaborar mi trabajo de titulación, gracias de corazón a todos.

Sandra

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA	2
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Justificación.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	3
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	3

CAPÍTULO II

2. Marco teórico	4
2.1. Producción ovina en Ecuador	4
2.2. Anatomía y fisiología reproductiva del ovino reproductor	4
2.2.1. <i>Testículos</i>	4
2.2.2. <i>Escroto</i>	5
2.2.3. <i>Epidídimo</i>	5
2.2.4. <i>Conducto deferente</i>	5
2.2.5. <i>Uretra</i>	6
2.2.6. <i>Pene</i>	6
2.2.7. <i>Glándulas accesorias</i>	6
2.3. Sistema regulador del aparato reproductor del macho	6
2.3.1. <i>Glándula pineal</i>	6
2.3.2. <i>Espermatogénesis</i>	7
2.4. Estructura del espermatozoide	7
2.4.1. <i>Cabeza</i>	7
2.4.2. <i>Acrosoma</i>	7

2.4.3.	<i>Núcleo</i>	7
2.4.4.	<i>Cola</i>	8
2.4.5.	<i>Membrana plasmática del espermatozoide</i>	8
2.4.6.	<i>Problemas en la membrana plasmática en el proceso de congelación</i>	9
2.5.	Métodos de recolección de semen en ovinos	9
2.5.1.	<i>Vagina artificial</i>	9
2.5.2.	<i>Electro eyaculador</i>	10
2.6.	Criopreservación de semen	11
2.6.1.	<i>Diluyente y sustancias crio protectoras</i>	11
2.6.2.	<i>Funciones de los diluyentes en la criopreservación de semen</i>	11
2.6.3.	<i>Diluyentes para la conservación de semen ovino</i>	11
2.6.4.	<i>Manipulación y almacenamiento de semen congelado</i>	12
2.6.5.	<i>Ciclodextrina</i>	12
2.6.6.	<i>Relación fosfolípido/colesterol en el semen</i>	13
2.7.	Evaluación del semen ovino en la pre-congelación (pruebas macroscópicas)	13
2.7.1.	<i>Volumen</i>	13
2.7.2.	<i>Olor</i>	14
2.7.3.	<i>Ph</i>	14
2.8.	Evaluación del semen ovino en la pre-congelación (pruebas microscópicas)	14
2.8.1.	<i>Motilidad masal (%)</i>	14
2.8.2.	<i>Motilidad individual (%)</i>	14
2.8.3.	<i>Vitalidad (%)</i>	15
2.8.4.	<i>Morfoanomalías (%)</i>	15
2.9.	Evaluación Posto- Congelación de semen (pruebas microscópicas)	15
2.9.1.	<i>Motilidad individual (%)</i>	15
2.9.2.	<i>Viabilidad espermática (%)</i>	15
2.9.3.	<i>Integridad de la membrana (%)</i>	16

CAPÍTULO III

3.	Marco metodológico	17
3.1.	Localización y duración del experimento	17
3.2.	Unidades experimentales	17
3.3.	Materiales, Equipos e Insumos	17
3.3.1.	<i>Materiales</i>	17
3.3.2.	<i>Materiales de laboratorio</i>	18
3.3.3.	<i>Equipos</i>	18

3.3.4.	<i>Insumos</i>	19
3.4.	Tratamientos y diseño experimental	19
3.5.	Mediciones experimentales	20
3.5.1.	<i>Evaluación macroscópica pre- congelación (semen fresco)</i>	20
3.5.2.	<i>Evaluación microscópica pre- congelación</i>	20
3.5.3.	<i>Evaluación post-congelación</i>	20
3.5.4.	<i>Determinación de costos</i>	21
3.6.	Análisis estadístico y pruebas de significancia	21
3.7.	Procedimiento experimental	21
3.7.1.	<i>Selección, preparación, elaboración de CLC y extracción de semen ovino</i>	21
3.8.	Metodología de la evaluación	22
3.8.1.	<i>Evaluación macroscópica pre-congelación</i>	22
3.8.2.	<i>Evaluación microscópica pre-congelación</i>	23
3.8.2.1.	<i>Motilidad masal (puntos)</i>	23
3.8.2.2.	<i>Motilidad individual (%)</i>	23
3.8.2.3.	<i>Vitalidad (%)</i>	24
3.8.2.4.	<i>Concentración espermática (millones spz/ml)</i>	24
3.8.2.5.	<i>Morfoanomalías (%)</i>	25
3.8.2.6.	<i>Pre-dilución del semen</i>	25
3.8.2.7.	<i>Estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides</i>	26
3.8.2.8.	<i>Envasado y sellado de pajillas</i>	26
3.8.2.9.	<i>Curvas de temperatura</i>	26
3.8.2.10.	<i>Congelación</i>	26
3.8.3.	<i>Evaluación espermática del semen post congelación</i>	27
3.8.3.1.	<i>Motilidad individual (%)</i>	27
3.8.3.2.	<i>Viabilidad espermática (%)</i>	27
3.8.3.3.	<i>Integridad de la membrana</i>	28
3.8.3.4.	<i>Morfoanomalías (%)</i>	28
3.8.3.5.	<i>Determinación de costos</i>	29

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1.	Valoración macro y microscópica del semen ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly pre-congelación en la Estación Experimental Pastaza	30
4.1.1.	<i>Valoración macroscópica</i>	30
4.1.1.1.	Volumen	30

4.1.1.2.	<i>Ph</i>	30
4.1.1.3.	<i>Aspecto</i>	31
4.1.1.4.	<i>Color</i>	31
4.1.1.5.	<i>Olor</i>	31
4.1.2.	Valoración microscópica	32
4.1.2.1.	<i>Motilidad masal (puntos)</i>	32
4.1.2.2.	<i>Motilidad individual (%)</i>	32
4.1.2.3.	<i>Vitalidad (%)</i>	33
4.1.2.4.	<i>Concentración espermática (millones spz/ml)</i>	33
4.1.2.5.	<i>Morfoanomalías (%)</i>	34
4.2.	Valoración del semen ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly post congelación aplicando Ciclodextrina Cargada de Colesterol en la Estación Experimental Pastaza	34
4.2.1.	<i>Motilidad individual (%)</i>	34
4.2.2.	<i>Viabilidad (%)</i>	37
4.2.3.	<i>Integridad de la membrana</i>	38
4.2.4.	<i>Morfoanomalías (%)</i>	41
4.3.	Determinación de costos	41

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
5.1.	Conclusiones	43
5.2.	Recomendaciones	44

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3-1:	Condiciones meteorológicas de la Estación Experimental Pastaza.....	17
Tabla 3-2:	Esquema del experimento	20
Tabla 3-3:	Esquema del ADEVA	21
Tabla 3-4:	Valoración de la Motilidad Individual Progresiva según la Sociedad Americana de Theriogenología.....	23
Tabla 4-1:	Valoración espermática de semen fresco de las razas Pelibuey y Blackbelly pre-congelación en la Estación Experimental Pastaza.....	30
Tabla 4-2:	Valoración microscópica de semen fresco de las razas Pelibuey y Blackbelly pre-congelación en la Estación Experimental Pastaza.....	32
Tabla 4-3:	Valoración del semen ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly post congelación aplicando Ciclodextrina Cargada de Colesterol en la Estación Experimental Pastaza.....	36
Tabla 4-4:	Costos de criopreservación de semen ovino.....	41

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 2-1:	Esquema anatómico del testículo del ovino.	5
Ilustración 2-2:	Esquema de la estructura del espermatozoide.	8
Ilustración 2-3:	Vagina Artificial usado en ovinos/caprinos.	10
Ilustración 2-4:	Electro eyaculador aplicado en un ovino.	10
Ilustración 2-5:	Ciclodextrina.	12
Ilustración 3-1:	Cámara de contaje celular neubauer.	24
Ilustración 4-1:	Regresión de la motilidad individual de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey.	35
Ilustración 4-2:	Regresión de la motilidad individual de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.	35
Ilustración 4-3:	Regresión de la viabilidad de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey.	37
Ilustración 4-4:	Regresión de la viabilidad de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.	38
Ilustración 4-5:	Regresión de la Integridad de la membrana de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey.	39
Ilustración 4-6:	Regresión de la Integridad de la membrana de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.	40


ÍNDICE DE ANEXOS


- ANEXO A:** VALORACIÓN SEMINAL MACROSCÓPICA (PRE- CONGELACIÓN)
- ANEXO B:** VALORACIÓN SEMINAL MICROSCÓPICA (PRE- CONGELACIÓN)
- ANEXO C:** MOTILIDAD INDIVIDUAL (POST-CONGELACIÓN).
- ANEXO D:** VIABILIDAD (POST-CONGELACIÓN).
- ANEXO E:** INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA (Post-Congelación).
- ANEXO F:** MORFOANOMALÍAS (Post-Congelación).
- ANEXO G:** ESTADÍSTICA DEL FACTOR A (RAZAS).
- ANEXO H:** ESTADÍSTICA DEL FACTOR B (NIVELES DE CLC).
- ANEXO I:** ADEVA DE LA REGRESIÓN MOTILIDAD INDIVIDUAL RAZA BLACKBELLY.
- ANEXO J:** ADEVA DE LA REGRESIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA RAZA BLACKBELLY.
- ANEXO K:** ADEVA DE LA REGRESIÓN: INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA DE LA RAZA BLACKBELLY.
- ANEXO L:** ADEVA DE LA REGRESIÓN DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL DE LA RAZA PELIBUEY.
- ANEXO M:** ADEVA DE LA REGRESIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA RAZA PELIBUEY.
- ANEXO N:** ADEVA DE LA REGRESIÓN: INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA DE LA RAZA PELIBUEY.
- ANEXO O:** EVALUACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA DEL SEMEN DE LA RAZA BLACKBELLY Y PELIBUEY PRE- CONGELACIÓN.
- ANEXO P:** EVALUACIÓN SEMINAL POST CONGELACIÓN DEL SEMEN OVINO DE LA RAZA BLACKBELLY Y PELIBUEY

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo la criopreservación de semen ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly en la provincia de Pastaza. En el desarrollo de la investigación sus tratamientos fueron, T0 (Diluyente +0,0 mg CLC), T1(Diluyente +0,5 mg CLC), T2(Diluyente +1,0mg CLC) , (Diluyente +1,5 mg CLC) y se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio de factores en donde el factor A=raza y el factor B= dosis de CLC (mg/120 millones de espermatozoides), se evaluaron 3 repeticiones (pajillas) por tratamiento; las técnicas estadísticas analizadas fueron estadística descriptiva en las variables macroscópicas en semen fresco ; volumen ml y pH del eyaculado se utilizó la estadística descriptiva (media y desviación estándar), para las variables microscópicas de semen pre-congelación (motilidad masal puntos, motilidad individual %, vitalidad %, concentración espermática millones spz/ml, morfoanomalías %) se utilizó la media y para las variables post congelación, motilidad individual %, viabilidad espermática %, integridad de la membrana, morfología % los datos obtenidos se tabularon con el programa Infostad donde se utilizó la separación de medias a través de la prueba de Tukey de $<0,05$. Dentro de los resultados obtenidos en las variables pre-congelación; no presentaron diferencias significativas mientras que en las variables post congelación no presentaron diferencias significativas sin embargo en la variable de la integridad de la membrana % existieron diferencias estadísticas significativas para los machos Pelibuey y Blackbelly con valores de T0:11,33%; T1:25,67%; T2:27,67%; T3: 18,67% y T0:18%; T1:38,33%; T2:25,7%; T3:22,33% respectivamente, el costo total fue de 594, 98 USD. Se concluye que el semen de los ovinos tuvo las mejores características para la congelación y la adición de CLC post congelación puede mejorar la integridad de la membrana del espermatozoide, no obstante, se recomienda utilizar diferentes niveles de CLC para contrastar los resultados obtenidos en el siguiente estudio.

Palabras clave: <CRIOPRESERVACIÓN>, <COLESTEROL>, <CICLODEXTRINA>, <INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA>, <SEMEN >.


Ing. Cristian Castillo



1582-UPT-DBRA-2023

ABSTRACT

The objective of this research was the cryopreservation of sheep semen of the Pelibuey and Blackbelly breeds in the province of Pastaza. In the development of the research, the treatments were TO (Diluent +0.0 mg CLC), TI (Diluent +0.5 mg CLC), T2 (Diluent+1.0 mg CLC), (Diluent +1.5 mg CLC) and a completely randomized design were applied with a combinatorial arrangement of factors where factor A= race and factor B = dose of CLC (mg/120 million spermatozoa), three replicates (straws) were evaluated per treatment. The statistical techniques analyzed were descriptive statistics for macroscopic variables in fresh semen. Descriptive statistics (mean and standard deviation) were used for the ml and pH of the ejaculate. For the pre-freezing microscopic semen variables (mass motility points, individual motility %, vitality %, sperm concentration million spz/ml, morpho-anomalies %), the mean was used, and for the post-freezing variables, individual motility %, sperm viability %, membrane integrity, morphology %. The data obtained were tabulated with the Infostad program, where the separation of means was used through the Tukey test of <math><0.05</math>. Among the results obtained in the pre-freezing variables, there were no significant differences, while in the post-freezing variables, there were no significant differences; however, in the variable of membrane integrity %, there were significant statistical differences for Pelibuey and Blackbelly males with values of TO:11.33%; T1:25.67%; T2:27.67%; T3: 18.67% and TO: 18%; T1:38.33%; T2:25.7%; T3:22.33%, respectively. The total cost was 594 98 USD. It is concluded that sheep semen had the best characteristics for freezing, and the addition of post-freezing CLC can improve sperm membrane integrity. However, using different levels of CLC to contrast the results obtained in the following study is recommended.

Keywords: <CRYOPRESERVATION>, <CHOLESTEROL>, <CYCLODEXTRIN>, <MEMBRANE INTEGRITY>, <SEMEN >.

1582-UPT-DBRA-2023



Dra. Gloria Isabel Escudero Orozco MsC.

C.I. 0602698904

INTRODUCCIÓN

La obtención y fraccionamiento del semen de un carnero genéticamente sobresaliente para su puesta en fresco permite acelerar la mejora de las características productivas de los rebaños, aumentando el número de crías obtenidas en relación con las que se obtendrían en monta natural. Las técnicas de congelación de material genético hacen aún más posible la propagación y diseminación de genes, así como su preservación por períodos de tiempo más largos (INTA, 2019, p. 2).

La criopreservación de semen y la inseminación artificial (IA) son técnicas que se aplican en la reproducción, por lo general se usan en la mayoría de las especies ganaderas, pero la inteligencia artificial mediante semen congelado es muy utilizada en ovinos, principalmente debido a las bajas tasas de fertilidad que se consiguen. La baja tasa de preñez puede deberse al perjuicio inducido a los espermatozoides a lo largo del proceso de criopreservación. Si en la membrana del espermatozoide se produce un daño esta alteraría su función metabólica, causando una baja capacidad del semen incluso llegaría a no servir para futuros proyectos reproductivos. Como resultado los espermatozoides no pueden sobrevivir en el aparato reproductivo de la hembra por largos períodos de tiempo provocando a que suceda una fecundación sin éxito (Ruiz, 2018, p. 3).

Varios estudios manifiestan que la adición de ciclodextrinas cargadas de colesterol directamente al semen puede aumentar la funcionalidad de la criopreservación de espermatozoides en algunas especies de interés ganadero. Para agregar colesterol, pueden usar oligosacáridos cíclicos llamados ciclodextrinas, que tienen una superficie exterior hidrófila y una superficie interior hidrófoba. Las ciclodextrinas pueden cargarse con colesterol antes de su inserción y, como tales, servirán como medio de transporte para incorporarse a las membranas plasmáticas de los espermatozoides antes de la congelación del material genético, generando una mejor función con respecto a su fluidez y seguridad frente a cambios osmóticos y cambios de temperatura que puede tener durante la criopreservación (Castillo, 2019, p. 34).

Esta investigación ayudará a la criopreservación del semen de pelo en la provincia de Pastaza utilizando una tecnología de congelación y conservación de la genética de los reproductores y mejorar las condiciones genotípicas de las futuras crías, a través de la congelación de semen se logrará almacenar el material genético durante largos periodos de tiempo tomando en cuenta la importancia de las condiciones técnicas que se usan en el cuidado de la criopreservación del semen para obtener mejores resultados en proyectos futuros.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

En la provincia de Pastaza, el 28,34% de la población económicamente activa se dedica a la agricultura, silvicultura, caza y pesca; sin embargo, esta actividad presenta como grandebilidad la inexistencia de datos de rendimiento y rentabilidad y la presencia de suelos frágiles, por tanto, la ganadería bovina es el rubro pecuario de mayor incidencia, la misma que revela una producción y productividad baja debido a la inaptitud del suelo y al inadecuado manejo; un alto porcentaje de personas (19.265) que trabajan en el sector agropecuario no perciben remuneración (GADPP_PDOT, 2018, p.118).

Como una potencial alternativa agropecuaria, aparece la crianza de los ovinos de pelo, que, según los productores agropecuarios, la falta de conocimientos y escasa información local sobre el manejo, sanidad, alimentación, producción y reproducción hace que los ovinos se manejen de manera tradicional, impidiendo un buen progreso de esta actividad pecuaria que posee grandes atributos (PROPEA, 2022, p. 6).

La criopreservación espermática es usado en todo el mundo como una herramienta fundamental en los programas de mejoramiento animal, su uso se constituye en un medio práctico para aumentar el tamaño genéticamente seguro de las poblaciones ganaderas, permitiendo de este modo mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie (Medina, Velasco, & Cruz, 2005, p. 8).

1.2. Justificación

La siguiente investigación tuvo por objetivo evaluar la calidad espermática del semen de los ovinos de pelo de la región amazónica de las razas Pelibuey y Blackbelly criopreservado con diferentes niveles de ciclodextrina cargada de colesterol en la provincia de Pastaza, la importancia de esta investigación es conservar la genética de un reproductor de alta aptitud genotípica para mejorar y almacenar sus espermias por un amplio tiempo guardando así su descendencia por años, el siguiente trabajo de investigación busca encontrar a que dosificación de CLC es la adecuada para conservar el espermia del ovino amazónico, consiguiendo así tener una eficacia al momento de realizar una inseminación artificial, mejorando la producción e incrementado la rentabilidad en una producción de ovinos de pelo.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Criopreservar el semen de ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly en la provincia de Pastaza.

1.3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la calidad espermática de semen ovino pre y post congelación sometido a los diferentes tratamientos.
- Utilizar varios niveles de ciclodextrina cargada de colesterol (0; 0,5; 1 y 1,5mg/120 millones de espermatozoides) como agente crioprotector en semen ovino criopreservado con un diluyente comercial.
- Determinar los costos de los diferentes tratamientos de la investigación.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Producción ovina en Ecuador

En la Amazonía ecuatoriana, el 82% de las tierras agrícolas son pastizales, lo que indica que la ganadería pertenece a los rubros más importantes para la economía campesina. En los últimos períodos de tiempo la ganadería ha experimentado un aumento monumental en la Amazonía ecuatoriana, lo que ha provocado el crecimiento de la deforestación y una frontera agrícola que tiene efectos adversos sobre los ecosistemas, un sistema de producción proteica sostenible cuyo desarrollo en la región fue lento, con 12.285 ovinos de 355.897 a nivel nacional en la región Amazónica. (Moyano, 2020, pp. 53)

2.2. Anatomía y fisiología reproductiva del ovino reproductor

2.2.1. Testículos

Los testículos son órganos endocrinos fácilmente palpables que irradian cambios en la estación y en la fisiología reproductiva del carnero, dichos órganos se encuentran ubicados cada uno en su propio compartimento y cada uno es una unidad completa y libre. Varias células especializadas, como las células de Leyding, están dispersas por los testículos para producir la hormona testosterona la misma que es esencial para la formación general de espermatozoides, la libido sexual y el mantenimiento de la funcionalidad testicular de los órganos secundarios como: próstata, vesículas seminales y glándulas de Cowper. La espermatogénesis aumenta con el peso y el diámetro testicular de los ovinos (Reinoso, 2014, p. 7).

En esta especie, es muy significativo la posición testicular ya que a la palpación del grosor epididimal y el volumen del parénquima son determinantes para la fertilidad. A simple perspectiva en las glándulas que producen mayor volumen de espermatozoides se aprecian las colas con mayor aumento de tamaño (Muñoz, 2019, p. 13).

Los testículos poseen dos funciones principales:

- a) Producir espermatozoides viables fértiles
- b) Producir las hormonas masculinas.

En la ilustración 1-2 se observan las partes anatómicas de los testículos del carnero.

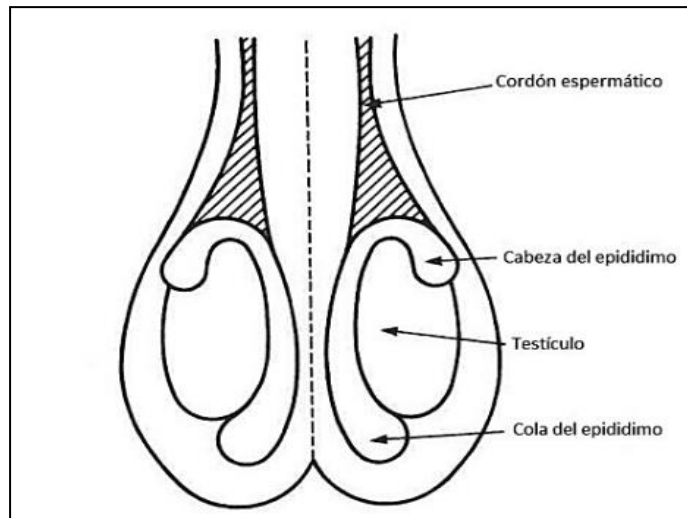


Ilustración 2-1: Esquema anatómico del testículo del ovino.

Fuente: (INIA, 2018, p. 3).

2.2.2. *Escroto*

Este órgano se encuentra cubierta de piel que sostiene y protege los testículos. Tiene una cantidad grande de glándulas sebáceas y sudoríparas para controlar la temperatura del escroto y funcionar correctamente en el ovino macho, así como en otras especies, deben mantener los testículos a una temperatura más baja que el resto del cuerpo, lo cual facilitará al escroto regular la temperatura de los testículos (Muñoz, 2019, p. 13).

2.2.3. *Epidídimo*

Según (Genovese, 2014, p. 10), el epidídimo está ubicado dentro de la bolsa escrotal en la parte principal del testículo del ovino, está compuesto por la cabeza, cuerpo y cola, su función principal es proteger, transportar y maduración de los espermatozoides.

2.2.4. *Conducto deferente*

Es un conducto pequeño que tiene regularmente forma de cilindro, está situado en la cola del epidídimo finalizando en la uretra, conectan el epidídimo con los conductos eyaculatorios interviniendo el recorrido del espermatozoides, es el encargado de Transporte y almacenamiento de espermatozoides (Galota, 2019, p. 21).

2.2.5. Uretra

De acuerdo (Reinoso, 2014, pág. 18), menciona a la uretra como un órgano urogenital que conduce orina y semen, está compuesto por dos partes; la parte pelviana y la peniana, la parte pelviana es donde se encuentra la uretra en la parte del piso pélvico y la parte peniana la cual está contenida por una capa de tejido eréctil juntas tienen como función excretora y reproductiva en el macho.

2.2.6. Pene

Es el órgano copulador del macho de tipo fibroelástico, rico en tejido cavernoso y eréctil, constituido por un extremo libre llamado glande, un cuerpo intermedio y una raíz, cubierto externamente por el prepucio, cuando se encuentra en estado de erección el pene cumplirá con la función de la eyaculación donde este se encarga de alojar el semen en el órgano reproductor de la hembra (Núñez, 2018, p. 5).

2.2.7. Glándulas accesorias

Las glándulas accesorias están compuestas por un grupo de secreciones exocrinas que aportan en su mayoría del plasma seminal, rico en hidratos de carbono, citratos, proteínas, aminoácidos, enzimas, vitaminas hidrosolubles y sustancias minerales. El plasma seminal es un medio acuoso particularmente apropiado para el desarrollo de las funciones vitales de los espermatozoides (Muñoz, 2019, p. 5).

2.3. Sistema regulador del aparato reproductor del macho

De acuerdo con (Muñoz, 2019, p. 20), el sistema reproductivo masculino de los mamíferos está basado de un complicado sistema de retroalimentación que involucra al hipotálamo, la hipófisis anterior y los testículos, ABP, proteína fijadora de andrógenos, proteína fijadora de andrógenos y testosterona, Estrógeno, Hormona estimulante del folículo, Gonadotropina, Testosterona y Hormona luteinizante. Todas estas hormonas cumplen diferentes funciones en el macho como generación del lívido, espermatogénesis, mantención del aparato reproductivo, formación de glándulas accesorias etc...

2.3.1. Glándula pineal

Citando a (Roa, 2018, p. 4), la función de la glándula pineal es la secreción de hormonas, especialmente la melatonina; que se libera en función de la presencia de estímulos del medio

exterior a través de cambios de luz; que actúan claramente en la actividad del pinealocito, impulsando en los períodos oscuros para la secreción de melatonina, en el ganado ovino la melatonina es una hormona que tiene relevancia al momento de que el macho realice la reproducción ya que debido a las variaciones de luz que puede tener el año va depender de la acción reproductiva del ovino.

2.3.2. *Espermatogénesis*

La espermatogénesis es donde principalmente se van a producir los espermatozoides dicha acción se realizará en los testículos del macho, antes de que se produzca la pubertad, la diferenciación celular se manifiesta primero por la presencia de espermatocitos primarios, que generalmente degeneran a la fase de paquiteno debido a que no existe producción hormonal. A medida que se acerca la pubertad, las espermatogonias comienzan a multiplicarse rápidamente, mientras que en el espacio intersticial las células mesenquimales también comienzan a diversificarse, dando lugar a las células de Leydig, existen tres fases en la formación de espermatozoides: génesis de espermatocitos, mitosis, meiosis, y maduración (Lozana, 2016, p. 27).

2.4. Estructura del espermatozoide

2.4.1. *Cabeza*

Desde un punto de vista de (Sandoval, 2007, p. 107), la cabeza del espermatozoide tiene una cabeza en forma de ovalo y mide aproximadamente entre 5 a 8 micras, consta de estructuras importantes como el acrosoma y el núcleo donde alojan el material genético de la especie el cual es responsable del aporte hereditario.

2.4.2. *Acrosoma*

De acuerdo con (Espejo, 2019, p. 4), el acrosoma se encuentra ubicado en la cabeza del espermatozoide, posee enzimas hidrolíticas y proteolíticas para la incrustación del semen en la fertilización.

2.4.3. *Núcleo*

Se encuentra en la cabeza del espermatozoide y es donde quedan condensados la mitad del número de cromosomas de la especie o la mitad información genética del futuro embrión. Esta parte es la única parte que penetra en el óvulo y por lo tanto es la parte más importante del esperma. Su

principal papel es fusionarse con el núcleo del óvulo para completar la composición genética de la nueva especie al nacer (Espejo, 2019, p. 4).

En la ilustración 2-2 se observa la estructura del espermatozoide.

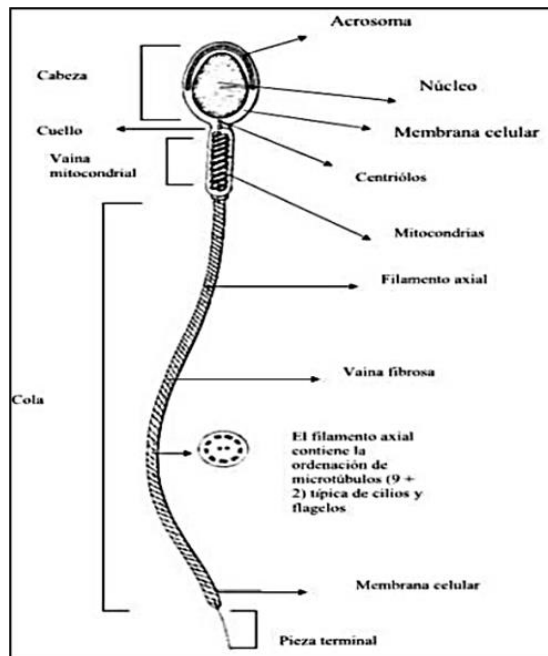


Ilustración 2-2: Esquema de la estructura del espermatozoide.

Fuente: (Valdéz, 2013, p. 22)

2.4.4. Cola

Según (Espejo, 2019, p. 3), la función principal es permitir la movilidad espermática mediante su movimiento ondeante el cual permitirá impulsar al espermatozoide hacia el óvulo. La cola de los espermatozoides puede tomar ciertos defectos los cuales son; cola corta, cola doble, cola enrollada, cola en forma de horquilla, cola doblada, cola gruesa e incluso rota, esto dependerá de la calidad de semen que se recolecte de la especie y posteriormente se analice en el laboratorio.

2.4.5. Membrana plasmática del espermatozoide

La membrana plasmática del semen es una estructura múltiple y dinámica que representa cinco comandos distintos: acrosoma, segmento ecuatorial, región post acrosómica, pieza intermedia y cola, adicional; interviene en el reconocimiento y transporte de moléculas con funciones específicas que permiten al espermatozoide se adapte a su metabolismo a su espacio próximo, el cual ayuda a reconocer al óvulo en la reproducción (Rubio, 2009, p. 2).

Otros pensadores (Salviano, 2011, p. 6), describen a la membrana plasmática el cual está contenido principalmente por: lípidos, proteínas y principalmente por fosfolípidos, colesterol y glúcidos. La membrana posee como base una doble capa de fosfolípidos y este varía de acuerdo con cada especie y estado fisiológico que presente. Los espermatozoides que posee todo mamífero están compuestos de membrana plasmática el cual rodeará al espermatozoide desde la cabeza hasta el flagelo.

2.4.6. Problemas en la membrana plasmática en el proceso de congelación

Los problemas que pueden reaparecer en la membrana plasmática del espermatozoide están relacionados principalmente con el proceso de congelación y descongelación del líquido seminal, lo que afecta significativamente la integridad estructural y funcional de los dominios de estas membranas, provocando un efecto de contaminación que empeora los resultados. de la evaluación de la motilidad, descongelación de viabilidad y viabilidad de espermatozoides (Rubio, 2009, p. 4)

2.5. Métodos de recolección de semen en ovinos

2.5.1. Vagina artificial

El método de la vagina artificial es el método más utilizado para obtener semen en ovejas. Está compuesto por un tubo cilíndrico de goma recubierto interiormente por una capa de látex unida a un cono también de látex, el cual se conecta a un tubo de recolección puede ser de vidrio o plástico en el cual se alojará la muestra de semen. El espacio que existe entre el tubo de goma y la funda se llena con agua caliente a una temperatura de 50 grados Celsius aproximadamente, lo que genera presión y temperatura en el pene del macho de la especie que se recolecta el semen en este caso el ovino. El método de la vagina artificial tiene ventajas y desventajas. Entre los primordiales están su parecido con la cópula o monta natural, y la habilidad fácil de su aplicación; Las desventajas incluyen la necesidad del acondicionamiento del macho durante un tiempo, el cual debe recibir un entrenamiento previo para se acostumbren al uso, cuya duración depende del carnero. El otro inconveniente es que con cierta frecuencia se observa la imposibilidad de la recolección de material genético cuando el animal tiene dificultades físicas o psíquicas el cual van a impedir la actividad de recolección (Ledesma, 2012, p. 40).

En la ilustración 3-2 se visualiza la vagina artificial que se usa en la recolección de semen en ovinos.



Ilustración 2-3: Vagina Artificial usado en ovinos/caprinos.

Fuente: (INIA, 2018, p. 2).

2.5.2. *Electro eyaculador*

Este método está asociado con un aparato en forma cilíndrica, el cual se introduce en el recto del macho, dicho objeto tiene 3 electrodos que guía los pulsos de voltaje. El objeto se encaja en el recto del animal con los electrodos orientados hacia la zona abdominal, los pulsos de mayor voltaje estimulan los nervios sensitivos y las glándulas vesiculares, lo que provoca la polución. Las desventajas incluyen una menor eficiencia en la recolección de espermatozoides, debido a un posible contacto con orina, porque la estimulación eléctrica puede causar un reflejo y hacer que el animal orine. Además, el uso inadecuado del equipo puede provocar un daño eyaculatorio por la mordacidad de la técnica o por una escasa estimulación de la mucosa rectal (Ledesma, 2012, p. 41).

En la ilustración 4-2 se muestra el uso del electro eyaculador en el carnero.



Ilustración 2-4: Electro eyaculador aplicado en un ovino

Fuente: (PROPEA, 2022, p. 11)

2.6. Criopreservación de semen

La criopreservación de semen es un método que permite conservar el material genético durante largos periodos de tiempo. Esta tecnología es una alternativa al establecimiento de bancos de genes para mantener la biodiversidad y asegurar la preservación de las especies. Durante el proceso de criopreservación, los espermatozoides están expuestos a varias condiciones desfavorables, haciéndolos susceptibles al choque térmico y al estrés osmótico, estas condiciones pueden provocar varios cambios estructurales y funcionales en los espermatozoides e incluso dañar la motilidad y las membranas de los espermatozoides (Guerrero, 2009, p. 14).

2.6.1. Diluyente y sustancias crio protectoras

Cuando se congela los espermatozoides estos para su supervivencia y prolongar el tiempo de vida necesitan de una dilución, dicha dilución de semen se elabora por motivos técnico, práctico y biológico (Ledesma, 2012, p. 48).

2.6.2. Funciones de los diluyentes en la criopreservación de semen

Según (Ledesma, 2012, p. 55) los diluyentes tienen las siguientes funciones.

- Ampliar el volumen del semen para que pueda ser utilizado en inseminaciones múltiples, aprovechando mejor los sementales.
- Prolongación de la vida media de ESPZ eyaculado.
- Proteger a los espermatozoides del golpe de frío.
- Mantener una presión osmótica y un equilibrio electrolíticos adecuados.
- Proporcionar nutrientes como fuente de energía.
- Mantener un equilibrio de pH adecuado.
- Evite el crecimiento bacteriano agregando antibióticos al diluyente.

2.6.3. Diluyentes para la conservación de semen ovino

Los diluyentes para la preservación de semen ovino en estado fresco se subordinan en diluyentes naturales y los diluyentes que provienen de cualquier casa comercial. Los primeros contienen al menos un componente de origen natural, mientras que los sintéticos no tienen ningún ingrediente natural y siempre se conoce con precisión su composición. Los diluyentes naturales incluyen leche entera, leche de vaca desnatada, en polvo o tratada a temperatura muy alta o yema de huevo,

que generalmente su función principal es la protección de la membrana del espermatozoide. Los diluyentes sintéticos contienen un tampón de pH, generalmente tris-[hidroximetil] aminometano y citrato. Tris es un compuesto alcalino que debe asociarse con citrato para mantener la viabilidad de los espermatozoides. Estos diluyentes también contienen una fuente de energía como glucosa o fructosa, y un crioprotector como el glicerol (Ledesma, 2012, p. 49).

2.6.4. Manipulación y almacenamiento de semen congelado

Las pajillas se almacenan en la porta pajuelas identificados anteriormente en las cestas del termo de nitrógeno líquido. Las pajillas se almacenan en cestas con elevadores. Se recomienda usar un tapón totalmente seco para acondicionar las pajillas en las cestas. Durante el almacenamiento en el período de congelación de semen, es importante controlar periódicamente cada 8 o cada 15 días para controlar el nivel de nitrógeno líquido en el termo, asumiendo que no debe estar por debajo de los 10 cm. Al manipular el semen en el termo, es importante no levantar las cestas por encima de la boca del termo ya que podría dañarse el material genético (Cueto, 2018, p. 22).

2.6.5. Ciclodextrina

Las ciclodextrinas son moléculas que forman oligosacáridos cíclicos con unidades de 6, 7 y 8 D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos α -1-4, denominadas ciclodextrinas α , β y γ respectivamente, últimamente reconocidas como excipientes para uso farmacéutico. Su estructura molecular es hidrófila por fuera y relativamente lipofílica por dentro y, de acuerdo con estas características, son capaces de formar complejos de inclusión mediante enlaces no covalentes, que estabilizan una amplia variedad de moléculas tanto en medios líquidos como sólidos, especialmente las ciclodextrinas, en las que se pueden insertar cavidades de partes o moléculas completas (Espinosa, 2005, p. 4).

En la ilustración 5-2 se observa la estructura de la ciclodextrina.

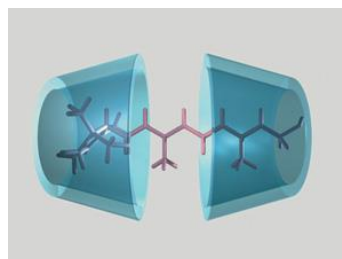


Ilustración 2-5: Ciclodextrina

Fuente: (López, 2011, p. 6)

Las ciclodextrinas son conocidas como la reina de la encapsulación molecular al ser una molécula muy simple se puede obtener de forma natural a través de enzimas microbianas, tienen forma de un anillo troncocónico, esta peculiar representación permite encapsular una gran variedad de moléculas orgánicas e inorgánicas, se denominan moléculas huésped ya que se encuentra dentro de su estructura interna (López, 2011, p. 8).

2.6.6. Relación fosfolípido/colesterol en el semen

La membrana está compuesta por una bicapa lipídica que consta de varios tipos de fosfolípidos, proteínas integrales y colesterol. Cada especie de fosfolípido tiene una temperatura de transición de fase diferente. Cuando la membrana experimenta una disminución de la temperatura, se produce un cambio en la fase de fosfolípidos de la fase de cristal líquido a la fase de gel y las cadenas de ácidos grasos que la componen se vuelven rígidas y paralelas. Cuando la membrana vuelve a su temperatura inicial, los fosfolípidos vuelven a su estado líquido, pero ni estos ni las proteínas vuelven a sus ubicaciones originales, lo que provoca un cambio en la función de la membrana plasmática. En consecuencia, se observa un aumento de la permeabilidad a los cationes y al agua, alteraciones en los procesos de difusión que involucran a las proteínas integrales, disminución de la actividad de las enzimas asociadas a la membrana, etc. El colesterol modula la fluidez de la membrana: por encima de la temperatura de transición de los lípidos que forman la membrana, el colesterol disminuye la fluidez de la membrana, mientras que cuando la temperatura desciende por debajo de la temperatura de transición, el colesterol tiene el efecto contrario (Guerrero, 2009, p. 23).

2.7. Evaluación del semen ovino en la pre-congelación (pruebas macroscópicas)

2.7.1. Volumen

El volumen va a depender del método de recolección y de las condiciones fisiológicas del carnero. El semen está compuesto por las secreciones de varias glándulas. Los testículos y el epidídimo aportan únicamente con el 5% del contenido principalmente compuesto por espermatozoides y testosterona, mientras que las glándulas del aparato reproductor masculino que producen una parte del semen aportan entre el 46% y el 80% cuyas enzimas son encargadas de la coagulación del semen y fructosa, la próstata entre el 13% y el 33% (sustancias diversas), incluido el antígeno prostático específico implicado en la licuefacción seminal y las glándulas bulbouretrales y uretrales entre el 2% y el 5% (Toro, 2009 p. 4). El volumen del ovino macho adultos según estudios se han demostrado que consta de 0,5 a 2ml, a diferencia del ovino joven de 0,5 a 0,7 ml. De

acuerdo con las investigaciones realizadas también se ha concluido que el mejor método de extracción y recolección de semen es a través de la vagina artificial (Valdéz, 2013, p. 30)

2.7.2. Olor

Según (Castro, 2022, p. 32), el olor se caracteriza a uno peculiar y único, el material extraído directamente desde un tubo de recolección puede tornarse con un aroma neutral, normal e incluso, en caso de haberse contaminado la muestra esta se adhiere con el olor de la orina, si el animal se encuentra en malas condiciones el olor cambiará a una putrefacción dando como resultado un animal enfermo.

2.7.3. Ph

El pH debe medirse en la primera hora después de la recolección de la eyaculación. Para ello, se aplica una gota de semen en el papel de pH y se toma la lectura en el lapso de 30 segundos. Los resultados pueden variar y estar entre 7,2 y 7,8. Valores de pH superiores a 7,8 indican infección o secreciones prostáticas anormales, mientras que valores inferiores a 6,5 o 7,0 en una muestra sin espermatozoides indican obstrucción del conducto eyaculador, conductos congénitos o anomalía bilateral. en caso de anomalías funcionales de las vesículas seminales (Toro, 2009, p. 6)

2.8. Evaluación del semen ovino en la pre-congelación (pruebas microscópicas)

2.8.1. Motilidad masal (%)

La motilidad masal del semen se evalúa por la fuerza del movimiento de las olas en una escala subjetiva que va de 0 a 5 (0, mínimo; 5, máximo). Para congelar la eyaculación, se recomienda que esta masa tenga una movilidad de 4 o superior (Cueto, 2018, p. 9).

2.8.2. Motilidad individual (%)

Desde el punto de vista de (INTA, 2019, p. 9), la evaluación de la motilidad espermática individual tiene como objetivo determinar el número de células con motilidad flagelar observadas en diferentes campos de un portaobjetos del número total de espermatozoides en el eyaculado obtenido con ayuda de un microscopio.

2.8.3. Vitalidad (%)

El parámetro de viabilidad de los espermatozoides es útil para determinar si los espermatozoides inmóviles están vivos o muertos. El porcentaje de espermatozoides vivos se puede determinar mediante varios métodos, uno de los cuales es la tinción con eosina (Toro, 2009, p. 8).

2.8.4. Morfoanomalías (%)

La morfología de los espermatozoides está relacionada directamente con la motilidad, por lo general, los espermatozoides en otro tipo de animales, como conejos, cerdos y ovejas, tienen forma de cabeza ovalada de forma regular, y cuando está sucia se aprecian zonas bien definidas como la zona acrosomal cubre más de un tercio cabeza y sub-acrosoma cubren toda la cabeza. (Ávalos, 2018, p. 10).

La morfología espermática se realiza en el laboratorio donde el frotis se realiza tomando una gota de la muestra de semen aplicando en el portaobjetos y seguidamente se aplica una solución de tinción, se deja secar, y la evaluación de la morfología se realiza bajo aceite de inmersión, los espermatozoides se visualizan de un color violáceo, las anomalías que generalmente se muestran son: mal formación de la cabeza, tamaño de la cabeza, doble cabeza, sin cola, cola quebrada, cola enrollada (Gómez, 2018, p. 4).

2.9. Evaluación Posto- Congelación de semen (pruebas microscópicas)

2.9.1. Motilidad individual (%)

El porcentaje de motilidad progresiva son determinados después de la descongelación del semen del carnero y luego de 2 horas de incubación, es necesario observar y examinar específicamente los espermatozoides que se mueven en dirección vertical, los espermatozoides que transitan en círculo o alrededor en un comportamiento inusual son espermatozoides que se consideran anormales. La relación que se muestra es el porcentaje de espermatozoides con la primera función rectilínea del número total de espermatozoides normales siendo valor más bajo es 50% (Gómez, 2018, p. 9).

2.9.2. Viabilidad espermática (%)

La viabilidad espermática es el factor más importante y tiende a disminuir si hay problemas con el almacenamiento de esperma. La vida del esperma después de la descongelación suele ser

delicada cuando la prueba muestra un alto nivel de contaminación y organismos inespecíficos, aunque no pueden causar enfermedades reproductivas, pueden afectar el rendimiento de los espermatozoides al competir con ellos por la obtención de nutrientes y de oxígeno (Rubio, 2009, p. 6).

2.9.3. *Integridad de la membrana (%)*

La integridad de la membrana plasmática ha sido uno de los parámetros de la valoración seminal más estudiados en cuanto a criopreservación seminal, el papel que cumple es ser el responsable de las interacciones celulares, metabolismo espermático e incluso está involucrado en la fecundación permitiendo la capacitación, la reacción acrosómica y la función con el oocito, estas actividades permiten y avalan la productividad del macho (Rubio, 2009, p. 5).

De acuerdo con (Guevara, 2013, p. 1) la integridad de la membrana del espermatozoide contribuye al reconocimiento y transporte de moléculas, tiene funciones que aseguran la adaptación del metabolismo del espermatozoide al medio circulante, proporcionando un sistema molecular para el reconocimiento del ovocito. De ello se deduce que durante el examen del espermatozoide se presta gran atención a la integridad de su MP, así como a la membrana acrosomal (AM); la posibilidad en algunos casos de examinarlos juntos o por separado usando tinciones blandas para observar a través de un microscópico.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Localización y duración del experimento

El presente proyecto de investigación se realizó dentro del proyecto PROPEA en la Estación Experimental Pastaza de la ESPOCH, ubicada en el Km. 34 vía Puyo - Macas. Se encuentra en las coordenadas, 01° 41'S 77°56'W, a una altitud de 1040 msnm. El trabajo experimental tuvo una duración de 8 semanas, en las cuales se realizaron las diferentes actividades como: selección de los machos reproductores, acondicionamiento de los animales, análisis de las diferentes variables, recolección y tabulación de datos.

Las condiciones climáticas de la Estación Experimental Pastaza se presentan en la tabla 1-3.

Tabla 3-1: Condiciones meteorológicas de la Estación Experimental Pastaza

Parámetros	Valores
Temperatura, °C	17
Precipitación	2233mm
Viento	6km/h

Fuente: (Pastaza, 2022).

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

3.2. Unidades experimentales

Para el desarrollo de la investigación, se trabajó con un total de 24 unidades experimentales (pajuelas evaluadas) las cuales fueron tomadas de los 4 tratamientos y 3 repeticiones realizadas por las 2 razas Blackbelly y Pelibuey.

3.3. Materiales, Equipos e Insumos

3.3.1. *Materiales*

- Overol
- Tijera
- Papel aluminio
- Guantes de nitrilo
- Botas

- Papel Desechable
- Esferos
- Libreta de apuntes
- Vagina artificial

3.3.2. *Materiales de laboratorio*

- Placas cubre objetos
- Placas porta objetos
- Caja Petri de vidrio
- Cámara de Neubauer
- Balón volumétrico de 100ml
- Micropipetas (0 – 10 μ L; 100 – 1000 μ L)
- Pipetas pasteur
- Papel Absorbente
- Papel tornasol o pH
- Tubos de ensayo
- Vaso de precipitación de 50 y 100 ml
- Pajuelas para envasar semen
- Alcohol polivinilo
- Goblets
- Tanque de nitrógeno líquido
- Jeringas de 1 y 10ml

3.3.3. *Equipos*

- Balanza analítica
- Microscopio óptico
- Placa calefactora
- Computadora
- Temporizador
- Vortex
- Baño María
- Horno calibrado a 37 grados centígrados
- Termómetro

3.3.4. *Insumos*

- Diluyente Triladyl
- Glucosa
- Ácido cítrico
- TRIS
- Cloroformo
- Colesterol
- Ciclodextrina
- Metanol
- Colorante eosina nigrosina
- Agua bidestilada
- Yemas de huevo frescos

3.4. **Tratamientos y diseño experimental**

En el presente estudio se utilizó un macho reproductor de la raza Pelibuey y uno de la raza Blackbelly, se extrajo el semen de los ovinos seleccionados, el mismo que fue evaluado macro y microscópicamente para determinar si es factible procesar, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio de factores, en donde el factor A fue la raza de los ovinos y el factor B fueron las dosis de Complejo Colesterol Ciclodextrina (CLC) (0, 0,5; 1,0 y 1,5 mg/120 millones de espermatozoides), se evaluaron 3 repeticiones (pajillas) por tratamiento, las cuales se ajustaron al siguiente modelo lineal aditivo:

$$\bar{Y}_{ij} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

\bar{Y}_{ij} : Valor estimado de la variable.

μ : Media general.

A_i : Efecto de las razas de ovinos.

B_j : Efecto de las dosis de CLC

AB_{ij} : efecto de la interacción entre AB

ϵ_{ijk} : efecto de la aleatorización

A continuación, en las Tabla 2-3 se muestra el esquema del experimento.

Tabla 3-2: Esquema del experimento

Raza	Diluyente + (CLC)	Código	REP (N° de pajuelas)	TUE*	TOTAL
Pelibuey	Diluyente +0 mg	PCLC0	3	1	3
Pelibuey	Diluyente +0,5 mg	PCLC0,5	3	1	3
Pelibuey	Diluyente +1 mg	PCLC1,0	3	1	3
Pelibuey	Diluyente +1,5 mg	PCLC1,5	3	1	3
Blackbelly	Diluyente + 0 mg	BCLC0	3	1	3
Blackbelly	Diluyente + 0,5 mg	BCLC0,5	3	1	3
Blackbelly	Diluyente +1,0mg	BCLC1,0	3	1	3
Blackbelly	Diluyente +1,5mg	BCLC1,5	3	1	3
			24		24

TUE: Tamaño de la unidad experimental

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

3.5. Mediciones experimentales

3.5.1. *Evaluación macroscópica pre- congelación (semen fresco)*

- Aspecto
- Volumen del eyaculado (ml)
- Color
- Olor
- Ph

3.5.2. *Evaluación microscópica pre- congelación*

- Motilidad masal (puntos).
- Motilidad individual (%).
- Vitalidad (%).
- Concentración espermática (millones spz/ml).
- Morfología (%).

3.5.3. *Evaluación post-congelación*

- Motilidad individual (%)
- Viabilidad espermática (%)
- Integridad de la membrana (%)
- Morfología (%)

3.5.4. *Determinación de costos*

- Total \$ por cada tratamiento

3.6. **Análisis estadístico y pruebas de significancia**

- En las variables macroscópicas de semen fresco pre-congelación como volumen de eyaculado y pH del eyaculado se utilizó la estadística descriptiva (media y desviación estándar).
- Para las variables microscópicas de semen fresco pre-congelación (motilidad masal, motilidad individual, vitalidad, concentración espermática, morfoanomalías) se utilizó la media.
- Para las variables post congelación de semen criopreservado se utilizó la separación de medias a través de la prueba de Tukey de $p < 0,05$.

En la tabla 3-3 se observa el esquema del ADEVA.

Tabla 3-3: Esquema del ADEVA

Fuente de variación	Grados de Libertad
Total	23
Razas	1
Niveles de CLC	3
Interacción AB	3
Error experimental	16

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

3.7. **Procedimiento experimental**

3.7.1. *Selección, preparación, elaboración de CLC y extracción de semen ovino*

- **Selección de los reproductores:** Los dos machos reproductores fueron previamente seleccionados en base a los registros de producción y reproducción para el presente trabajo experimental.
- **Preparación del reproductor:** Seleccionados a los reproductores que se utilizaron en el trabajo investigativo se procedió a la preparación mediante la administración de productos que garanticen la calidad del eyaculado para obtener un eyaculado de excelente calidad y adecuado para su posterior análisis.

- **Elaboración de la Ciclodextrina Cargada de Colesterol**
- En un tubo de ensayo se añadió 1ml de cloroformo +200mg de colesterol se homogeniza la solución con ayuda de un vórtex.
- En un tubo de ensayo se añadió 2 ml de metanol + 1 gramo de ciclodextrina se homogeniza la solución con ayuda de un vórtex.
- Del tubo de ensayo de: CHCl_3 +200mg de $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ se extrajo 450 μL de la solución y se pasa al tubo de ensayo de: CH_3OH + ciclodextrina el cual se mezcló con la ayuda de un vórtex se homogeniza la solución.
- Del tubo de ensayo de la solución final se colocó en una caja PETRY de vidrio y dejó incubar de 24 ha 48 horas en un horno a 36 – 37 grados centígrados.
- Preparación del medio TALP: En un balón de 100 ml se añadió 50 ml de agua bidestilada, a continuación, se añadió 2.27 g de TRIS, 1.19G de ácido cítrico y 0.36g de glucosa se disolvió bien la mezcla hasta obtener una solución completamente homogénea.
- **Extracción de semen:** Se incorporó a los reproductores de las dos razas Pelibuey y Blackbelly a un corral con las hembras en celo para posteriormente extraer el semen con ayuda de una vagina artificial la cual contendrá agua a 60 grados Celsius, se utilizó un lubricante no espermicida, el material seminal se colectó en un tubo falcon. Las ovejas fueron previamente sincronizadas mediante la administración de benzoato de estradiol.

3.8. Metodología de la evaluación

3.8.1. *Evaluación macroscópica pre-congelación*

- **Aspecto:** Dicho análisis se visualizó el semen en el estado que se encontró, el semen puede presentar 2 aspectos ya sea normal (granuloso) o anormal (líquido).
- **Volumen del eyaculado (ml):** Se utilizó un tubo graduado donde el valor se determinó a través de la lectura directa expresada en mililitros (ml).
- **Color:** Se evaluó por medio de la visualización directa del eyaculado dentro del tubo colector basado en los siguientes criterios: Blanco cremoso, blanco lechoso, transparente o translucido.
- **Ph:** Con papel tornasol se evaluó un Ph en donde se sumergió el papel en el eyaculado considerando un Ph normal, entre 6,2 y 6,8.

3.8.2. Evaluación microscópica pre-congelación

3.8.2.1. Motilidad masal (puntos)

Para la evaluación de la motilidad masal se tomó una microgota (5 µL) de semen fresco la cual se incorporó sobre una placa porta objetos a una temperatura de 37°C, se observó sin colocar el cubreobjetos con un lente de 10x para determinar este parámetro. La escala de medición correspondió al movimiento en masa de los espermatozoides en donde si se visualizó movimiento en ondas y vigorosidad se calificó con una puntuación de 5, pero si demostró lo contrario la puntuación ira disminuyendo.

3.8.2.2. Motilidad individual (%)

Para la evaluación de la motilidad individual se tomó una muestra con ayuda de una micropipeta limpia, 1 microgota (5 µL) de semen ovino fresco en una solución isotónica de NaCl- al 0,9% misma que se colocó sobre un portaobjetos a una temperatura de 37°C y será cubierta con un cubreobjetos; la observación se realizó en un microscopio óptico con un aumento de 40X, para la estimación se evaluó si más de la mitad de los espermatozoides que hay en el campo poseen movimiento o no, se observó espermatozoides que presentaron un movimiento en forma rectilínea a los cuales se los consideró normales, caso contrario los que se muevan en círculo se consideraron anormales.

El porcentaje se obtuvo de los espermatozoides con movimiento rectilíneo progresivo sobre el total de los espermatozoides observados en la placa, valores a ser comparados con la siguiente escala de 0 a 100% como se observa en la Tabla 4-3.

Tabla 3-4: Valoración de la Motilidad Individual Progresiva según la Sociedad Americana de Theriogenología

Clasificación	Motilidad progresiva individual	Valor %
Pobre	Muy lento y errático	<50
Aceptable	Lineal lento y generalizado	60-70
Bueno	Lineal moderadamente rápido	70-80
Muy bueno	Lineal rápido	80-100

Fuente: (Mancheno, Andrés, 2021).

3.8.2.3. Vitalidad (%)

Para establecer la viabilidad espermática se utilizó la técnica con tinción de (eosina-nigrosina) misma que radicó en agregar 10 µL de la tintura sobre 10 µL de la muestra de semen puro en un portaobjetos con una temperatura previa de 37°C, luego se procedió a mezclar bien y reposar un minuto, posteriormente se realizó un frotis para finalmente dejar secar. La muestra se visualizó en un microscopio a un aumento de 100X, contando un mínimo de 100 espermatozoides en diferentes campos del portaobjetos.

Los espermatozoides con cabeza roja o rosa oscuro fueron considerados muertos ya que posiblemente tienen la membrana obstruida, mientras espermatozoides con cabeza blanca o rosa claro fueron tomados como vivos es decir tienen una membrana sana.

El resultado será expresado como porcentaje y por determinación subjetiva se calculará mediante la siguiente relación:

$$\text{Viabilidad espermática (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides muertos}}{\text{Número de espermatozoides vivos}} * 100$$

3.8.2.4. Concentración espermática (millones spz/ml)

La concentración espermática se calculó mediante la cámara de conteo celular Neubauer, donde se recolectó en un tubo eppendorf de 2ml y se colocó agua destilada, a continuación, elaboró una dilución 1:400 en relación semen/agua destilada, se recogió una microgota de esta dilución y se añadió en la cámara de Neubauer para realizar el conteo.

Se contarán 5 cuadros como se muestra en la ilustración 1-3.

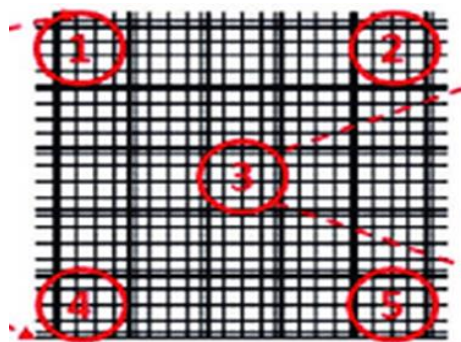


Ilustración 3-1: Cámara de conteo celular Neubauer.

Fuente: (Mancheno, Andrés, 2021).

Una vez realizado el conteo de espermatozoides en los 5 cuadros se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración spz } \left(\frac{\text{millones}}{\text{ml}} \right) = \text{spz contados} * 5 * 10 * 10 * 1000 * 400$$

En donde:

spz contados: Total de espermatozoides contados en los 5 cuadros

5: número de cuadros contabilizados

10: profundidad en milímetros de la cámara

1000: factor de transformación de microlitros a mililitros

400: factor de dilución

3.8.2.5. Morfoanomalías (%)

Para determinar esta variable se usó la misma placa del análisis de viabilidad espermática en donde se observó la estructura espermática con un aumento de 100X, para ello se contabilizaron las células sin rarezas y tomadas como normales, cuando la cabeza y flagelo son regulares, y como anormales las que tienen alguna de las siguientes características: cabezas muy grandes o muy pequeñas, doble cabeza, flagelos doblados, flagelos enrollados, flagelos múltiples o sin flagelo, también es común encontrar espermatozoides con presencia de gota citoplasmática proximal o distal.

Se contarán un total de 100 espermatozoides por campo y se utilizará la siguiente fórmula para transformarlo a porcentaje.

$$\text{Morfoanomalías (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides anormales}}{\text{Número de espermatozoides normales}} * 100$$

3.8.2.6. Pre-dilución del semen

Una vez extraído el semen se elaboró una primera dilución 1:1 (vol: vol) en donde al mismo volumen de eyaculado se le agregó el diluyente previamente preparado y a la misma temperatura.

Dilución del semen: Realizados los cálculos de número de espermatozoides viables y número de dosis se procedió a la dilución final del semen con el diluyente previamente preparado.

3.8.2.7. Estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides

La estabilización y acondicionamiento de los espermatozoides radicó en ofrecer a la célula el tiempo y un ambiente apto para que ésta elimine toda el agua intracelular y la sustituya por el diluyente, con el propósito de que al instante de la congelación y descongelación no se formen cristales de hielo los cuales abrirían la membrana celular deteriorando así al espermatozoide. Para esto se conservó la muestra de semen diluido a temperatura ambiente (14 – 20 °C) y bajo luz Ultravioleta durante un tiempo de 45 minutos.

3.8.2.8. Envasado y sellado de pajillas

Una vez diluido que el semen se encontró completamente diluido se realizó el envasarlo en pajillas de 0.25 ml, el envasado se ejecutó con la ayuda de una jeringa de insulina para posteriormente con la ayuda de otra jeringa sacar un poco de semen de la pajilla con el objetivo de dejar una burbuja de aire para impedir que esta reviente al instante de la descongelación y se sellarán con alcohol polivinilo. Esta diligencia se la cumplió a temperatura ambiente que oscilará entre los 16 y 24 °C.

3.8.2.9. Curvas de temperatura

Las curvas de temperatura tuvieron como objetivo el descenso controlado y lento de la temperatura para que la célula espermática no tenga cambios violentos de la misma, dichas curvas iniciarán reduciendo la temperatura de 20 °C a 5 °C en 30 minutos (velocidad: -0.5 °C/min) a través de la adición de hielo en un cooler con agua. Una vez que se logró la temperatura deseada se metieron las pajillas en una cámara de enfriamiento por un periodo de 4 horas a una temperatura de 4 °C para mantener un equilibrio perfecto.

3.8.2.10. Congelación

La congelación se elaboró mediante vapores de nitrógeno líquido ubicando las pajillas en un rack con capacidad de 50 pajillas dentro de un cooler en el cual se añadió 2 cm de nitrógeno líquido. El descenso de temperatura se hizo en relación con los siguientes valores y tiempos: primer descenso de 4 °C a -6 °C en 10 minutos (velocidad -1 °C/min), esto se consiguió poniendo el rack a 6 cm del nitrógeno líquido. Segundo descenso de -6 °C a -196 °C en 4 minutos (velocidad -47.50 °C/min), esto se logró colocando el rack a 2 cm del nitrógeno líquido. Realizado este descenso se empaparon las pajillas en el nitrógeno líquido del cooler para su enfriamiento.

3.8.3. *Evaluación espermática del semen post congelación*

3.8.3.1. *Motilidad individual (%)*

- Se utilizó un microscopio óptico (aumento 40X) a una temperatura de 37°C en donde el semen fue diluido en una solución isotónica de NaCl- al 0,9%, para poder observar individualmente a los espermatozoides.
- En la evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides se apreciaron el porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo lineal (MPL), para ello, se recogió con una micropipeta (esterilizada), 1 gota (de 10 µL) del semen diluido mismo que fue ubicado sobre un portaobjeto a temperatura de 37°C y protegido con un cubreobjetos; el análisis se hará en un microscopio a 40X, para la estimación se evaluó si más del 50% de los espermatozoides que hay en el campo poseen movimiento o no, ahí se observó los espermatozoides que se mueven en forma rectilínea a los cuales se los denominaron normales, caso contrario si los espermatozoides se mueven en círculo se nombran anormales.
- El porcentaje de los espermatozoides se calcula con el movimiento rectilíneo progresivo sobre el total de los espermatozoides visualizados en la placa, valores a ser comparados con la siguiente escala de 0 a 100%.

3.8.3.2. *Viabilidad espermática (%)*

- Para establecer la viabilidad espermática se utilizó la tinción de (eosina- nigrosina) misma que radicó en añadir 10 µl de Eosina G (colorante rojo) sobre 10 µl de la muestra de esperma en un portaobjetos temperado a 37°C se mezcló muy bien para luego agregar 10 µl de Nigrosina (colorante negro) y homogenizarla nuevamente y dejar en reposo durante 1 minuto, se realizó finalmente el frotis y se dejó secar al aire.
- La muestra se visualizó en un microscopio a 100X, contando un mínimo de 100 espermatozoides en diferentes campos del portaobjetos.
- Los espermatozoides con cabeza roja o rosa oscuro son considerados muertos mientras espermatozoides con cabeza blanca o rosa claro son denominados como vivos.
- El resultado fue mencionado como porcentaje y por determinación subjetiva y se calculó mediante la siguiente relación.

$$\text{Viabilidad espermática (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides muertos}}{\text{Número de espermatozoides vivos}} * 100$$

3.8.3.3. Integridad de la membrana

- Para la evaluación de esta variable se tomó como referencia el test Hipoosmótico (HOST) en el cual se elaboró una solución de fructosa al 2.7% (solución A) y una solución de Citrato de sodio 1.47% (solución B).
- El medio hipoosmótico se elaboró al instante de utilizar, mezclando 0.5 ml de solución A con 0.5 ml de solución B, al que se agregará 0.1 ml de semen descongelado. Esta mezcla se dejó incubar durante 20 minutos a 37 °C.
- Finalmente se añadió 10 µL de la mezcla incubada entre porta y cubreobjetos, y se visualizó en un microscopio con contraste de fases en donde se contabilizó como mínimo 100 espermatozoides y se concluyó el número de espermatozoides con membrana funcional (colas y/o segmento intercalar hinchados y enrollados), y el número de espermatozoides con membrana deteriorada (cola y/o segmento intercalar recto, delgado y sin enrollamiento).

Los resultados se expresarán en porcentaje de reacción total de espermatozoides con membrana funcional utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Int. Membrana} = \frac{A}{A + B} * 100$$

En dónde:

Int. Memb= Integridad de membrana (por ciento).

A = Número de espermatozoides con endósmosis positiva.

B = Número de espermatozoides con endósmosis negativa.

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (100 espermatozoides).

Se considerará una muestra normal de semen si más del 60 % experimentan hinchazón de la cola y menos del 50 % se considerará anormal.

3.8.3.4. Morfoanomalías (%)

Para determinar esta variable se realizó de la misma metodología en el cual se calculó la morfología en la pre congelación , donde se usó la misma placa del análisis de viabilidad espermática, se observó la estructura espermática con un aumento de 100X, para ello se contabilizó las células sin anomalías mismas que serán clasificadas como normales cuando la cabeza y flagelo son normales, y como anormales aquellos que mostraron alguna de las siguientes clases de morfoanomalías: cabezas muy grandes, cabezas muy pequeñas, doble cabeza,

flagelos doblados, flagelos enrollados, flagelos múltiples o sin flagelo, también es común encontrar espermatozoides con presencia de gota citoplasmática proximal o distal. Se contarán un total de 100 espermatozoides por campo y se utilizará la siguiente fórmula para transformarlo a porcentaje:

$$\text{Morfoanomalias (\%)} = \frac{\text{Número de espermatozoides anormales}}{\text{Número de espermatozoides normales}} * 100$$

3.8.3.5. *Determinación de costos*

Se determinó el valor de los todos los materiales que se utilizaron en cada tratamiento en la investigación para determinar el valor total.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Valoración macro y microscópica del semen ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly pre-congelación en la Estación Experimental Pastaza

4.1.1. Valoración macroscópica

4.1.1.1. Volumen

Para la variable del volumen del eyaculado de semen ovino de las razas Pelibuey y Blackbelly se obtuvieron valores de 1,6 +/- 0,282 ml y 1,35 +/- 0,070 ml y respectivamente. A pesar de los valores reportados (Ramírez, 2020, p. 8) obtuvo eyaculados de 0.5 a 2.0 ml existiendo una variación debido a la edad, tamaño, condición corporal de los animales seleccionados en su investigación. Según (Cueto, 2018, p. 9), menciona que el volumen de semen recolectado mediante una vagina artificial, generalmente se obtiene un promedio de eyaculado aproximadamente 1ml existiendo rangos de 0,7-3ml, este va de acuerdo las condiciones fisiológicas y reproductivas del ovino, así como también la habilidad del recolector.

A continuación, en la tabla 1-4 se observa los resultados de pre-congelación.

Tabla 4-1: Valoración espermática de semen fresco de las razas Pelibuey y Blackbelly pre-congelación en la Estación Experimental Pastaza

ESTADÍSTICAS DESCRIPTIVAS	RAZA	VOLUMEN EYACULADO (ml)	PH	ASPECTO	COLOR	OLOR
Media	PB*	1,6	6,65	Normal	Blanco cremoso	Neutro
Desviación estándar	PB*	0,282	0,21			
Media	BB*	1,35	6,6	Normal	Blanco cremoso	Neutro
Desviación estándar	BB*	0,070	0,14			

*PB: Pelibuey, *BB: Blackbelly

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

4.1.1.2. Ph

Los resultados obtenidos para esta variable antes de la congelación de semen ovino fueron de 6,65 +/- 0,21 y 6,6 +/- 0,14 respectivamente. (Gómez, 2018, p. 2) donde manifiesta que el Ph del semen presenta un valor normal si se encuentra en un rango de 6 y 7, si estos valores tienen a elevarse o

disminuirse, quiere decir que posiblemente existió contaminación en el semen como: presencia de orina, impurezas u otras afecciones que aporte aparato reproductor.

Los datos obtenidos guardan relación con los resultados obtenidos por (Castro, 2018, p. 3), el cual en una investigación realizada sobre calidad de semen refrigerado de carneros los eyaculados de los ovinos presentaron un Ph de 6.6 y 6.8 siendo un valor adecuado para el semen de ovinos.

4.1.1.3. Aspecto

Los resultados que se obtuvieron en esta variable del semen ovino para la raza Pelibuey y Blackbelly presentaron un aspecto normal antes de la congelación del semen, (Carrillo, 2016, p. 3) en su investigación acerca de semen de ovinos de pelo criollo colombiano obtuvo resultados como aspecto normal y acuoso, (López, 2018, p. 2) menciona que estas características seminales provienen de animales sanos y es apta para su análisis como se observan en la tabla 1-4.

4.1.1.4. Color

Para la variable de color el semen de los ovinos machos raza Pelibuey y Blackbelly presentaron una tonalidad de blanco cremoso, (Castro, 2018, p. 3) quien en su investigación sobre la calidad de semen refrigerado de carneros obtuvo eyaculados colores blancos cremosos una característica adecuada para los ovinos.

Al respecto (Gómez, 2018, p. 2), indica que el color del semen del carnero se considera normal los que van de blanco al amarillento, mientras que los colores como el rosado, amarronado y verdoso indicarían una patología. Por su parte (Carrillo, 2016, p. 8) en su investigación sobre la caracterización seminal de individuos ovinos criollos de pelo obtuvo resultados color blanco con aspectos lechoso y cremoso siendo características similares a los obtenidos en el presente estudio, señalando que los eyaculados con desviaciones a color rojizo, pueden indicar presencia de sangre así como colores grises, marrones indican presencia de contaminación o infecciones.

4.1.1.5. Olor

Los resultados expuestos para la variable de olor de semen del macho raza Pelibuey y Blackbelly presentaron un olor neutro, (Mejía, 1998, p. 68) menciona que las características macroscópicas como el color y olor del semen deben ser inspeccionados lo más rápido posible después de recogido el semen. El olor debe ser característico de cada especie y animal y por lo particular no debe ser muy fuerte. Por otro lado (Zamora, 2022, p. 9) indica en su investigación sobre congelación de semen

de ovino que el olor del carnero es normal, neutro e inodoro, características similares a la presente investigación.

4.1.2. Valoración microscópica

Los resultados obtenidos de la valoración microscópica se muestran en la tabla 2-4.

Tabla 4-2: Valoración microscópica de semen fresco de las razas Pelibuey y Blackbelly pre-congelación en la Estación Experimental Pastaza.

MACHO	Motilidad masal (ptos)	Motilidad individual (%)	Vitalidad (%)	Concentración espermática (millones de spz/ml)	Morfoanomalías (%)
PB	4	87,5	80	3700	20
BB	3	72,5	70	1800	30

*PB: Pelibuey, *BB: Blackbelly

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

4.1.2.1. Motilidad masal (puntos)

Al realizar la valoración espermática de la motilidad masal del semen de ovino en los machos Pelibuey y Blackbelly en la pre-congelación presentaron una media de 4y 3 puntos. De acuerdo con (Ureña, 2021, p. 3), la motilidad masal se realiza utilizando una escala de 0= sin movimiento a 5= movimientos muy fuertes, de tal manera que esta técnica es suficiente para detectar a los eyaculados en donde los espermatozoides están muertos o simplemente son poco móviles.

Al respecto (Cueto, 2018, p. 6), menciona que la motilidad masal considerable pre-congelación de un eyaculado debe ser desde 3 o mayor. Por otro lado (Gómez, 2019, p. 32) en su investigación realizada sobre evaluación de espermatozoides crio preservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico reportó una media de 3.82 puntos de motilidad masal, resultado que se encuentra en el rango de los que se obtuvieron en esta presente investigación, por lo que se concluye que las muestras recolectadas de las diferentes razas son aptas para la criopreservación.

4.1.2.2. Motilidad individual (%)

Los resultados obtenidos para esta variable en las razas Pelibuey y Blackbelly obtuvieron una media de 87,5% y 72,5 %, según (Hernández, 2020, p. 50), la motilidad individual de semen en ovinos se evalúa de 80-100% muy bueno, 60-80% bueno, 40-60% media, 20-40% pobre y 0-20% mala.

Al respecto (Guerrero, 2009, p. 5) señala como característica seminal acerca de la motilidad individual de ovinos de pelo es de un $87.7 \pm 4.6 \%$.

Los datos reportados en la presente investigación se encuentran en un rango de buena es decir que los movimientos de los espermatozoides son vigorosos, pero las ondas y remolinos no son rápidos, sin embargo, del 70 al 85% constan de células activas.

4.1.2.3. Vitalidad (%)

Al realizar la evaluación de la vitalidad en los reproductores Pelibuey y Blackbelly dio como resultados una media de 80 y 70%. Al respecto (Taday, 2020, p. 25), indica que la vitalidad es la proporción de espermatozoides totales vivos de acuerdo con la introducción del colorante, el cual permite saber si los espermatozoides inmóviles están con vida o inertes.

Citando a (Escudero, 2015, p. 59), menciona que un 70-85% porcentaje de vitalidad es apta para la congelación del semen ovino, ya que al momento de la congelación solo alrededor del 50% de los espermatozoides mantienen su viabilidad post congelación. Los resultados reportados en la presente investigación se encuentran en el rango para la congelación.

4.1.2.4. Concentración espermática (millones spz/ml)

En cuanto a la variable concentración espermática los reproductores de la raza Pelibuey y Blackbelly reportaron una media de 3700 y 1800 millones spz/ml. (Cueto, 2018, p. 5), menciona el volumen y la concentración espermática son variables que deben evaluarse antes de su manejo, para realizar una adecuada dilución según el volumen y número de espermatozoides totales a inseminar por dosis. La media del volumen del eyaculado de un ovino reproductor es de 1ml (0,7-3ml), y su concentración espermática varía entre 2000 - 6000 $\times 10^6$ spz/ml.

Teniendo en cuenta a la investigación realizada por (Gómez, 2019, p. 41), reporta una media de 3800 $\times 10^6$ spz/ml y un mínimo de 1560 $\times 10^6$ spz/ml en ovinos de pelo en condiciones de trópico, (Orellana, 2009 p. 53) reportó una concentración espermática de semen ovino de la raza Blackbelly de 2458 $\times 10^6$ spz/ml con un mínimo de 1320 $\times 10^6$ spz/ml, mientras que (Palomera, 2021, p. 4) obtuvo una concentración espermática en la raza Pelibuey de 1732 $\times 10^6$ spz/ml. Los datos conseguidos son similares a los obtenidos en la presente investigación, cabe recalcar que dichos valores son extraídos de animales de diferentes edades.

4.1.2.5. Morfoanomalías (%)

Al realizar la evaluación de las morfoanomalías de semen fresco de los ovinos machos se registró en la raza PB y BB, 20% y 30%, de acuerdo con el estudio realizado por (Carvajal, 2018, p. 54), sobre la evaluación de la calidad espermática de semen en ovinos de trópico presentó 10, 14 y 11% valores que son menores que los presentados, hay que tomar en cuenta que dichos animales se encontraron en diferentes edades y en condiciones ambientales diferentes.

Sin embargo, se asemejan a los observados por (Calixto, 2014, p. 185), donde menciona que entre los parámetros del semen fresco de carnero pueden presentar morfoanomalías de 25,4%; 23,5% y 24,9%, los resultados pueden diferir debido a otros elementos que no se toman en cuenta en la presente investigación como: factores climáticos, uso de hormonas, edad, alimentación etc....

4.2. Valoración del semen ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly post congelación aplicando Ciclodextrina Cargada de Colesterol en la Estación Experimental Pastaza

4.2.1. Motilidad individual (%)

Al analizar la variable motilidad individual de la raza Pelibuey no se observan diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), siendo el menor valor perteneciente al T1 Y T2 con 11,67% para el semen criopreservado con 0,5 y 1mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T0 con 34,17 % para semen criopreservado con 0.00 mg de CLC. Mientras que en la raza Blackbelly tampoco se observan diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), siendo el menor valor 15,83% correspondiente al T2 para el semen criopreservado con 1.00mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T0 con 49,17 % para semen criopreservado con 0.00 mg de CLC.

A través del análisis de regresión que se efectuó para la motilidad individual del macho Pelibuey el cual se ilustra en el gráfico 1-4, se registró que los datos se ajustan a una tendencia cuadrática en donde se observa que el coeficiente de determinación (R^2), indica que el 63% de la varianza de la motilidad individual está explicada por los niveles de CLC, mientras que 37% restantes está en dependencia de otros factores que no se consideraron en la presente investigación.

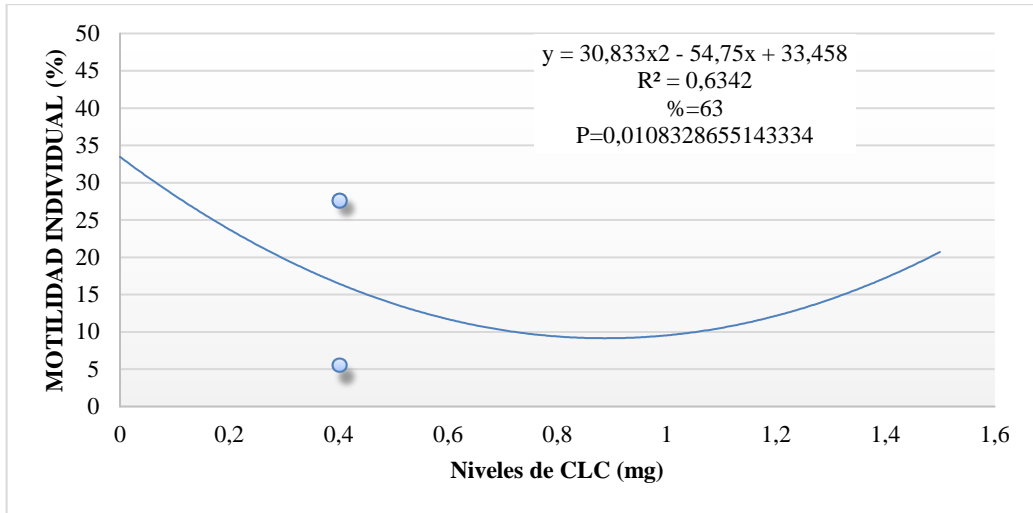


Ilustración 4-1: Regresión de la motilidad individual de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey.

Fuente: Mullo, Sandra, 2023.

Mediante el análisis de regresión que se efectuó para la motilidad individual del macho Blackbelly que se ilustra en el gráfico 2-4, se registró que los datos se ajustan a una tendencia cuadrática, donde el coeficiente de determinación (R^2) indica que el 81% de la varianza de la motilidad individual se basa en los niveles de CLC, mientras que el 12% restante son factores que no considerados en la presenta investigación.

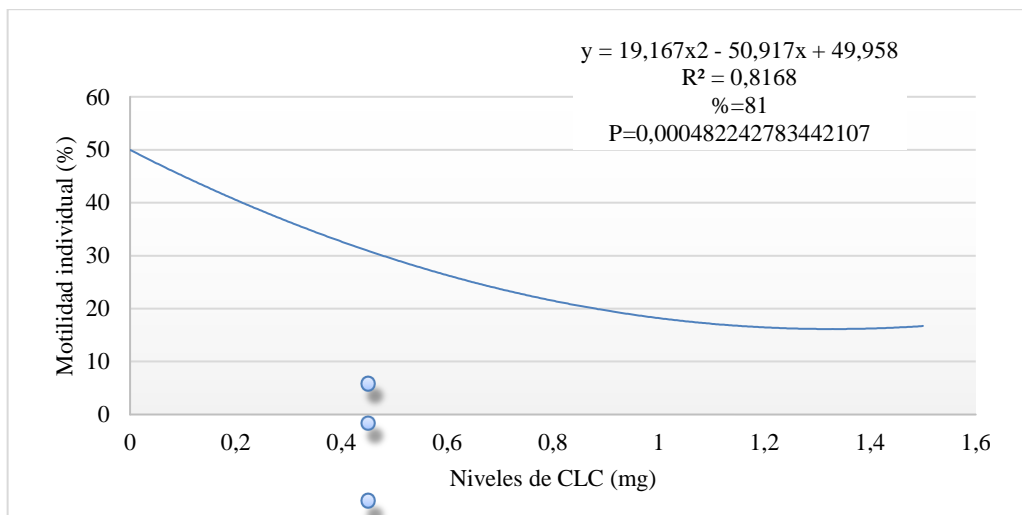


Ilustración 4-2: Regresión de la motilidad individual de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

De acuerdo con (Souza, 2020, p. 6) de su trabajo de investigación demostraron que las muestras tratadas con CLC presentaron un porcentaje de motilidad individual post descongelación por

Encima de 45 %. Por otro lado (Sandoval, 2007, p. 5), en su investigación encontró resultados de motilidad individual de (69%,37%,23%) para semen criopreservado con diferentes dilutores. Estos valores pueden cambiar debido a la utilización de diferentes diluyentes o crioprotectores, ya que estas sustancias no contienen la misma composición química u organoléptica.

A continuación, en la tabla 3-4 se muestra los resultados de la valoración seminal post congelación.

Tabla 4-3: Valoración del semen ovino de la raza Pelibuey y Blackbelly post congelación aplicando Ciclodextrina Cargada de Colesterol en la Estación Experimental Pastaza.

Evaluación Post- Congelación del semen criopreservado con CLC de la raza Pelibuey Y Blackbelly																			
	RAZA PB								RAZA BB								E. E	Prob	Sig
	T0		T1		T2		T3		T0		T1		T2		T3				
	0		0,5		1		1,5		0		0,5		1		1,5				
Motilidad individual (%)	34,17	A	11,67	A	11,67	A	20	A	49,17	A	31,67	A	15,83	A	17,5	A	4,51	0,09	NS
Viabilidad espermática (%)	39,17	A	11,67	A	10,83	A	20	A	53,33	A	30,83	A	15	A	17,5	A	5,99	0,3	NS
Integridad de la membrana (%)	11,33	D	25,67	BC	27,67	B	18,67	CD	18	CD	38,33	A	25,67	BC	22,33	BC	1,8	0,007	*
Morfoanomalías (%)	17,33	A	16	A	14	A	13,33	A	15,33	A	18,33	A	16,33	A	17,67	A	2,26	0,56	NS

*PB: Pelibuey

*BB: Blackbelly

*E. E: Error experimental

* Prob: Probabilidad; >0,05: no es significativo; <0,05: es significativo

*Sig: Significancia

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

4.2.2. Viabilidad (%)

En los resultados de la viabilidad de la raza Pelibuey no se observan diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), siendo el menor valor 10,83 % correspondiente al T2 para el semen criopreservado con 1.00mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T0 con 39,17 % para semen criopreservado con 0.00 mg de CLC, mientras que la raza Blackbelly tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), siendo el menor valor perteneciente al T2 con 15% para el semen criopreservado con 1 mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T0 con 53.3 % para semen criopreservado con 0.00 mg de CLC.

El análisis de regresión que se efectuó para la viabilidad del macho Pelibuey que se ilustra en el gráfico 3-4, se registró que los valores se ajustan a una tendencia cuadrática, en donde se observa que el coeficiente de determinación (R^2), indica que el 57% de la viabilidad está explicada por los niveles de CLC, mientras que 20% restantes está en dependencia de otros factores que no se consideraron en la presente investigación.

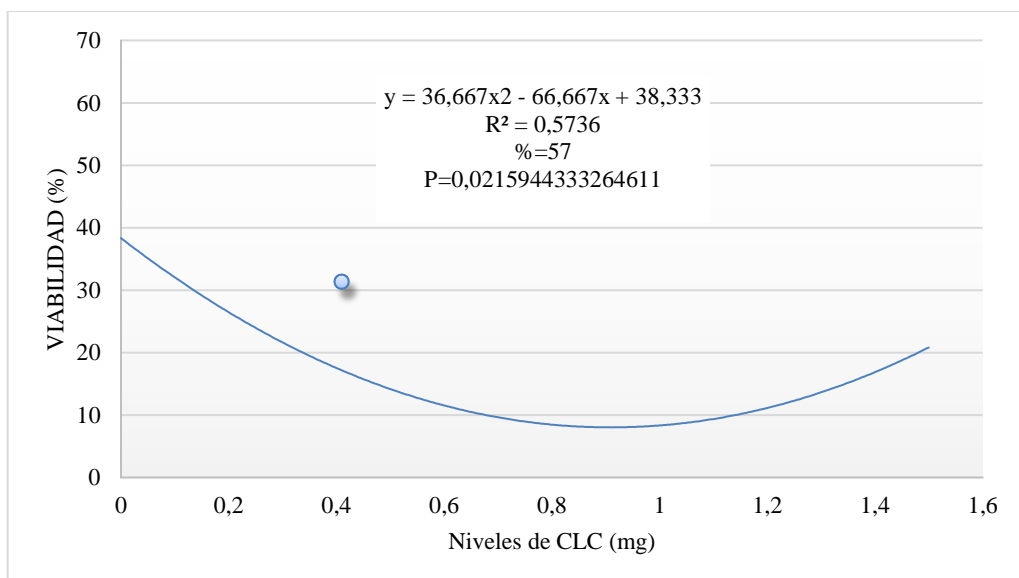


Ilustración 4-3: Regresión de la viabilidad de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey.

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

Mediante el análisis de regresión que se efectuó para la viabilidad del macho Blackbelly que se ilustra en el gráfico 4-4, se registró que los datos se ajustan a una tendencia cuadrática, en donde se observa que el coeficiente de determinación (R^2), indica que el 80% de la viabilidad está

explicada por los niveles de CLC, mientras que 20% restantes está en dependencia de otros factores que no se consideraron en la presente investigación.

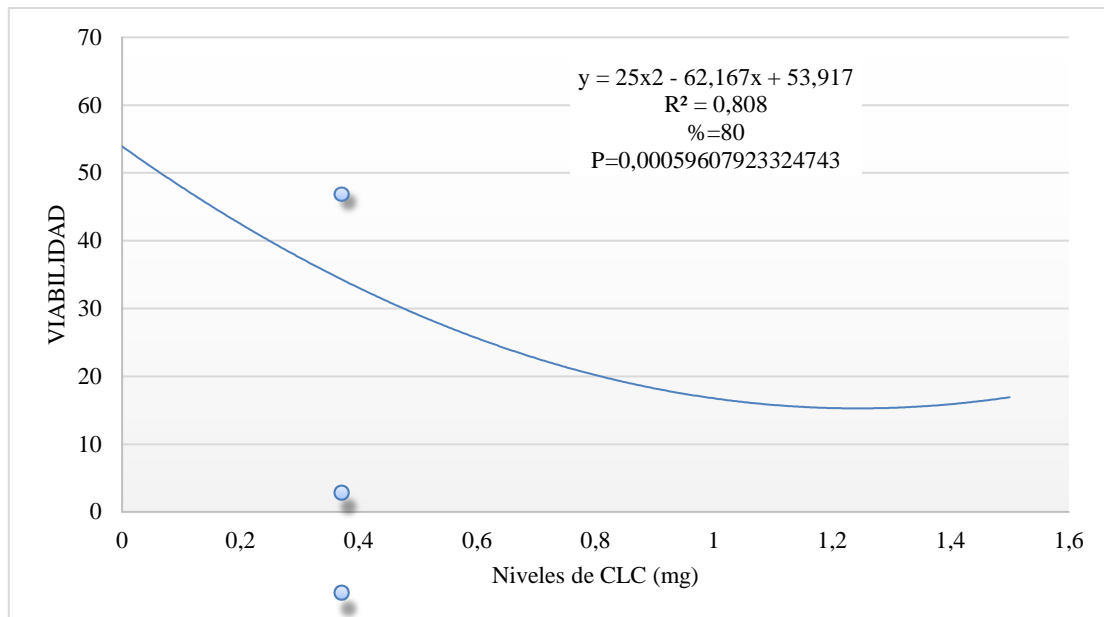


Ilustración 4-4: Regresión de la viabilidad de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

Se encontraron resultados mayores al evaluar los diferentes niveles de CLC en semen ovino (Souza, 2021, p. 9) con valores superiores a un 68% de viabilidad espermática en la adición de complejo ciclodextrina, sin embargo (Salmon, 2016, pág. 10) menciona al aumentar el colesterol en la membrana plasmática usando CLC, las membranas espermáticas permanecen más fluidas a bajas temperaturas y menos permeables al agua durante los cambios osmóticos, mejorando así su tolerancia a la criopreservación, lo que resulta en un menor daño a los espermatozoides, membrana con niveles adecuados de colesterol y, en consecuencia, el mantenimiento de la motilidad de los espermatozoides después de la criopreservación, por otra parte (Vargas, 2019, p. 122) en su investigación obtuvo resultados de semen ovino post congelación presentando una viabilidad de 40%.

Los resultados presentados en la presente investigación pueden variar con otras investigaciones a consecuencia de que no se utilizaron los mismos niveles de CLC o por la falta del uso de este.

4.2.3. *Integridad de la membrana*

La estimación de los resultados para la variable integridad de la membrana de la raza Pelibuey se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), siendo el menor valor perteneciente

al T0 con 11,33% para el semen criopreservado con 0,00 mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T2 con 27,67 % para semen criopreservado con 1 mg de CLC. Mientras que para la raza Blackbelly tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$), siendo el menor valor 18% correspondiente al T0 para el semen criopreservado con 0.00mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T1 con 38,33 % para semen criopreservado con 0.05 mg de CLC.

A través del análisis de regresión que se efectuó para la integridad de la membrana del macho Pelibuey que se ilustra en el gráfico 5-4, se registró que los datos se ajustan a una tendencia cuadrática en donde se observa el coeficiente de determinación (R^2), indica que el 98% de la varianza de la integridad de la membrana esta relaciona a los niveles de CLC, y el 2% son factores que no se consideraron en la presente investigación

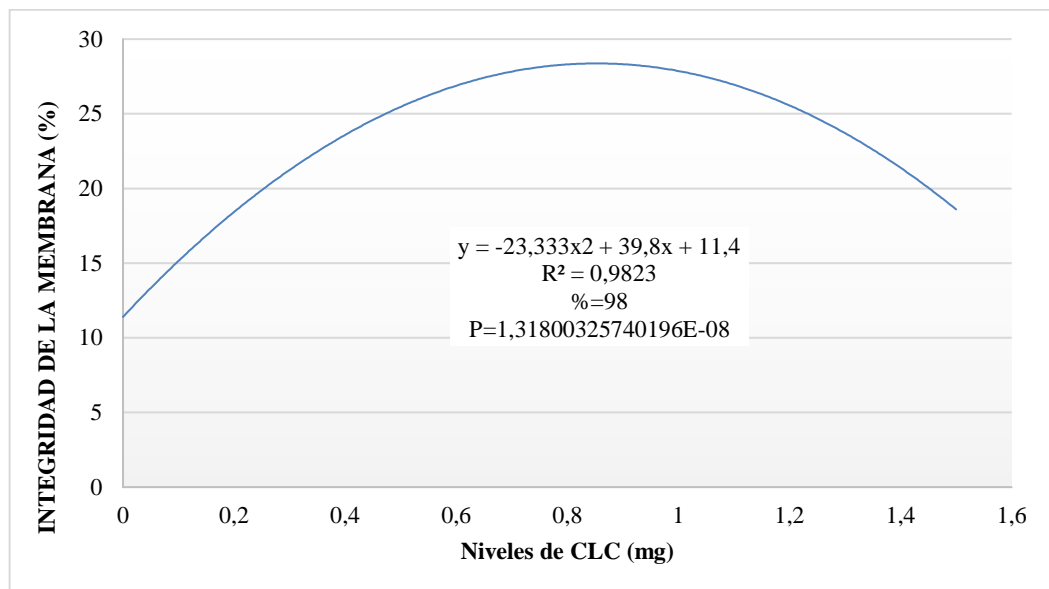


Ilustración 4-5: Regresión de la Integridad de la membrana de semen criopreservado con CLC en el macho Pelibuey

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

Mediante el análisis de regresión que se efectuó para la integridad de la membrana del macho Blackbelly que se ilustra en el gráfico 6-4, se registró que los datos partiendo desde 0,00 hasta 0,05mg se observa una proyección positiva, desde el punto 0,05 hasta 1 mg se observa una proyección negativa, y desde la misma hasta 1,5 una tendencia positiva en donde se visualiza que por cada miligramo de aumento en el complejo CLC la integridad de la membrana aumenta un 18%. El coeficiente de determinación (R^2), indica que el 82% esta explicado por los niveles de mg que se aplican de CLC en cada tratamiento y el 18% restante son factores que no se consideran en la presente investigación.

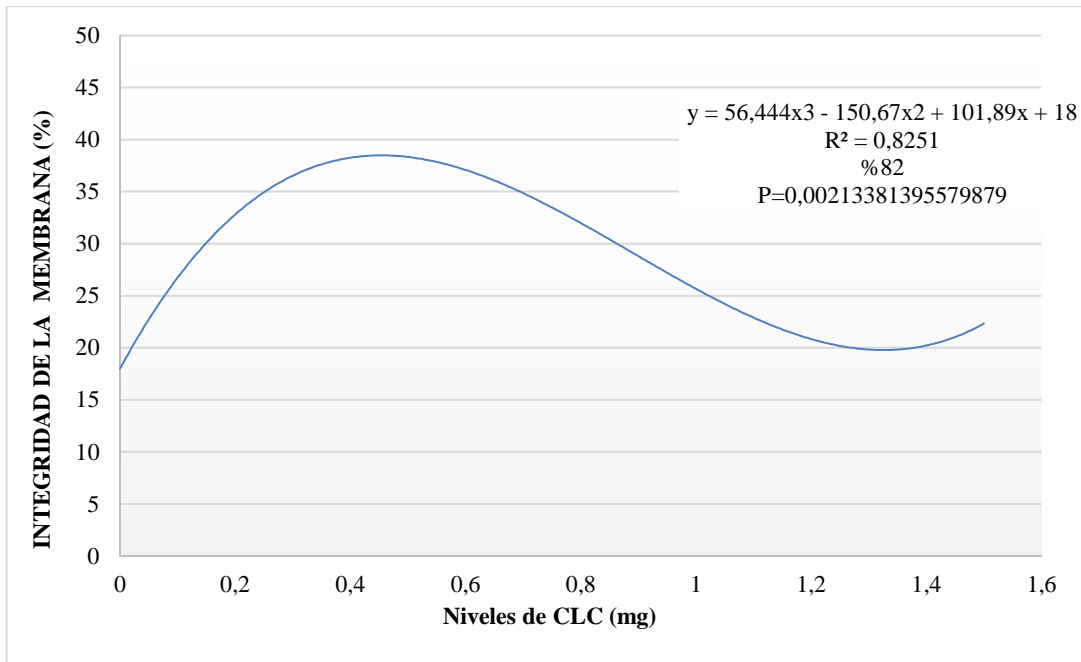


Ilustración 4-6: Regresión de la Integridad de la membrana de semen criopreservado con CLC en el macho Blackbelly.

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

Los resultados reportados por (Souza, 2021, p. 6) con un 28%, 31%, 35% de integridad de la membrana a muestras de semen post congelación tratadas con CLC, donde se menciona que las membranas son altamente inestables y susceptibles de ruptura debido a la devastación de lípidos y colesterol. Durante la crioconservación, los espermatozoides sufren estrés mecánico debido a las variaciones osmóticas en la membrana plasmática. En los espermatozoides existe una gran cantidad de mitocondrias densamente empaquetadas alrededor de las fibras densas que rodean el axonema, que son responsables de la producción de trifosfato de adenosina (ATP), y la síntesis de ATP mitocondrial depende del alto potencial de la membrana mitocondrial, cuyo aumento en este potencial resulta en una mejor función mitocondrial, el uso de CLC puede haber elevado los niveles de ATP intracelular, y promueve la protección de las mitocondrias y las estructuras flagelares de los espermatozoides contra el daño causado por la congelación y descongelación, aumentando así la producción de ATP.

Por otro lado (Castillo, 2019, p. 8), reportó 50%; 56; y 63% en la integridad de la membrana en el semen post congelación de ovinos tratados con complejo de ciclodextrina, estos resultados son mayores a la presente investigación debido a que existieron factores que no se tomaron en la presente investigación.

A pesar de los porcentajes de integridad de membrana que se encontraron en la actual investigación, no todos los estudios concluyen lo mismo debido a que la información en carneros es bastante limitada en donde el semen haya sido tratado con complejo ciclodextrina.

4.2.4. Morfoanomalías (%)

Para la valoración de los resultados de morfoanormalidades de la raza Blackbelly no se observan diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), siendo el menor valor 16,3% correspondiente al T2 para el semen criopreservado con 1mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T1 con 18,33 % para semen criopreservado con 0.05 mg de CLC, mientras que la raza Pelibuey tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$), siendo el menor valor perteneciente al T2 con 14% para el semen criopreservado con 1 mg de Complejo Colesterol Ciclodextrina, y el mayor valor se presentó en el T0 con 17,33 % para semen criopreservado con 0,00 mg de CLC.

Con respecto al estudio realizado por (Castillo, 2019, p. 6) con 11%, 10% de morfoanomalías en el semen de carnero tratado con CLC los resultados son inferiores a los de la presente investigación, (Pozo, 2019 p. 5) con 5% de morfoanomalías en semen criopreservado con diferentes dilutores. Los resultados pueden variar debido al uso mismo de CLC y otros materiales que no se consideraron en la presente investigación.

4.3. Determinación de costos

En la tabla 4-4 se detalla los costos unitarios de cada uno de los rubros que fueron utilizados para la criopreservación de semen ovino en la Estación Experimental Pastaza, determinándose que el costo unitario por cada tratamiento tuvo un valor unitario de 148,73\$, mientras que el costo total fue de 594, 98\$.

Tabla 4-4: Costos de criopreservación de semen ovino

Tratamientos	Diluyente +0 mg	Diluyente +0,5 mg	Diluyente +1 mg	Diluyente +1,5 mg
Agua bidestilada de 10 ml	2,50	2,500	2,500	2,500
Agua Inyectable de 500 ml	3,80	3,800	3,800	3,800
Nitrógeno líquido	18,90	18,900	18,900	18,900
Papel Aluminio	1,50	1,500	1,500	1,500
Guantes de nitrilo	2,50	2,500	2,500	2,500

Papel desechable	1,00	1,000	1,000	1,000
Placas porta objetos	3,25	3,250	3,250	3,250
Placas cubre objetos	2,90	2,900	2,900	2,900
Caja Petri	2,75	2,750	2,750	2,750
Vaso precipitado de 100ml	14,00	14,000	14,000	14,000
balón volumétrico de 100ml	7,15	7,150	7,150	7,150
Jeringas	1,00	1,000	1,000	1,000
Puntas para micropipetas	10,80	10,800	10,800	10,800
Papel tornasol o Ph	3,50	3,500	3,500	3,500
Goblets	11,25	11,250	11,250	11,250
Alcohol polivinilo	1,80	1,800	1,800	1,800
Diluyente Triladyl	45,00	45,000	45,000	45,000
Ciclodextrina	0,00	0,01	0,02	0,03
Glucosa	0,02	0,020	0,020	0,020
Ácido Cítrico	0,06	0,060	0,060	0,060
Fructosa	3,50	3,500	3,500	3,500
Citrato de sodio	3,50	3,500	3,500	3,500
Colesterol	1,40	1,400	1,400	1,400
Metanol	5,15	5,150	5,150	5,150
Eosina (nigrosina)	1,50	1,500	1,500	1,500
	148,730	148,740	148,750	148,760
TOTAL, USD\$				594,980

Realizado por: Mullo, Sandra, 2023.

Con el fin de beneficios académicos, y para futuras investigación que se realicen en la reproducción ovina en la provincia de Pastaza, a cargo de futuras asociaciones que se dediquen a la investigación sobre producción ovina de pelo.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Después de analizar los resultados obtenidos en la presente investigación, se llegó a las siguientes conclusiones.

- Al determinar la valoración macroscópica del semen pre-congelación (fresco) para las razas Pelibuey y Blackbelly, las muestras seminales mostraron un aspecto normal, color blanco cremoso, olor neutro, Ph promedio de 6,65 y volumen de eyaculado promedio de 1,6 ml para el macho Pelibuey y PH promedio de 6,6 y 1,35 ml para el Blackbelly, por lo cual se consideró que dichos animales fueron aptos para la colecta, procesamiento y criopreservación de semen.
- Al determinar la valoración microscópica para para la raza Pelibuey la motilidad masal reportó un valor de 4 puntos, motilidad individual de 87,5 %, vitalidad del 80%, concentración espermática de 3700 000 000 (spz/ml) y morfoanomalías del 20%. Mientras que la raza Blackbelly se determinó una motilidad masal de 3 puntos, motilidad individual de 72,5 %, vitalidad 70%, concentración espermática 1800 000 000 (spz/ml) y morfoanomalías del 30%. Dichos valores cumplen con las características recomendadas para criopreservar el semen ovino.
- Los resultados obtenidos postcongelación al usar diferentes niveles de CLC en cuanto a la motilidad individual, viabilidad y morfoanomalías en las muestras de semen no presentaron diferencias estadísticas significativas entre las muestras evaluadas; sin embargo, en la variable integridad de la membrana existieron diferencias estadísticas significativas para los machos Pelibuey y Blackbelly con valores de T0:11,33%; T1:25,67%; T2:27,67%; T3: 18,67% y T0:18%; T1:38,33%; T2:25,7%; T3:22,33% respectivamente.
- En el presente estudio se determinó que los costos totales para crio preservar el semen ovino cargado con diferentes niveles de ciclodextrina con colesterol fueron de 594, 98 USD.

5.2. Recomendaciones

- Ejecutar planes de nuevas tecnologías para el mejoramiento de la producción de ovinos de pelo en condiciones ambientales de trópico en la provincia de Pastaza, buscando el mantenimiento de la conservación de la genética de los animales con el objetivo de obtener semovientes de calidad para futuros productores de la zona.
- Elaborar futuras investigaciones en la criopreservación de semen ovino con el objetivo de incrementar la fertilidad en esta especie, especialmente que sean aplicables en la región amazónica.
- Utilizar diferentes niveles de CLC para contrastar los resultados obtenidos en el siguiente estudio.

BIBLIOGRAFÍA

ÁVALOS, Alejandro. Recolección y manipulación seminal (en línea). Coayacán, México : ISBN, 2018, 2018. p. 10.

CASTILLO, Luis. Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* [Online] diciembre 23, 2019. [Cited: octubre 17, 2022.] <http://dev.scielo.org.pe/pdf/rivep/v30n4/a25v30n4.pdf>.

CASTRO, Jorge. Calidad del semen refrigerado de carneros Assaf y Blackbelly. *Revista Veterinaria Peruana* (En línea). 2018.

CASTRO, Walter. Valoración espermática de semen bovino criopreservado con tres curvas de temperatura en la Hacienda La Victoria del Cantón Bucay (En línea) (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Riobamba, Ecuador : s.n., 2022. p. 32.

CALIXTO, Wilber. Optimización de los protocolos de criopreservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción Xisqueta y Aranesa. (En línea) (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de veterinaria. p.185
<https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/284242/wcgv1de1.pdf?sequence=1>

CUETO, Marcela. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Argentina : INTA EDICIONES, Enero 23, 2018. Vol. II, 323.

DELGADO, Belma. Evaluación espermática de semen ovino tratado por la técnica de la gradiente de densidad. Lima, Perú : s.n., 2013.

ESCUADERO, Luis. Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales. Riobamba, Ecuador : s.n., 2015.

ESPEJO, Marita: SALVADOR, Zaira. Formación y partes del espermatozoide. *Reproducción Asitida.* [Online] octubre 21, 2019. [Cited: 10 15, 2022.] La cabeza del espermatozoide tiene una forma ovalada y un tamaño entre 5 y 8 micras.

ESPINOSA, Fiorela. México : ISSN: 1870-0195, enero 1, 2005, Formación, evaluación y caracterización del complejo de inclusión piroxicam/hidroxipropil- β -ciclodextrina , Vol. XXXVI, p. 4.

GALOTA, Jorge. Anatomía II (En línea). Buenos Aires, Argentina : s.n., 2019.

GENOVESE, Carla. Histología, Regional, Cualitativa y Cuantitativa del desarrollo epididimario ovino (En Línea) (Trabajo de Titulación). (Doctor en Ciencias Veterinarias) . *Universidad de la República, Facultad de Veterinaria*, . 2014. p. 10.

GÓMEZ, Julio. Evaluación de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en condiciones de trópico de Guerrero en el laprosem-UAgro. Guerrero, Mexico : s.n., 2019.

GÓMEZ, María. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes, Sitio Argentino de Producción Animal. 2018.

GUERRERO, Wilfredo. 20, Perú : s.n., 2009, Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino, Vol. I, p. 14.

GUERRERO, Wilfredo. Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. Perú : s.n., 2009. Vol. I, 20, p. 14.

GUEVARA, Guillén. Integridad de la membrana plasmática de espermatozoides recién colectados de ovinos en condiciones de trópico seco. *Jornadas sobre la producción animal (en línea)*. Maracaibo, Venezuela : s.n., 2013. Vol. I, p. 1.

HERNÁNDEZ, Catalina. Evaluación de la concepción en cabras utilizando semen crio preservado. Riobamba, Ecuador : s.n., 2020.

INIA. Instituto de Investigaciones Agropecuarias. [Online] Agosto 23, 2018. https://puntoganadero.cl/imagenes/upload/_5cc081f0118e5.pdf.

LEDESMA, Verónica. Efecto del método de colecta de semen y de plasma seminal sobre la supervivencia posdescongelación de espermatozoides ovinos. [Online] Octubre 12, 2012. [Cited: Octubre 16, 2022.] https://repositorio.inta.gob.ar/bitstream/handle/20.500.12123/8137/INTA_CRBsAsSur_EEABal

carce_Ledesma_AV_Efecto_del_metodo_de_colecta_de_semen_y_de_plasma.pdf?sequence=1
&isAllowed=y.

LÓPEZ, Javier. Fisiología reproductiva del macho (En línea). 2018.

LÓPEZ, Manuel. La reina de la encapsulación molecular. 2011.

LOZANA, Alejandro. Evaluación del uso de megadosis de vitamina c en ovinos machos reproductores a través del espermatograma. Quito, Ecuador : s.n., 2016. p. 27.

MEJÍA, Armida. Manual para la explotación de ovinos de pelo en mexico (En Línea) (Trabajo de titulación) (Médico) Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México : s.n., 1998.

MOYANO, Quinteros. Módulo ovino amazónico sustentable: indicadores de eficiencia productiva. Ecuador : Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, 2020, Vol. I, pp. 53-57.

MUÑOZ, Sofía. “*Correlación de la circunferencia escrotal con volumen de eyaculado y concentración espermática en cuatro razas ovinas*”. Mexico : s.n., 2019. p. 13, Trabajo de Titulación(en línea) UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MEXICO.

NÚÑEZ, Quintero. Morfología del tracto genital de los pequeños rumiantes. FCV-LUZ *Morphology of the genital system of small ruminants*. Coro, Venezuela : s.n., 2018. Vol. III, 2, p. 5.

ORELLANA, Javier. Características seminales e integridad de la membrana espermática por refrigeración en carneros Blackbelly y Assaf de banco nacional de semen - LA MOLINA. Huancayo, Perú : s.n., 2009.

ORTIZ, Luciano. Respuesta al consumo adicional de zinc orgánico en la calidad seminal de ovinos de pelo. Sinaloa, México : ISBN: 978-607-9230-87-6, 2013. Vols. II: 701-707.

PALOMERA, Luna. Características seminales y niveles de testosterona en carneros Pelibuey tratados con oxcitocina exógena. Tabasco, México : s.n., 2021. Vol. 70, 271.

POZO, Alfredo. Características seminales de ovino pre y post congelamiento usando dilutor comercial y diferentes yemas de huevo. 1 ISSN 1684-0089 Huamanga, Perú : s.n., 2019. 27.

RAMÍREZ, Marco & UGALDE, Ramon: AGUILAR, Edgar. Calidad seminal de ovinos de pelo suplementados con Moringa oleifera (Moringaceae) y Trichanthera gigantea (Acanthaceae). Yucatán, México : s.n., 2020. Vol. 11.

REINOSO, Carlos. *Efecto de la castración y de la adición de sobrealimento en ovinos de pelo, en semi estabulación, en valle hermoso provincia de Santo Domingo De Los Tsáchilas.* Santo Domingo : s.n., 2014. p. 7.

ROA, Ignacio. Hormonas del aparato Reproductivo del macho. Chile : Int. J. Morphol, 2018. Vol. I, 32, p. 4. 32(2).

RUBIO, Jorge. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática. [Online] Agosto 23, 2009. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95911613010.pdf>.

RUIZ, Luis. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. *Evaluación de la Calidad Espermática del Semen Ovino Posdescongelación al Emplear Dos Fuentes Energéticas y Dos Crioprotectores.* [Online] septiembre 2, 2018. [Cited: septiembre 14, 2022.] <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n1/a07v26n1.pdf>.

SALMON, VM. Cholesterol-Loaded Cyclodextrin Increases the Cholesterol Content of Goat Sperm to Improve Cold and Osmotic Resistance and Maintain Sperm Function after Cryopreservation. Biol Reprod. 2016.

SALVIANO, Mario. 232, Brasil : ISSN, Diciembre 23, 2011, Integridad de membrana cromatina espermática en caprinos y sin bipartición escrotal, Vol. VI, p. 6.

Sandoval, Rocío. Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes (Rev Inv Vet). 2007. 18, p. 107.

SOUZA, Felix. Adicao de colesterol carregado com ciclodextrina ao semen ovino na criopreservacao. 2021. Vol. 31, 1.

TADAY, Alfonso. Valoración microscópica de la calidad del semen del cuy. Riobamba, Ecuador : s.n., 2020.

TORO, Ana. Espermatograma. Colombia : Editora Médica Colombiana S.A, Noviembre 23, 2009. Vol. XIV, 11, p. 4.

UREÑA, Francisco. Inseminación artificial: Recolección y conservación de semen (blog) . 2021.

VALDÉZ, Diego: SERPA, Guillermo. Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad de semen ovino congelado (trabajo de titulación). (Magister) Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Centro de Postgrado. Cuenca : s.n., 2013.

VARGAS, José. Viabilidad espermática al descongelado en semen ovino. 2019.

ZAMORA, Roberto. Efecto del antioxidante fucoxantina sobre la congelación de semen de ovino (En Línea) (Maestra) Tecnológico Nacional de México. Conkal, Mexico : s.n., 2021.



The image shows a handwritten signature in blue ink over a circular official stamp. The stamp contains the text "ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIHUAHUA" and "BBRA" around a central emblem. To the left of the signature, there is a smaller stamp with the text "D.B." and "Ing. Cris..." partially visible.

ANEXOS

ANEXO A: VALORACIÓN SEMINAL MACROSCÓPICA (PRE- CONGELACIÓN)

Macho	Edad (meses)	Aspecto	Vol. Eyaculado (ml)	D.S.	Color	Olor	pH	D.S.
BB	15	Normal	1,35	0,070710678	Blanco cremoso	Neutro	6,6	0,141421356
PB	12	Normal	1,6	0,282842712	Blanco cremoso	Neutro	6,65	0,212132034

ANEXO B: VALORACIÓN SEMINAL MICROSCÓPICA (PRE- CONGELACIÓN)

MACHO	Motilidad masal (ptos)	Motilidad individual (%)	Vitalidad (%)	Concentración espermática (spz/ml)	Morfoanomalías (%)
PB	4	87,5	80	3700	20
BB	3	72,5	70	1800	30

ANEXO C: MOTILIDAD INDIVIDUAL (POST-CONGELACIÓN).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

		REPETICIONES				
T (Niveles de CLC)	Raza	I	II	III	Suma	Promedio
0	BB	50	52,5	45	147,5	49,17
0.5	BB	37,5	27,5	30	95	31,67
1	BB	27,5	10	10	47,5	15,83
1,5	BB	27,5	12,5	12,5	52,5	17,50
0	PB	45	37,5	20	102,5	34,17
0.5	PB	12,5	12,5	10	35	11,67
1	PB	17,5	10	7,5	35	11,67
1,5	PB	30	15	15	60	20,00
Promedio general						23,96
Desviación estándar						14,2
Coefficiente de variación						32,58

ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Raza (Factor A)	504,17	1	504,17	8,27	0,0110
T (Niveles de CLC)	2701,04	3	900,35	14,77	0,0001
Raza (Factor A) *T(Niveles)	468,75	3	156,25	2,56	0,0910
Error	975,00	16	60,94		
Total	4648,96	23			

PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY ($P \leq 0,05$)

RAZA FACTOR	Medias	n	E. E	Rango
A				
BB	28,54	12	2,25	A
PB	19,38	12	2,25	B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)				

ANEXO D: VIABILIDAD (POST-CONGELACIÓN).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

T (Niveles de CLC)	Raza	REPETICIONES			Suma	Promedio
		I	II	III		
0	BB	65	50	45	160	53,33
0.5	BB	35	27,5	30	92,5	30,83
1	BB	27,5	10	7,5	45	15,00
1,5	BB	27,5	12,5	12,5	52,5	17,50
0	PB	60	40	17,5	117,5	39,17
0.5	PB	12,5	12,5	10	35	11,67
1	PB	15	10	7,5	32,5	10,83
1,5	PB	30	15	15	60	20,00
Promedio general						24,79
Desviación estándar						16,83
Coeficiente de variación						41,83

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Raza (Factor A)	459,38	1	459,38	4,27	0,0553
T (Niveles de CLC)	3903,13	3	1301,04	12,10	0,0002
Raza (Factor A) *T(Niveles)	428,13	3	142,71	1,33	0,3005
Error	1720,83	16	107,55		
Total	6511,46	23			

PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN TUKEY ($P \leq 0,05$)

RAZA FACTOR A	Medias	n	E. E	Rango
BB	29,17	12	2,99	A
PB	20,42	12	2,99	A

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

ANEXO E: INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA (Post-Congelación).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

T (Niveles de CLC)	Raza	REPETICIONES			Suma	Promedio
		I	II	III		
0	BB	14	20	20	54	18,00
0.5	BB	40	30	45	115	38,33
1	BB	27	25	25	77	25,67
1,5	BB	23	21	23	67	22,33
0	PB	10	12	12	34	11,33
0.5	PB	25	27	25	77	25,67
1	PB	28	27	28	83	27,67
1,5	PB	18	20	18	56	18,67
Promedio general						23,46
Desviación estándar						8,086
Coeficiente de variación						13,25

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Raza (Factor A)	165,38	1	165,38	17,11	0,0008
T (Niveles de CLC)	1015,79	3	338,60	35,03	<0,0001
Raza (Factor A) *T(Niveles)	168,12	3	56,04	5,80	0,0070
Error	154,67	16	9,67		
Total	1503,96	23			

PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN JOLLIFE ($P \leq 0,05$)

RAZA FACTOR A	Medias	n	E. E	Rango
BB	26,08	12	0,90	A
PB	20,83	12	0,90	B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)				

ANEXO F: MORFOANOMALÍAS (Post-Congelación).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

T (Niveles de CLC)	Raza	REPETICIONES			Suma	Promedio
		I	II	III		
0	BB	18	14	14	46	15,33
0.5	BB	17	20	18	55	18,33
1	BB	27	11	11	49	16,33
1,5	BB	18	17	18	53	17,67
0	PB	16	23	13	52	17,33
0.5	PB	16	16	16	48	16,00
1	PB	13	16	13	42	14,00
1,5	PB	13	14	13	40	13,33
Promedio general						16,04
Desviación estándar						3,677
Coeficiente de variación						24,44

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de variación	SC	GL	CM	F	p-valor
Raza (Factor A)	18,38	1	18,38	1,20	0,2905
T (Niveles de CLC)	14,46	3	4,82	0,31	0,8154
Raza (Factor A) *T(Niveles)	32,13	3	10,71	0,70	0,5676
Error	246,00	16	15,38		
Total	310,96	23			

PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN JOLLIFE (P≤0,05)

RAZA FACTOR A	Medias	n	E. E	Rango
BB	16,92	12	1,13	A
PB	15,17	12	1,13	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)				

ANEXO G: ESTADÍSTICA DEL FACTOR A (RAZAS).

RAZAS (FACTOR A)							
	BB		PB		E. E	PB	SIG
Motilidad individual (%)	28,54	A	19,38	B	2,25	0,011	*
Viabilidad espermática (%)	29,17	A	20,42	A	2,99	0,05	NS
Integridad de la membrana (%)	26,08	A	20,83	B	0,90	0,008	*
Morfoanomalías (%)	16,92	A	15,17	A	1,13	0,29	NS

ANEXO H: ESTADISTICA DEL FACTOR B (NIVELES DE CLC).

NIVELES DE CLC FACTOR (B)											
									E. E	PB	SIG
	0		0,5		1		1,5				
Motilidad individual (%)	41,67	A	21,67	B	13,8	B	18,75	B	3,19	0,0001	*
Viabilidad espermática (%)	46,25	A	21,25	B	12,9	B	18,75	B	4,23	0,0002	*
Integridad de la membrana (%)	14,67	D	32	A	26,7	B	20,5	C	1,27	0,0001	*
Morfoanomalías (%)	16,33	A	17,17	A	15,2	A	15,5	A	1,6	0,8154	NS

ANEXO I: ADEVA DE LA REGRESIÓN MOTILIDAD INDIVIDUAL RAZA BLACKBELLY.

Resumen	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,90376464
Coefficiente de determinación R ²	0,81679052
R ² ajustado	0,7760773
Error típico	7,26562811
Observaciones	12

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	2	2118,125	1059,0625	20,0620478	0,000482243
Residuos	9	475,1041667	52,7893519		
Total	11	2593,229167			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	49,9583333	4,088597325	12,2189419	6,59982E-07
Variable X 1	-50,9166667	13,13183978	-3,87734449	0,003746547
Variable X 2	19,1666667	8,389624692	2,28456783	0,048201047

ANEXO J: ADEVA DE LA REGRESIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA RAZA BLACKBELLY.

Resumen	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,89886369
Coefficiente de determinación R ²	0,80795594
R ² ajustado	0,76527948
Error típico	8,52284512
Observaciones	12

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	2	2750,41667	1375,20833	18,9321224	0,00059608
Residuos	9	653,75	72,6388889		
Total	11	3404,16667			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	49,9583333	4,088597325	12,2189419	6,59982E-07
Variable X 1	-50,9166667	13,13183978	-3,87734449	0,003746547
Variable X 2	19,1666667	8,389624692	2,28456783	0,048201047

ANEXO K: ADEVA DE LA REGRESIÓN: INTEGRIDAD D E LA MEMBRANA DE LA RAZA BLACKBELLY.

Resumen	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,9083679
Coefficiente de determinación R ²	0,82513225
R ² ajustado	0,75955684
Error típico	4,27200187
Observaciones	12

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	3	688,916667	229,638889	12,58295282	0,002133814
Residuos	8	146	18,25		
Total	11	834,916667			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>
Intercepción	18	2,46644143	7,29796369	8,4053E-05
Variable X 1	101,888889	18,9272486	5,38318542	0,000659122
Variable X 2	-150,666667	33,4564393	-4,50336825	0,001993199
Variable X 3	56,4444444	14,7070152	3,83792657	0,004961766

ANEXO L: ADEVA DE LA REGRESIÓN DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL DE LA RAZA PELIBUEY.

Resumen	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,79634951
Coefficiente de determinación R ²	0,63417254
R ² ajustado	0,55287755
Error típico	7,94148158
Observaciones	12

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	2	983,958333	491,979167	7,8008809	0,01083287
Residuos	9	567,604167	63,0671296		
Total	11	1551,5625			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	33,4583333	4,46892131	7,48689247	3,7439E-05
Variable X 1	-54,75	14,3533721	-3,81443466	0,00412497
Variable X 2	30,8333333	9,17003305	3,36240155	0,00835722

ANEXO M: ADEVA DE LA REGRESIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA RAZA PELIBUEY.

Resumen	
Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,75734016
Coefficiente de determinación R ²	0,57356412
R ² ajustado	0,47880059
Error típico	11,2010251
Observaciones	12

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	2	1518,75	759,375	6,05258303	0,02159443
Residuos	9	1129,16667	125,462963		
Total	11	2647,91667			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	38,3333333	6,30316891	6,08159703	0,0001833
Variable X 1	-66,6666667	20,2446457	-3,29305179	0,00933279
Variable X 2	36,6666667	12,9338297	2,83494275	0,01956395

ANEXO N: ADEVA DE LA REGRESIÓN: INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA DE LA RAZA PELIBUEY.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0,99109202
Coefficiente de determinación R ²	0,9822634
R ² ajustado	0,97832194
Error típico	0,99628941
Observaciones	12

ANÁLISIS DE VARIANZA					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	2	494,733333	247,366667	249,212687	1,32E-08
Residuos	9	8,93333333	0,99259259		
Total	11	503,666667			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
Intercepción	11,4	0,56064337	20,3337819	7,8459E-09
Variable X 1	39,8	1,80068574	22,1026907	3,7534E-09
Variable X 2	-23,3333333	1,15041592	-20,2825195	8,0227E-09

ANEXO O: EVALUACIÓN MACRO Y MICROSCÓPICA DEL SEMEN DE LA RAZA BLACKBELLY Y PELIBUEY PRE- CONGELACIÓN.



ANEXO P: EVALUACIÓN SEMINAL POST CONGELACIÓN DEL SEMEN OVINO DE LA RAZA BLACKBELLY Y PELIBUEY





epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 09 / 08 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Sandra Paulina Mullo Paucar
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias Pecuarias
Carrera: Zootecnia
Título a optar: Ingeniera Zootecnista
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz


Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



1582-DBRA-UTP-2023