

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA

“Efecto de la GnRH sintética sobre la calidad del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada.”

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

NOMBRE DEL AUTOR:

ANA FERNANDA ARIAS VALLEJOS

NOMBRE DEL TUTOR:

ING. GONZALO ARAGADVAY YUNGÁN, Mg.

CEVALLOS-ECUADOR

ENERO 2020

A. PÁGINAS PRELIMINARES

FIRMAS DE LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL CALIFICADOR

“ Efecto de la GnRH sintética sobre la calidad del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada. ”

APROBADO POR:

FECHA:



Ingeniero Marco Pérez, PhD.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

06 – Agosto - 2020

Ingeniero Zootecnista Ricardo Guerrero, Mg

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

06 - Agosto - 2020

Dr. Marco Rosery, Mg

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

06 - Agosto - 2020

APROBACIÓN DE TUTOR

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FECHA: 29/01/2020

NOMBRE DEL ESTUDIANTE: Ana Fernanda Arias Vallejos

MODALIDAD DE TITULACIÓN: Trabajo de titulación o tesis

TEMA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN: Efecto de la GnRH sintética sobre la calidad del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada.

FECHA DE APROBACIÓN DE LA PROPUESTA DE TRABAJO DE TITULACION POR EL CONSEJO DIRECTIVO: 05/07/2019

PORCENTAJE DE AVANCE DE ACUERDO CON EL CRONOGRAMA (%):100%

| FECHA | ACTIVIDAD |
|--|---|
| 19/10/2019 26/10/2019 02/11/2019 | Análisis de pajuelas congeladas T0; Evaluación de calidad seminal a las 0.2 y 4 horas post-descongelación |
| 02/11/2019 09/11/2019 15/11/2019 | Análisis de pajuelas congeladas T1; Evaluación de calidad seminal a las 0.2 y 4 horas post-descongelación. |
| 02/11/2019 09/11/2019 | Periodo del experimento tratamiento 2(T2) Extracción y congelación de pajuelas Evaluación de calidad seminal a las 0.2 y 4 horas post-descongelación. |
| 18/11/2019 25/11/2019 | Tabulación de los datos |
| 28/01/2020 | Presentación del proyecto final |

OBSERVACIONES: Las actividades se cumplen de acuerdo con el cronograma establecido.


ING. GONZALO ARAGADVAY
TUTOR TRABAJO TITULACIÓN

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado "**Efecto de la GnRH sintética sobre la calidad del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada.**" como uno de los requisitos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



Ana Fernanda Arias Vallejos

C.I.1723075295

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DEL GRADO



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Casilla 18-01-334 - Telfs. 2580281 – 2580191

Cevallos-Tungurahua

e.mail fiagruta@hotmail.com

H. CONSEJO DIRECTIVO

Cevallos julio 05, 2019
Resolución N° 475-2019-CD-FCAGP

Ingeniero Mg.
Giovanny Velástegui Espín
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Presente.-

De mi consideración:

Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en sesión ordinaria realizada el viernes 05 de julio del 2019; en atención al Acuerdo UTMVZ-P-070-2019 de fecha 04 de julio de 2019, suscrito por el Ing. Mg. Patricio Núñez Torres, Presidente de la Unidad Titulación: **ACEPTANDO LA INSCRIPCIÓN** en la Unidad de Titulación de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, a la señorita ARIAS VALLEJOS ANA FERNANDA, con la Modalidad de Graduación: **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**; **SUGIRIENDO** al H. Consejo Directivo de Facultad, apruebe la inscripción en la Unidad de Titulación a la señorita ARIAS VALLEJOS ANA FERNANDA, con la Modalidad de Graduación: **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**, con el Tema: "EFECTO DE LA GnRH SINTÉTICA SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DILUIDO CON DOS PRODUCTOS COMERCIALES, DE CARNEROS CRIOLLOS ALIMENTADOS CON *Medicago sativa* CONTAMINADA"; y **SUGERIR** al H. Consejo Directivo de Facultad, que se designe: TUTOR: Ingeniero Gonzalo Aragadvay; resuelve:

1. **APROBAR LA INSCRIPCIÓN EN LA UNIDAD DE TITULACIÓN DE LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTEENIA, A LA SEÑORITA ARIAS VALLEJOS ANA FERNANDA, CON LA MODALIDAD DE GRADUACIÓN: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN;**
2. **APROBAR EL TEMA DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN, DESIGNAR AL ING. GONZALO ARAGADVAY TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, CON EL TEMA: "EFECTO DE LA GnRH SINTÉTICA SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DILUIDO CON DOS PRODUCTOS COMERCIALES, DE CARNEROS CRIOLLOS ALIMENTADOS CON *Medicago sativa* CONTAMINADA"; Y AUTORIZAR LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE CAMPO; Y,**
3. **INDICAR AL TUTOR EL NUMERAL 7.4.1 DEL "INSTRUCTIVO DEL REGLAMENTO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE TERCER NIVEL, DE GRADO EN LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO": "Con la Resolución de aprobación del Consejo Directivo de la propuesta del trabajo de titulación el estudiante iniciará con el desarrollo del mismo. El Tutor deberá entregar de manera obligatoria un informe mensual (ANEXO 6) del avance del trabajo de titulación del estudiante en la secretaría de la Unidad de Titulación, el tiempo de presentación del informe se contabilizará a partir de la fecha de aprobación de la propuesta por parte del Consejo Directivo de Facultad".**

Atentamente,

Ing. Mg. Giovanny Velástegui Espín
PRESIDENTE



P.C. ING. GONZALO ARAGADVAY
SRTA. ARIAS VALLEJOS ANA FERNANDA
CARPETA ESTUDIANTIL

TUTOR
ESTUDIANTE

SMS

"Sembremos juntos un futuro brillante"

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a Dios quien me ha llevado por el camino adecuado para lograr esta gran meta.

A mi estimada y dulce Madre que con ejemplo, perseverancia y valentía fue el estandarte que me condujo a seguir adelante y obtener lo que me propongo.

Todo mi esfuerzo se refleja en este trabajo y es un orgullo podérselo brindar. Usted sabe el amor que le tengo y es por usted que hice todo esto, para llenarla de felicidad.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a mis padres que me enseñaron el valor de luchar por los sueños hasta el final y a mis queridas tías Conysita y Martita que siempre me ayudaron y han sido de bendición en mi vida.

A mi estimado Tutor el Ing. Gonzalo Aragadvay que me apoyo con sus conocimientos, paciencia, motivación y aliento en la realización de este proyecto. Gracias por la calidez y gran generosidad que me supo brindar para poder lograr esta investigación. A mis asesores Dr. Marco Rosero y al Ing. Ricardo Guerrero quienes me guiaron para realizar con mayor comprensión este proyecto, llegando a tener el privilegio de contar con su ayuda en este trabajo.

Al MVZ Jorge Moposita que me instruyo con conocimientos, paciencia y calidad humana en el transcurso de mi carrera y cuando llegue a laborar con su persona. Gracias Doctor por brindarme su amistad y sus grandes consejos en esta hermosa carrera.

Agradezco al Ing. Andrés Tipán que me dio la mano para crecer como persona y profesional, que me enseñó a tener confianza en los caminos de Dios y me sustentó con fe en mí misma a través de sus consejos y al haberme acogido como padre y profesor en la familia Fénix Taekwondo.

Y a mis preciados amigos: Elizabeth Aldaz, Alexa Basantes, José Salas, Cristina Vargas y Alexander Viracocha que gracias a sus consejos, cariño y apoyo me dieron las fuerzas para luchar por este gran sueño y fueron mi familia en esta tierrita linda que me acogió para culminar mi hermosa carrera.

Sin olvidar a los futuros colegas y estudiantes de Reproducción Animal de octavo semestre de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que con calidad y armonía profesional colaboraron en el desarrollo de mi proyecto de investigación.

Mis más estimados agradecimientos a todos, porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| A. PÁGINAS PRELIMINARES | 2 |
| FIRMAS DE LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL CALIFICADOR | 2 |
| APROBACIÓN DE TUTOR | 3 |
| AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN | 4 |
| APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DEL GRADO | 5 |
| DEDICATORIA | 6 |
| AGRADECIMIENTO | 7 |
| RESUMEN EJECUTIVO | 11 |
| SUMMARY | 12 |
| B. CONTENIDOS | 12 |
| CAPITULO I.-MARCO TEÓRICO | 12 |
| 1.1 Antecedentes investigativos..... | 12 |
| 1.2 Objetivos..... | 17 |
| 1.2.1 Objetivo General:..... | 17 |
| 1.2.2 Objetivos Específicos:..... | 17 |
| CAPITULO II.-METODOLOGÍA. | 18 |
| 2.1 MATERIALES | 18 |
| 2.1.1 Equipos Y Materiales:..... | 18 |
| 2.2 Métodos..... | 20 |
| CAPITULO III..... | 36 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 36 |
| 3.1 Análisis y discusión de los resultados..... | 36 |
| 3.1 Verificación de hipótesis..... | 49 |
| CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 49 |
| 4.1 CONCLUSIONES | 49 |
| 4.2 RECOMENDACIONES | 50 |
| C.MATERIALES DE REFERENCIA..... | 51 |
| Referencias bibliográficas..... | 51 |
| Anexos | 57 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Composición nutricional de la dieta experimental a utilizar para la alimentación de carneros..... | 22 |
| Tabla 2: Anomalías primarias y secundarias | 34 |
| Tabla 3: Efecto del acetato de buserelina sobre la concentración en fresco de eyaculado y sobre la concentración de semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada/ADEVA. | 36 |
| Tabla 4: Efecto del acetato de buserelina sobre la concentración, motilidad masal y motilidad individual progresiva del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada/Arreglo factorial. | 37 |
| Tabla 5: Efecto del acetato de buserelina sobre la concentración, motilidad masal e individual del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada. /Arreglo factorial | 38 |
| Tabla 6: Efecto del acetato de buserelina sobre la morfología del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada/ADEVA. | 39 |
| Tabla 7: Efecto del acetato de buserelina sobre la morfología del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada /ADEVA..... | 40 |
| Tabla 8: Efecto del acetato de buserelina sobre las morfoanomalías del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada..... | 41 |
| Tabla 9: Efecto del acetato de buserelina sobre la integridad acrosomal y la resistencia osmótica del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada/ADEVA | 42 |
| Tabla 10: Efecto del acetato de buserelina sobre la resistencia osmótica del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con <i>Medicago sativa</i> contaminada/arreglo factorial | 44 |

INDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1: Diagrama de extracciones de semen, elaboración y congelación de las pajuelas seminales correspondientes al tratamiento control. | 23 |
| Gráfico 2: Diagrama de aplicación de GnRH, extracciones, elaboración y congelación de pajuelas de semen correspondiente a los tratamientos (G1D1 y G1D2)..... | 24 |
| Gráfico 3: Diagrama de aplicación de GnRH, extracciones, elaboración y congelación de pajuelas de semen correspondiente al tratamiento (G2D1 y G2D2)..... | 25 |
| Gráfico 4: Conteo de espermatozoides por medio de la cámara de Neubauer..... | 26 |

RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto de la GnRH sintética sobre la calidad del semen criopreservado en pajuelas de 0.5 ml, diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada al 70% con *Pseudopeziza medicaginis*. Los tratamientos se distribuyeron de la siguiente manera: **G0D1**: Se usó semen diluido con Triladyl obtenido de carneros que no recibieron GnRH; **G0D2**: Semen diluido con Andromed de ovino que no recibieron GnRH; **G1D1**: carneros tratados con GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2**: Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1**: Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2**: Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed. Se trabajó con 36 unidades experimentales con los dos diferentes dilutores comerciales. Llegando a evaluar 108 pajuelas ovinas en total. El trabajo se llevó a cabo bajo un diseño completamente al azar en arreglo factorial 3*2 con 6 repeticiones. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante un análisis de varianza y una comparación de promedio de tratamientos con un Test de Tukey al 5% mediante el programa estadístico infostat.

Se analizaron las siguientes variables: motilidad masal (MMSL), motilidad individual progresiva (MIP), resistencia osmótica (HOST), morfología espermática (MRF), concentración espermática (CONC) e integridad del acrosoma. Las variables que mostraron diferencias entre tratamientos fueron: Motilidad masal (MMSL), la motilidad individual progresiva (MIP), en la integridad del acrosoma y en la resistencia osmótica (HOST). La conclusión general es que la GnRH influye positivamente sobre la calidad de semen ovino post descongelado.

SUMMARY

The purpose of the present investigation was to evaluate the effect of synthetic GnRH on the quality of cryopreserved semen in 0.5 ml straws, diluted with commercial products, raw meat fed with 70% of *Medicago sativa* contaminated with *Pseudopeziza medicaginis*. The treatments are distributed according to the following: G0D1: only semen diluted with Triladyl obtained from types that do not receive GnRH; G0D2: Semen diluted with Andromed from sheep that did not receive GnRH; G1D1: two-dose GnRH-treated cartridges diluted with Triladyl; G1D2: semen from animals treated with GnRH at two doses diluted with Andromed; G2D1: Semen from animals treated with GnRH in alternative doses diluted with Triladyl; G2D2: Semen from animals treated with GnRH in alternative doses diluted with Andromed. It works with 36 experimental units with different commercial diluents. Starting to evaluate 108 sheep straws in total. The work will be carried out through a completely random design in a 3 * 2 factorial arrangement with 6 repetitions. Statistical analyzes were carried out using a variance analysis and a comparison of the average treatment with a 5% Tukey test using the statistical program.

The following variables were analyzed: mass motility (MMSL), individual progressive motility (MIP), osmotic resistance (HOST), sperm morphology (MRF), sperm concentration (CONC) and acrosome integrity. The variables that showed differences between treatments: massive motility (MMSL), progressive individual motility (MIP), acrosomatic integrity and osmotic resistance (HOST). The general conclusion is that GnRH positively influences the semen quality of sheep after defrosting

B. CONTENIDOS

CAPITULO I.-MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

La explotación del ganado ovino a nivel nacional es de tipo extensivo y se ha manifestado que este tipo de producción ha llegado a generarse a través de los años por medio de la crianza de razas criollas y mestizas. Es por esto que la crianza de ganado ovino es uno de los sectores más antiguos y tradicionales del Ecuador, que genera ingresos económicos para los pequeños campesinos criadores de esta especie **(Cajilema 2017)**.

Por lo cual es preponderante mencionar que varios productores de este tipo de ganado han utilizado a través de los años, ovinos de diferentes razas cruzadas con criollos con el fin de generar una adecuada adaptabilidad y una mejor calidad de carne y de lana, por lo cual se busca utilizar reproductores con una óptima calidad seminal que aseguren la obtención de una progenie de alto rendimiento productivo y gran resistencia hacia factores climáticos y enfermedades. **Tapia (2014)** menciona que la gran mayoría de productores ovinos cuentan con rebaños con una capacidad reproductiva baja por lo cual no se manifiestan índices de preñez significativos junto con inexistencia de un incremento en su productividad, a la par de que los productores de ovinos se han desmotivado por el bajo número de nuevas crías en sus hatos, llegando a ser un factor que impide incrementar su capacidad económica.

Por otra parte la **Asociación Nacional de Criadores de Ovejas del Ecuador (s/f)** indica que en el país existe aproximadamente el 90 % de ovinos criollos en su mayoría en estado puro y otras manadas en proceso de mestizaje. Se ha registrado que la gran mayoría se hallan ubicadas en la sierra principalmente en las provincias de Chimborazo y que el resto de la población ovina se encuentra en provincias de Cotopaxi, Bolívar, Tungurahua, Pichincha, etc. A la par se menciona que, entre sus

características como ganado criollo, estos animales son saludables, longevos, prolíficos y en el caso de las hembras son buenas madres, de igual manera son animales rústicos tanto, al manejo como a las enfermedades y se encuentran adaptados a las diversas condiciones climáticas del país. Por lo cual esta investigación se basa en el rescatar las particularidades genéticas del ganado criollo, debido a que presenta valiosas características reproductivas y de rusticidad.

Es por esto que se toma en cuenta que la calidad seminal del ganado criollo debe ser de óptimas características para obtener mejorías en los niveles reproductivos de los hatos, con el fin de obtener crías que manifiesten características genéticas que mejoraran los niveles productivos de los rebaños.

Por lo cual esta investigación tuvo como objetivo, la evaluación de pajuelas de semen crio preservado de carneros, ya que se puede mencionar que entre los beneficios que otorga esta biotecnología de la crio preservación consta el favorecer el comercio nacional e internacional de razas o líneas genéticas lo cual podría generar una fuente importante de comercio cárnico hacia países extranjeros; sin olvidar que la crio preservación también posee grandes ventajas como lo son el preservar información genética y mantener la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo(**Choez 2010**).

Se define a la crio preservación seminal como una técnica mediante la cual el material biológico, puede ser mantenido viable por un tiempo indefinido; a la par de que esta biotecnología constituye una alternativa para el establecimiento de bancos genéticos, los cuales ayudan a mantener la biodiversidad y asegurar la conservación física de una especie .Por lo cual es importante mencionar que la crio preservación del semen depende de varios factores como lo son el diluyente, el crioprotector usado y el tamaño del sistema de empaque(**Medina-Robles, V. M.; Sanchez-Carvajal, E.; Velasco-Santamaria, Y.M.; Cruz-Casallas 2007**)

Es por este motivo que se generó la incógnita de la influencia del tipo de diluyente que se utiliza en la criopreservación de pajuelas sobre la calidad seminal. Ya que varias investigaciones en ovinos han mostrado que probablemente la viabilidad del semen de pajuelas criopreservadas se ve influenciado por la proporción de ácido cítrico que contienen los dilutores, ya que este elemento ejerce una acción directa en la membrana espermática en la fijación de calcio que, junto con los iones de sodio y potasio, mantienen el equilibrio osmótico favoreciendo la motilidad de los espermatozoides (**Cabrera et al. 2011**). Además, se menciona que los diluyentes de semen contienen agentes protectores para las membranas celulares que deberán pasar por el proceso de enfriamiento a 5 °C (generalmente se utiliza la yema de huevo) y en el proceso de congelación (generalmente se utiliza el glicerol) para evitar lesiones de la membrana (**Hafez, 1996**). Se destaca que la adición de yema de huevo al dilutor tiene un efecto benéfico sobre el porcentaje de motilidad, particularmente después de un rápido enfriamiento del semen. Debido a que las lipoproteínas de baja densidad actúan como crioprotectores, ya que protegen contra el shock térmico (factor de resistencia) y mantienen la viabilidad. Además de que entre los beneficios de la dilución del semen para la IA se destacan razones técnicas como incrementar el volumen de eyaculado para inseminar un mayor número de hembras(**Cabrera et al. 2011**).

La variación de esta investigación acerca de la influencia de diferentes diluyentes en el proceso de congelación de pajuelas, tuvo referencia con previos estudios realizados, debido a que se llegó a conocer el efecto sobre la calidad seminal de carneros que fueron tratados hormonalmente con GnRH sintética (acetato de buserelina en una dosis de 12 µg/2,8ml/carnero, I.M.), ya que se ha evaluado que esta hormona sintética incrementa el fluido testicular en carneros (**Fila, Carabetta, Gomez, & Ungerfeld 1985**).

Por otro lado, se mencionó la presencia de un estudio en el cual se administró diariamente acetato de buserelina para mejorar la calidad espermática en carneros, durante la época no reproductiva, para poder determinar si se generaba el aumento de las concentraciones plasmáticas de testosterona.

Dando como resultado que las concentraciones de testosterona plasmáticas fueron más elevadas en los animales del tratamiento control generándose el aumento inmediato 10h posteriormente a la administración de la primera dosis de acetato de buserelina.

El estudio concluyó que es posible la administración diaria de buserelina para un aumento rápido de testosterona plasmática y que el mismo influye en la calidad espermática(**Giriboni et al. 2019**).

A nivel fisiológico la GnRH es la hormona liberadora de gonadotropina, la cual actúa en el eje hipotálamo- hipofisario, la cual estimula la producción de LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante), las cuales actúan directamente en la producción de células de Leydig (LH) como productoras especializadas de testosterona y células de Sertoli (FSH) en la espermatogénesis .

González Jiménez et al. (2016) menciona que la calidad seminal se ve afectada por el continuo consumo de alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis*, ya que este hongo se encuentra regularmente en los pastizales a nivel interandino, produciendo fitoalexinas de tipo cumestranos estrogénicos, los cuales por su capacidad de unirse a los receptores de estrógenos dentro del organismos provoca cambios reproductivos. Además **Pérez et al. (2007)** menciona que el fitoestrógeno (COU: Cumestrol) es capaz de suprimir los picos de LH en ratas y ovejas; llegando a actuar directamente en la neurona receptora de gonadotropina (GnRH).

La ingesta de alfalfa con 70% de contaminación con *Pseudopeziza medicaginis* tiene efectos nocivos sobre la morfología de los espermatozoides especialmente alteraciones en la cola y como consecuencia una baja en la movilidad espermática tanto individual como masal, los cuales son perjudiciales sobre los índices reproductivos. Esta conclusión llegó a establecerse a través de la evaluación de la calidad seminal de carneros criollos alimentados con una dieta que tenía alfalfa contaminada a 3 niveles de *Pseudopeziza medicaginis* T1:10% T2:30% T3:70% (**Novillo 2016**) .

Por lo que al evaluar la influencia de los dilutores Triladyl y AndroMed sobre la calidad del semen crio preservado en pajuelas de 0.5 ml, de carneros criollos tratados con GnRH sintética, pudo determinar si las variables en estudio generaron una solución a los bajos niveles de calidad seminal de carneros que consumen continuamente fitoestrógenos que se hallan en la alfalfa.

Se eligió estos dos tipos de diluyentes debido a que son fabricados bajo las normas GMP (Good Manufacturing Practice / Las Buenas Prácticas de Fabricación) y han sido parte de investigaciones que dan el aval de su eficacia como diluyentes de semen crio preservado en ovinos como en otras especies de rumiantes (**Minitube 2014**).

AndroMed® (Minitube, Tiefenbach, Alemania).

Es un diluyente comercial para semen de toros y rumiantes menores, su presentación es en frascos de 200 ml. Y posee las siguientes particularidades:

- a) Es apropiado para la presentación de semen fresco a +5°C hasta +10°C.
- b) Tiene ausencia de componentes de origen animal (tales como yema de huevo)
- c) Previenen efectos indeseados de hormonas, bacterias y residuos de drogas.
- d) Es un medio altamente transparente que entrega imágenes de semen extremadamente claras bajo el microscopio (**Galarza 2013**).

AndroMed® está siendo utilizado con eyaculados de baja concentración y a altas tasas de dilución (bajo 10 millones de células por pajuela), que contienen fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Tilosina 5,0 mg, Gentamicina 25,0 mg, Espectinomycinina 30,0 mg, Lincomicina 15,0 mg, todo en 100 ml) (**Galarza 2013**).

Triladyl® (Minitube, Tiefencach, Alemania).

Es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso, que está basado en TRIS (Hidroxi-metil aminometano, un amortiguador sintético), y además contiene agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructuosa, y por cada 100 ml contiene los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomicina 15 mg. Para su preparación se le adiciona tres partes de agua destilada, una parte de yema de huevo y 1 parte del concentrado comercial Triladyl® (20%) (Minitube, sf)

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General:

Evaluar el efecto de la GnRH sintética sobre la calidad del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada.

1.2.2 Objetivos Específicos:

- ❖ Evaluar los efectos de GnRH sintética (12 ug) a dosis continua y alternada sobre la calidad espermática de semen ovino post-descongelado a través de un espermatograma.
- ❖ Determinar los cambios en la calidad de semen criopreservado en función del tiempo de post-descongelación a las 0 - 2 y 4 horas.
- ❖ Evaluar la eficacia protectora de Triladyl y Andromed en la criopreservación de semen ovino a través de un espermatograma.

CAPITULO II.-METODOLOGÍA.

2.1 MATERIALES

2.1.1 Equipos Y Materiales:

✓ Equipos

- Microscopio Leica DM300
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Cámara de Neubauer
- Baño María
- Termo de nitrógeno
- Platina térmica
- Micropipetas de 20-200 ul

✓ Materiales

- Cajas Petri
- Agua bidestilada
- Nitrógeno líquido
- Alfalfa al 70% de severidad de *Pseudopeziza medicaginis*
- Dieta alimenticia
- Gradilla
- Corrales
- Comederos
- Bebederos
- Vagina artificial
- Recolectores de semen (tubos Falcon)
- Balanzas de 100 Kg
- Cooler

- papel absorbente
- 2 probetas (100 y 50 ml)
- 3 vasos de precipitación (250 ml-100 ml-50ml)
- Pera absorbente
- Micropuntas de micropipeta
- papel de aluminio
- Termómetro de agua
- Termómetro común
- Pinzas anatómicas
- Jeringas de 3ml,10 ml
- Guantes
- Suero fisiológico
- NaCl 0.9%
- Alcohol
- Protocolo de congelamiento seminal
- Calculadora
- Marcador indeleble
- Tijera
- Pinza anatómica
- Pajuelas de 0.25 ml
- Esferas para pajuelas
- Papel filtro

✓ **Reactivos**

- Diluyente Triladyl
- Diluyente AndroMed
- Hormona GnRH (Acetato de buserelina) (GESTAR[®] OVER)
- Tinción eosina-nigrosina
- Solución hipos osmótica (fructosa y citrato de sodio)

✓ **Biológicos**

- Semen ovino de 9 carneros criollos
- Yemas de huevos orgánicos

✓ **Humanos**

Estudiantes de 8vo semestre de la cátedra de reproducción animal de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica De Ambato.

✓ **Institucional**

Laboratorio de dicha Universidad

2.2 Métodos

El experimento contó con varias etapas; la primera fue la compra y adaptación de los animales, para lo cual se adquirió 9 carneros criollos de 1,5 a 3 años aproximadamente que se estimaron basado en su cronología dentaria y un peso promedio de 35kg que posteriormente fueron trasladados a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

Los carneros se mantuvieron en corrales de 2.8 m de ancho x 3.0 m de largo y una altura de 1.2 m, de madera con malla de alambre, provistos de sombra, comedero y bebedero, así como con una adecuada iluminación y ventilación.

El experimento contó con varias etapas; la primera es la contaminación intencional del hongo a la alfalfa; utilizando el método descrito por **Morgan, W. C., & Parbery, D. G. 1977** en el laboratorio de sanidad vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Seguidamente, el Agar ya cultivado con el hongo *Pseudopeziza medicaginis* y con la ayuda de una aguja se realizó la contaminación en 3 botellas de 250ml de agua destilada, que durante 3 días permanecieron en la incubadora, posteriormente con la ayuda de una bomba de mochila se fumigó un alfalfar, 5 días después, se cortó y se colocó en una malla expuesta al sol para su secado.

La fase experimental se inició con un periodo de adaptación de 15 días donde los animales se ubicaron en corrales individuales, se realizó la estimulación de pene y testículos para acostumarlos a la extracción seminal (**Flores 2003**). Para la elaboración de la dieta experimental se utilizó harina de alfalfa al 70% de contaminación con *Pseudopeziza medicaginis*, en una dieta previamente establecida por **Novillo (2016)** (tabla 1), y basada en los requerimientos nutricionales recomendados por Nutrients requirements of sheep, 1997. Que aportó nutricionalmente con proteína 131g/kg MS⁻¹, energía 2439.2Kcal /kg MS⁻¹, calcio 2g/kg MS⁻¹ y fósforo 1,2g/kg MS⁻¹).

Todos los animales utilizados en los 6 tratamientos fueron alimentados con la misma dieta descrita en la tabla 1.

| Materia prima | Cantidad (%) | Proteína cruda (g/kg MS⁻¹) | Energía M (Kcal /kg MS⁻¹) | Calcio (g/kg MS⁻¹) | Fosforo (g/kg MS⁻¹) |
|----------------------|---------------------|--|---|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Alfalfa | 44 | 80 | 893.9 | 0.65 | 0.28 |
| Kikuyo | 9 | 4.6 | 162.2 | 0.0126 | 0.040 |
| Raygrass | 4 | 2.2 | 76.2 | 0.016 | 0.0064 |
| Maíz | 31 | 24.8 | 1009.7 | 0.13 | 0.062 |
| Polvillo | 5 | 6 | 136.4 | 0.003 | 0.009 |
| Afrecho de trigo | 4 | 4.8 | 131.1 | 0.008 | 0.026 |
| Melaza | 1 | 0.3 | 29.75 | 0.11 | 0.011 |
| Carbonato de calcio | 1 | 0 | 0 | 0.38 | 0 |
| Fosfato dicálcico | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.18 |
| Total: | 100% | 131 | 2439.2 | 2 | 1.2 |

(Novillo 2016)

Tabla 1: Composición nutricional de la dieta experimental a utilizar para la alimentación de carneros.

Para la fase de extracción se utilizó una vagina artificial que se elaboró con tubo PVC de 10, 12,15cm de largo por 5,5cm de ancho, con una válvula, la misma posee en su interior una manga de goma (tubo de bicicleta). Por medio de la válvula se colocó agua a 40°C (3/4) y aire (1/4) para generar presión y calor que al final del tubo se colocó una copa con tubo falcón (Novillo 2016).

El experimento contó con 6 tratamientos que se describen a continuación:

En los tratamientos control (G0D1 y G0D2) se utilizó tres ovinos adultos. Con los cuales se realizó 6 extracciones de semen durante 2 semanas consecutivas; los días 1, 4, 7, 8, 11 y 14 del periodo experimental, días en los cuales se realizó el proceso de elaboración y congelación de las pajuelas seminales de 0,5 ml. El gráfico 1 describe los días que se realizó las extracciones.

| SEMANA 1 | | | SEMANA 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Día 1 | Día 4 | Día 7 | Día 8 | Día 11 | Día 14 |
| extracción | extracción | extracción | extracción | extracción | extracción |
| Elaboración y congelación de las pajuelas seminales | Elaboración y congelación de las pajuelas seminales | Elaboración y congelación de las pajuelas seminales | Elaboración y congelación de las pajuelas seminales | Elaboración y congelación de las pajuelas seminales | Elaboración y congelación de las pajuelas seminales |

Gráfico 1: Diagrama de extracciones de semen, elaboración y congelación de las pajuelas seminales correspondientes al tratamiento control.

En los tratamientos (G1D1 y G1D2) se utilizó tres ovinos adultos. Este tratamiento tuvo una duración de 4 semanas. Durante la primera semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de buserelina) a dosis de 12 µg; 2,8ml/carnero.

En la segunda semana se realizó tres extracciones de semen los días 8, 11 y 14 y se elaboró y congeló las pajuelas.

Durante la tercera semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de buserelina) a dosis de 12 µg; 2,8ml/carnero.

Y en la cuarta semana se realizó tres extracciones de semen los días 22, 25 y 28, conjuntamente se elaboró y congeló las pajuelas seminales de 0,5ml del periodo experimental como se muestra en el grafico 2.

| SEMANA 1 | | | | | | | SEMANA 2 | | |
|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|------------|------------|
| Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 | Día 8 | Día 11 | Día 14 |
| GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | Extracción | extracción | extracción |
| | | | | | | | Elaboración y congelación de las pajuelas | | |
| SEMANA 3 | | | | | | | SEMANA 4 | | |
| Día 15 | Día 16 | Día 17 | Día 18 | Día 19 | Día 20 | Día 21 | Día 22 | Día 25 | Día 28 |
| GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | GnRH | extracción | extracción | extracción |
| | | | | | | | Elaboración y congelación de las pajuelas seminales. | | |

Gráfico 2: Diagrama de aplicación de GnRH, extracciones, elaboración y congelación de pajuelas de semen correspondiente a los tratamientos (G1D1 y G1D2).

En los tratamientos (G2D1 y G2D2) se utilizó tres carneros adultos. Los cuales fueron sometidos a un periodo de experimentación de 2 semanas. Durante la primera semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de buserelina) a dosis de 12 µg; 2,8ml/carnero; mientras que en la misma semana se realizaron tres extracciones de semen los días 1, 4 y 7 con la posterior elaboración y congelación del semen.

En la segunda semana todos los animales recibieron GnRH (acetato de buserelina) a dosis de 12µg; 2,8ml/carnero y de igual forma que en la misma semana se realizaron tres extracciones de semen los días 8, 11 y 14 con su respectivo proceso de elaboración y congelación de las pajuelas seminales como se explica en el grafico 3.

| SEMANA 1 | | | | | | |
|--|-------|--------|---|--------|--------|---|
| Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 | Día 5 | Día 6 | Día 7 |
| GnRH +Extracción y congelación de las pajuelas seminales | GnRH | GnRH | GnRH + Extracción y congelación de las pajuelas seminales | GnRH | GnRH | GnRH + Extracción, elaboración y congelación de las pajuelas seminales |
| SEMANA 2 | | | | | | |
| Día 8 | Día 9 | Día 10 | Día 11 | Día 12 | Día 13 | Día 14 |
| GnRH +Extracción y congelación de las pajuelas seminales | GnRH | GnRH | GnRH +Extracción y congelación de las pajuelas seminales | GnRH | GnRH | GnRH +Extracción, elaboración y congelación de las pajuelas seminales |

Gráfico 3: Diagrama de aplicación de GnRH, extracciones, elaboración y congelación de pajuelas de semen correspondiente al tratamiento (G2D1 y G2D2)

Luego de su recolección, fue importante que el semen se haya mantenido protegido de los cambios bruscos de temperatura por lo cual se lo mantuvo a 37°C en baño María, sin permitir que tenga contacto directo con agua, metales, radiación solar directa e impurezas. Por lo tanto, todo el material que entre en contacto con el eyaculado fue de vidrio o de plástico, estuvo limpio y seco, y a la misma temperatura que el semen. Fue de suma importancia que el tiempo que transcurrió entre la obtención del semen y el agregado del diluyente sea el menor posible (Cueto et al. 2016).

El volumen y concentración espermática fueron estimados antes de su utilización, para realizar una correcta dilución según el volumen y el número de espermatozoides totales a inseminar por dosis. El volumen promedio del eyaculado del carnero es de 1 ml (0.7-3 ml), y su concentración varía entre 2000-6000 millones de espermatozoides/ml (Cueto et al. 2016).

Concentración espermática

La concentración suele variar con el grado de estimulación del animal. A pesar de que la concentración varíe, este fue un importante indicador de la fertilidad potencial de un semental. (Cortez y Gallegos 2018). Para llevar a cabo esta prueba se realizó el método del conteo espermático por medio de la cámara de Neubauer.

Para obtener la concentración espermática se utilizó la siguiente fórmula

$$CE = N \times F \times D$$

CE= Concentración de espermatozoides.

N=Número de espermatozoides contados en los cinco cuadrantes

F= Factor de multiplicación: $1/50 \text{ mm}^3$

D = Factor de dilución: $1/200$

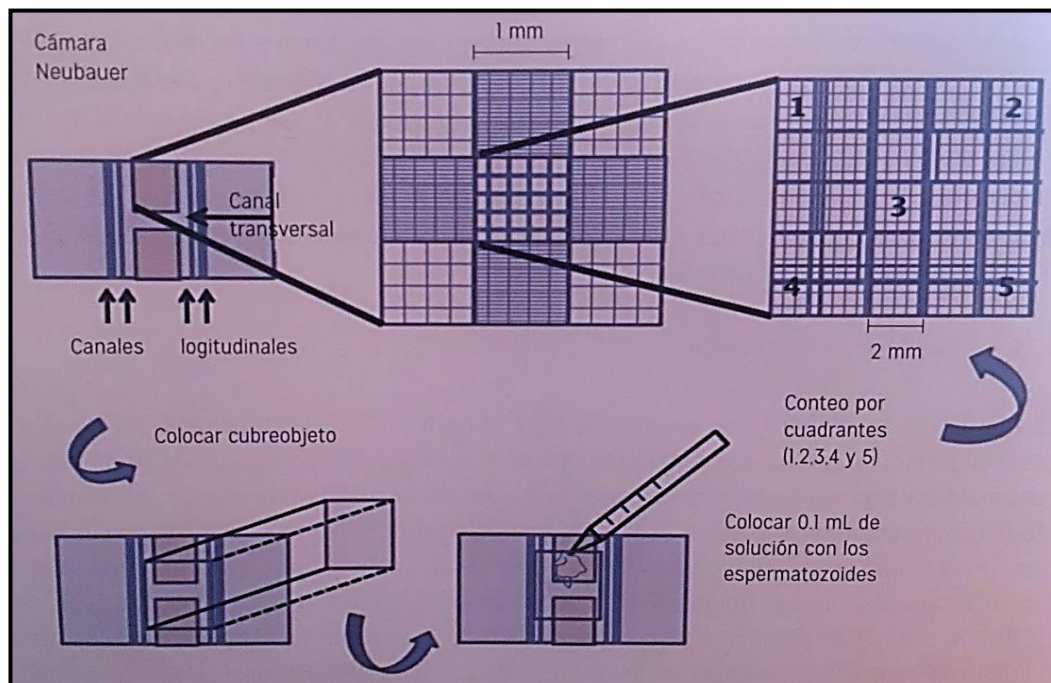


Gráfico 4: Conteo de espermatozoides por medio de la cámara de Neubauer

(Cortez y Gallegos 2018)

Cálculos

- a. Debido a que el área del cuadro tiene un volumen total de 0.1 mm^3 cada cuadro grande tiene un volumen de 0.004 ($0.1 \text{ mm}^3 / 25$ cuadros) se contabilizaron cinco cuadros grandes, constituyendo un volumen total de $5 (0.004) = 0.02 \text{ mm}^3 = 1/50 \text{ mm}^3$
- b. El semen se diluyó en una proporción 1.200 (una parte de semen, con 199 partes de solución salina formolada) (**López de Armentia 2019**).
- c. Por lo cual, el número de espermatozoides entre la fracción de volumen contabilizado por el factor de dilución era igual al número de espermatozoides por cada mm^3
$$\text{CE} = N \times 50 \times 200 / \text{mm}^3 = N \times 1000 / \text{mm}^3 \quad (N \times 1000) / (1/1000 \text{ cm}^3) =$$
$$1 \text{ cm}^3 \text{ equivale a } 1000 \text{ mm}^3, \text{ entonces } 1 \text{ mm}^3 = 1/1000 \text{ cm}^3 = 1/1000 \text{ ml}$$
$$\text{CE} = N \times 1000 \times 1000 / \text{cm}^3 = N \times 10 \times 10^6 / \text{cm}^3, \text{ CE} = N \times 10 \times 10^6 / \text{ml}$$

Al obtener la concentración por mililitro, esta se multiplicó por el volumen de semen obtenido, para luego obtener la concentración total de espermatozoides del eyaculado. Se realizó el método del conteo espermático por medio de la cámara de Neubauer. En el centro de esta cámara de cristal se encontraba grabado un cuadro de un milímetro de largo, dividido a su vez por microscópicas rayas, otros 400 cuadritos (Gráfico 4) (**Cortez y Gallegos 2018**).

Posteriormente a estas evaluaciones se realizó el proceso de congelación del semen por lo cual se realizó diferentes actividades como se indican a continuación:

Cálculo de dilución de semen para pajuelas

El cálculo se hizo de la siguiente manera para obtener el número de dosis por eyaculado:

$$\text{No. de dosis} = \frac{\text{Vol}(\text{mL}) * \text{Vivos}(\%) * \text{Concentración}(\text{mill por ml})}{\text{Concentración por pajuelas} (\text{mill por ml})}$$

Posterior al cálculo del número de dosis, se calculó la cantidad de diluyente a utilizar y esto se hace considerando el tamaño de la pajuela, para el caso de ovinos, se utilizaron pajuelas de 0.5 ml, en este caso es:

Volumen total= número de pajillas*0.5 ml

Cantidad de diluyente = volumen total- volumen de eyaculado.

Una vez que ya se tuvo el semen diluido, se mantuvo el semen a 36°C cuando se lo utilizo en fresco. Fue importante no tener variaciones en cuanto a la temperatura ya que esto podría generar variaciones en la viabilidad espermática. En el semen refrigerado era importante mantener cerrado el tubo en donde se mantenía el semen por la muerte de células espermáticas.

Preparación de congelamiento

Para la preparación de congelamiento de semen se procedía a la dilución del semen a través del uso de diluyentes comerciales como lo son el (Triladyl®) y (AndroMed®) de la casa comercial Minitube. **(Ramónez 2013)**.

Preparación de diluyente

Los diluyentes se prepararon según las recomendaciones de la casa comercial.

Andromed

El diluyente se mezcló en relación 1:4 con agua destilada estéril previamente temperada a +32 °C.

Para lograr las propiedades optimas de conservación de Andromed, la cantidad requerida de agua debía agregarse al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado Andromed se temperaba antes de su uso en un baño maría entre 30°C-32°C. Tras la llegada al laboratorio, al eyaculado se evaluaba y pre diluía en relación 1:1. El eyaculado era mantenido en baño María entre 30°C y 32°C como máximo durante 10

minutos. Al momento de la dilución el diluyente debía tener la misma temperatura que el eyaculado (+/- 1 C°).

Una vez evaluado el eyaculado se realizaba la dilución final. El eyaculado hasta entonces alcanzaba la temperatura de laboratorio. (+20°C a 23°C), y a esa temperatura era envasado en pajuelas de 0.5 ml. Estas pajuelas tenían una base de concentración de $50 * 10^6$ spz/dosis. Posteriormente, el semen diluido y envasado debía ser colocado en rejillas y equilibrado por al menos 2 a 3 horas a + 5C°, antes de ser criopreservado (**Ramónez 2013**).

Triladyl

Mientras que el Triladyl® (Minitube, Alemania) es un concentrado para la preparación de un diluyente de crioconservación de semen basado en TRIS el cual se lo encuentra en el mercado en una presentación de 250 ml. La solución madre se preparó mezclando una parte de concentrado de Triladyl con tres partes de agua destilada previamente temperada a +30°C hasta +35°C(**Ramónez 2013**).

Para completar la preparación del diluyente, el día de su utilización, se agregó una parte de yema de huevo fresca a la solución madre (Solución final= 1:3:1 Triladyl, agua destilada y yema de huevo). Esta última se entibió previamente en baño María para facilitar la homogeneización. La yema debía ser fresca, proveniente de un huevo de no más de 3 días. La cáscara de huevo se lavaba cuidadosamente, se limpiaba con alcohol, y se dejaba secar. Luego de que se separaba la clara, la yema se situaba sobre un papel filtro, cuidando de que no se rompa su membrana. El resto de clara se terminaba de separar haciendo rodar a la yema suavemente sobre el papel. Atravesando la membrana de esta última con una jeringa, se extrajo la yema desde el interior y se enrasó la cantidad necesaria. Una vez agregada la yema de huevo, la solución se homogenizaba varias veces y se mantenía a baño María a 36 °C (**Ramónez 2013**).

Inmediatamente tras su llegada al laboratorio, la muestra de semen era evaluado y pre diluido en una relación 1:1 y mantenido a baño María durante un tiempo máximo de 10 minutos, al momento de generar la dilución el diluyente debía tener la misma temperatura del eyaculado (+/- 1C°). Posteriormente a la evaluación del eyaculado se

realizaba la dilución final. (Cueto et al. 2016). El eyaculado alcanzaba la temperatura del laboratorio ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) a esta temperatura se realizaba el envasado de las pajuelas de 0.5 ml, las cuales tenían una concentración de 50×10^6 spz/dosis posteriormente el semen diluido se colocaba en rejillas y se lo equilibraba durante 2 a 3 horas a $+5^{\circ}\text{C}$ antes de ser criopreservado (Naim et al. 2009).

Crio preservación

Congelamiento lento

El semen al haber sido diluido y envasado en las pajuelas de 0.5 ml fueron colocadas en rampas de congelación durante 2 horas a $+5^{\circ}\text{C}$ previo a su crio preservación, la congelación de pajuelas se realizó en vapor de nitrógeno a una altura de 4cm sobre el nivel del nitrógeno líquido que se encontraba a una temperatura inicial de -120°C por un lapso de 10 minutos y a continuación se las conservó dentro de un termo de nitrógeno a -196°C (Cortez y Gallegos 2018)

Manipulación y almacenamiento del semen congelado

Las pajuelas se guardaron en porta pajuelas que fueron identificados en la parte superior, dentro de los canastillos del termo. Durante su almacenamiento, fue importante controlar el nivel de nitrógeno líquido, teniendo en cuenta que el mismo no debe permanecer por debajo de los 10 cm. Cuando se manipuló el semen dentro del termo, era importante no elevar los canastillos por encima de la boca del termo (Cueto et al. 2016).

Descongelamiento del semen

El descongelamiento de semen debía realizarse a una temperatura de 36°C . El descongelamiento del semen se realizó en pajuelas, las mismas que se sumergieron en un baño María a 36°C , moviéndolas con una pinza durante 15 segundos bajo el agua. Luego de su descongelamiento, la pajuela se sacaba del agua, posteriormente se

realizaba al secado y cortado del tapón del extremo con cámara de aire. El extremo libre se tapaba con un dedo antes de cortar el otro extremo y se destapaba al momento de vaciar el contenido de la pajuela en un tubo de hemólisis previamente colocado en baño termostático (Cueto et al. 2016).

Examinación del semen postdescongelamiento

La estimación de la calidad del semen descongelado fue de suma importancia. Debido a lo cual se evaluó 108 pajuelas.

Luego de su descongelamiento, se procedió a la examinación microscópica de una gota de semen en un portaobjeto templado (100 aumentos).

Posteriormente se realizó la evaluación de las pajuelas post-descongelado para determinar los cambios que se generaron en la calidad seminal(Cueto et al. 2016).

Motilidad masal

Se observó la motilidad masal al descongelamiento, repitiendo la observación 1 o 2 veces (Cueto et al. 2016).Después de 1-2 minutos con un objetivo 100X.

Se observó una gota de 5 a 10 ul de semen descongelado sobre un portaobjetos templado a 35 ° C. Con lo cual se pudo tener una idea de la calidad seminal por la velocidad con que se hacen y deshacen las ondas. La motilidad se estimó por el vigor del movimiento de las ondas en una escala subjetiva entre 0 muertos (sin movimientos), 1 muy pobre (muy pocos movimientos), 2 pobre (No aparecen ondas, pero se ven movimientos espermáticos) , 3 regular (Ondas de movimiento lento),4 buena (Ondas y remolinos vigorosos, pero no tan rápida) y 5 muy buena (Ondas densas de movimiento muy rápidas) (Moreno et al. 2012)

Motilidad individual progresiva

Se estimó a través de la velocidad de desplazamiento hacia delante de los espermatozoides vivos en una escala subjetiva entre 0 y 5(0, mínimo; 5, máximo)(Naim et al. 2009).

Subjetivamente se evaluó en una escala a partir de las siguientes apreciaciones:

- 0, los espermatozoides no se mueven.
- 1, los espermatozoides se mueven en el lugar, giran sobre sí mismos.
- 2, los espermatozoides se trasladan brevemente, pero “se quedan”.
- 2.5, los espermatozoides se trasladan, puedo seguir su trayectoria con la vista.
- 3, los espermatozoides se trasladan, es difícil seguir su trayectoria con la vista.
- 4, los espermatozoides se trasladan a mucha velocidad, prácticamente no puedo seguir su trayectoria con la vista, “los veo pasar”.
- 5, los espermatozoides se trasladan a tanta velocidad que no puedo seguir su trayectoria con la vista, “no los veo pasar”.

Para aceptar una buena calidad seminal, las pajuelas debían poseer (luego de 4 a 5 minutos de incubación a 36 °C en baño María):

- a) Motilidad masal al descongelamiento.
- b) Motilidad individual progresiva igual o superior a 2.5

Resistencia osmótica

Para evaluar la resistencia osmótica se utilizó una prueba de Integridad Celular utilizado por algunos centros de IA. Se utilizó la prueba (HOST: Hypoosmotic Swelling test) en la cual se coloca el contenido de una pajuela en una solución hiposmótica de fructosa y citrato de sodio (100 mosm/l). Se utilizó 2 µl de la solución hiposmótica para el contenido de pajuelas de 0.5 ml. Se incubaron en baño María a 37°-38° C durante 60 minutos. Luego se colocó una pequeña gota (6 µl) entre porta y cubreobjeto y se cuentan 200 espermatozoides a 400X. Los espermatozoides con colas enrolladas estaban vivos (reaccionados). Cuantas más colas enrolladas, mejor calidad de semen. Debía haber un 40 % de reaccionantes para determinar que el semen es fértil. La observación de los espermatozoides se realizó a las 0 h, 2 y 4h. Para realizar la preparación de la solución hiposmótica se mezcló 9 g de fructosa, 4.9 g de citrato trisódico y 1000 µl de agua bidestilada(**Bó 2016**).

Integridad del acrosoma

Para la valoración de la integridad acrosómica se colocó una gota de 2 a 4 mm de semen sobre un portaobjetos acompañado de una gota similar de glutaraldehído al 0.2% diluida en buffer fosfato salino. El glutaraldehído detuvo el movimiento de las células y previno el deterioro celular. El extendido se observó con un microscopio con

una microscopía de campo claro como lo menciona **(Carretero et al. 2015)** . Y se contabilizaron 100 células. El semen se evaluó nuevamente a las dos horas de incubación a 36C°. El defecto que podía manifestarse eran la ausencia del capuchón acrosómico o su pérdida en distintas proporciones. Este método es altamente repetible con un error de no más del 6%. Y por lo menos el 50% de las células debían mostrar acrosomas intactos, posteriormente a las 2 horas de incubación debía manifestar 35% de espermatozoides con acrosomas ilesos, al realizar este tipo de evaluación se usó una tinción de Eosina Nigrosina en la cual se observó a los espermatozoides considerados como vivos y con el acrosoma intacto con una coloración rosada en la parte de la membrana acrosomal y azul pálido en la base, mientras que los muertos presentaron una coloración azul oscuro**(Cabrera et al. 2011)**.

Cabe mencionar que la importancia del acrosoma radica en que esta estructura ha sido descrita como una vesícula grande situada en la parte apical de la cabeza del espermatozoide. Y que dentro de esta se encuentran enzimas hidrolíticas capaces de digerir la matriz extracelular del ovocito (zona pelúcida). Sin olvidar que estas enzimas se liberan mediante la exocitosis del acrosoma (reacción acrosómica)**(Martínez s/f)**.

Evaluación de la motilidad espermática luego del descongelado

La motilidad y la integridad del acrosoma son dos características muy afectadas en el proceso de la congelación y la descongelación. Por lo cual debían ser evaluadas tal y como se manifestó con anterioridad.

Morfología espermática %

La evaluación se realizó con una gota de semen más una gota de eosina-nigrosina sobre un portaobjetos templado a 36° C y se contaron al menos 100 células. Recordando que el mínimo aceptable es 70 % de los espermatozoides normales **(Al-Badry 2012)**.

Las anomalías morfológicas se han dividido en dos categorías de acuerdo con su origen. Las primarias se generan en el testículo durante la fase de espermatocitogénesis de la espermatogénesis y están asociadas a la estructura genética del individuo, por los que sus porcentajes no deben exceder 10% y se presentan de manera constante en la

vida de un individuo, abarcan las anomalías de la cabeza como macrocefálicos, microcefálicos, dos cabezas, cabezas piriformes y otras como doble cola, enrollamiento de la cola sobre la cabeza (**Ferreira y Pérez citados por Cortez y Gallegos 2018**). Las anomalías de tipo secundario se desarrollaron durante la fase de espermiogénesis de la espermatogénesis y ocurren principalmente en el epidídimo por diversas causas ambientales, incluyendo subnutrición, estacionalidad reproductiva y diversas enfermedades. El total de estas anomalías sumadas a las primeras no deben exceder de 25%, incluyendo colas dobladas como ganchos, cabezas y colas sueltas que en las epididimitis suelen aparecer en exceso, presencia distal de gota citoplasmática, entre otras (**Trejo 2001 citado por Cortez y Gallegos 2018**).

Según **Gómez y Migliorisi citados por Veloz (2017)** las malformaciones primarias por definición son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y las malformaciones secundarias son aquellas que se originan dentro del epidídimo.

Santos y Barragán (2013) mencionan que las anomalías primarias y secundarias se clasifican según el criterio que se explica en la (tabla 2):

| Anomalías | |
|--|---|
| Primarias | Secundarias |
| Forma de cabeza: piriforme, lanceolada, angosta o estrecha. | Espermatozoides con gota citoplasmática proximal. |
| Acrosoma: desprendido, rugoso, pequeño. | Espermatozoides con gota citoplasmática distal. |
| Tamaño de cabeza: microcefalia, macrocefalia. | Espermatozoide con cola enrollada. |
| Cabeza desprendida anormal. | Espermatozoide con acrosoma desprendido. |
| Doble cabeza. | Espermatozoide con cola quebrada. |
| Cuello paraxial | Cabezas sueltas normales |
| Defecto diadema | Acrosoma desprendido |
| Pieza intermedia anormal | Gota distal |
| | Células redondas |

Tabla 2: Anomalías primarias y secundarias

Para las fases en las cuales se determinó los cambios de la calidad espermática se evaluó (la resistencia osmótica a las 0, 2 y 4 horas, integridad del acrosoma a las 0 y 2 horas, morfología espermática, motilidad masal y motilidad individual progresiva de semen ovino a las 0 horas post-descongelación). Se estableció esta escala de tiempo para evaluar si, la calidad del semen es viable ya que investigaciones realizadas en semen congelado indican que estos lapsos de tiempo permiten observar los cambios en lo que se refiere a la calidad, como lo realizó **Al-Badry(2012)** el cual pudo observar la motilidad del esperma bovino, mediante la determinación del porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva a las 0, 2 y 4 h a 37 ° C después de la descongelación de las células espermáticas. **Memon et al. (1985)** menciona que estimó el porcentaje de motilidad de los espermatozoides y el porcentaje de acrosomas normales a las 0, 2, 4, 6 y 8 horas después de la descongelación de semen caprino en su investigación.

Concentración espermática

Para llevar a cabo esta prueba se realizó el método del conteo espermático por medio de la cámara de Neubauer como se mencionó con anterioridad.

CAPITULO III.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

Al comparar la concentración del eyaculado y la concentración de las pajuelas, antes de ser congeladas, registraron no tener diferencias (P= 0,4843 y P= 0,0307 respectivamente). En el arreglo factorial se evaluó la interacción de GnRH*Diluyentes en los cuales no se observaron diferencias (P= >0,9999) (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto del acetato de busrelina sobre la concentración en fresco de eyaculado y sobre la concentración de semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada/ADEVA.

| | G0D 1 | G0D 2 | G1D 1 | G1D 2 | G2D 1 | G2D 2 | SD | P- VALOR | GnRH*Diluye ntes P- VALOR |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|---------------------------------|
| CONC | | | | | | | | | |
| EYACULA DO (spz/log 10) | 9,92 | 9,92 | 9,73 | 9,73 | 9,88 | 9,88 | 0,0 9 | 0,484 3 | >0,9999 |
| CONC | | | | | | | | | |
| PAJUELAS (spz/log 10) | 8,73 | 8,73 | 8,67 | 8,67 | 9,12 | 9,12 | 0,1 3 | 0,030 7 | >0,9999 |

CONC: Concentración espermática; **G0D1:** Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed. **SD:** Desviación estándar. (P<0,05)

Tabla 4: Efecto del acetato de buserelina sobre la concentración, motilidad masal y motilidad individual progresiva del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada/Arreglo factorial.

| | G0D1 | G0D2 | G1D1 | G1D2 | G2D1 | G2D2 | SD | P- VALOR | GnRH*Diluyentes P valor |
|--------------------------------------|-----------|-----------|---------|-----------|------------------|-------------------|------|-------------|----------------------------|
| CONC | | | | | | | | | |
| spz/pajuela Triladyl/ Andromed | 8,92 | 8,85 | 9,12 | 9,22 | 9.15 | 9.12 | 0,12 | 0,2034 | 0,7494 |
| MMSL | 2.33 b | 2.00 b | 2.50 b | 2.17 b | 4,00 a | 3,00 ab | 0,28 | 0,0002 | 0,3886 |
| MIP | 2.33 c | 2.00 c | 2.67 bc | 2.50 c | 4,00 a | 3,67 ab | 0,25 | <0,0001 | 0,9272 |

CONC: Concentración espermática; **SPZ:** espermatozoides; **G0D1:** Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed

MMSL: motilidad masal, con un rango desde 0-5; 0: muertos (sin movimientos), 1: (muy pocos movimientos), 2: (No aparecen ondas, pero se ven movimientos espermáticos), 3:(Ondas de movimiento lento) ,4: (Ondas y remolinos vigorosos, pero no tan rápida), 5: (Ondas densas de movimiento muy rápidas).

MIP: motilidad individual progresiva; con una escala de 0-5; 0: los espermatozoides no se mueven;1:los espermatozoides se mueven en el lugar, giran sobre sí mismos;2: los espermatozoides se trasladan brevemente, 2.5:los espermatozoides se trasladan, se puede seguir su trayectoria; 3, es difícil seguir su trayectoria con la vista;4: los espermatozoides se trasladan a mucha velocidad, prácticamente no puedo seguir su trayectoria con la vista, 5: los espermatozoides se trasladan a tanta velocidad que no puedo seguir su trayectoria con la vista.

SD: Desviación estándar; **ab:** medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente (P<0,05).

En el ADEVA de concentración de las pajuelas de Triladyl y Andromed post descongelamiento no se encontró una diferencia entre los tratamientos: (P=0,2034). (Tabla 4). Al evaluar el análisis factorial no hubo diferencias entre el efecto de la GnRH, diluyentes y su interacción (P=0,0399, P=, >0,9999 y P=0,7494 respectivamente) (Tabla 5). En la comparación de la concentración entre semen fresco y post descongelado no hubo diferencias.

La motilidad masal a la hora 0 mostró diferencias (P= 0,0002) entre tratamientos, registrando la mayor motilidad en el G2D1 (4) y de G2D2 (3) frente a los demás tratamientos (Tabla 4); en el arreglo factorial hubo diferencias en el efecto de la GnRH (P=0,0001) obteniendo una mayor motilidad masal en los tratamientos con GnRH alternada (G2=3.50) (Tabla 5). El efecto de los diluyentes sobre la motilidad masal,

registro una diferencia (P=0,0195), del Triladyl (2,94) sobre AndroMed (2.39) (tabla 5). La motilidad individual progresiva a la hora 0 manifestó una diferencia significativa (P=<0,0001) en el tratamiento G2D1 (4) y en G2D2 (3,67) en comparación con los otros tratamientos; el arreglo factorial registro que, el efecto de la GnRH tuvo una diferencia (P=<0,0001) con una mayor motilidad individual progresiva en los tratamientos con GnRH alternada (G2=3.83). En cuanto al efecto de los diluyentes (P=0,1789) no se registraron diferencias (Tabla 5).

Tabla 5: Efecto del acetato de buserelina sobre la concentración, motilidad masal y motilidad individual progresiva del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada. /Arreglo factorial

| CONC spz/pajuela Triladyl/Andromed | | | SD | P- VALOR |
|------------------------------------|---|---------------|------|----------|
| GnRH | 0 | 8,88 | 0,08 | 0,0399 |
| | 1 | 9,17 | | |
| | 2 | 9,13 | | |
| Diluyentes | 1 | 9,06 | 0,07 | >0,9999 |
| | 2 | 9,06 | | |
| MMSL | | | SD | P- VALOR |
| GnRH | 0 | 2.17 b | 0,19 | 0,0001 |
| | 1 | 2.33 b | | |
| | 2 | 3.50 a | | |
| Diluyentes | 1 | 2,94 a | 0,16 | 0,0195 |
| | 2 | 2.39 b | | |
| MIP | | | SD | P- VALOR |
| GnRH | 0 | 2.17 b | 0.17 | <0,0001 |
| | 1 | 2.58 b | | |
| | 2 | 3.83 a | | |
| Diluyentes | 1 | 3.00 | 0.14 | 0,1789 |
| | 2 | 2.72 | | |

CONC: Concentración espermática; **SPZ:** espermatozoides; **G0D1:** Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed

MMSL: motilidad masal, con un rango desde 0-5; 0: (sin movimientos), 1: (muy pocos movimientos), 2: (No aparecen ondas), 3:(Ondas de movimiento lento),4: (Ondas y remolinos vigorosos), 5: (Ondas densas de movimiento muy rápidas).

MIP: motilidad individual progresivo; con una escala de 0-5; 0: los espermatozoides no se mueven;1:los espermatozoides se mueven en el lugar;2: los espermatozoides se trasladan brevemente, 2.5:los espermatozoides se trasladan, se puede seguir su trayectoria; 3, es difícil seguir su trayectoria con la vista;4: los espermatozoides se trasladan a mucha velocidad, prácticamente no puedo seguir su trayectoria con la vista, 5: los espermatozoides se trasladan a tanta velocidad que no puedo seguir su trayectoria con la vista.

SD: Desviación estándar; **ab:** medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente (P<0,05).

La morfología tuvo una diferencia ($P=<0,0001$) en la cual G0D1(26,33%) y GD2(27,33%) tuvieron el mayor rango de anomalías morfológicas en comparación con los otros tratamientos (Tabla 7).

En el arreglo factorial, la morfología registro una diferencia($P=<0,0001$) obteniendo el mayor rango de morfoanomalías en los tratamientos G0D1 y G0D2con un (26,83%). Sin llegar a registrar una diferencia entre los diluyentes. (Tabla 6)

Tabla 6: Efecto del acetato de buserelina sobre la morfología del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada/arreglo factorial.

| MRF (%) | G0D 1 | G0D2 | G1D1 | G1D2 | G2D1 | G2D2 | SD | P- VALO R |
|-------------------|-----------|------|----------------|------|------|------|------|-----------------|
| | G0 | | 26,83 a | | | | | |
| GnRH | G1 | | 17,58 a | | | | 1.40 | <0,000 1 |
| | G2 | | 13,33 b | | | | | |
| | D1 | | 19,17 a | | | | | |
| Diluyentes | D | | 19,33 a | | | | 1,15 | 0,9187 |
| | 2 | | | | | | | |

G0D1: Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed.

MRF: morfología; El mínimo aceptable es 70 % de los espermatozoides normales

Las anomalías primarias no deben exceder el 10% y el total de las anomalías secundarias sumadas a las primeras no debe exceder de 25%,

SD: Desviación estándar; **ab:** medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente ($P<0,05$).

Tabla 7: Efecto del acetato de buserelina sobre la morfología del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada/ADEVA

| | G0D1 | G0D2 | G1D1 | G1D2 | G2D1 | G2D2 | SD | P- VALO R | GnRH * Diluyen tes |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-----------|--------------------------|---------------------------------------|
| MRF | 26,33 | 27,33 | 17,33 | 17,83 | 13,83 | 12,83 | 1,9 | <0,0001 | <0,0001 |
| (%) | bc | c | a | ab | a | a | 8 | | |

G0D1: Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed.

MRF: morfología; El mínimo aceptable es 70 % de los espermatozoides normales

Las anomalías primarias no deben exceder el 10% y el total de las anomalías secundarias sumadas a las primeras no debe exceder de 25%,

SD: Desviación estándar; **ab:** medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente (P<0,05).

Se registró una mayor presencia de anomalías morfológicas en los tratamientos control (G0D1 y G0D2) en los cuales se obtuvo un 6.3% de cabeza desprendida, cola quebrada con 6.4% y 8.3%, con cola doblada en un 6.1% y 5.1% y cola enrollada en un 8.2% y 7.5% respectivamente. En cuanto a los tratamientos con GnRH continua, en G1D1 se manifestó anomalías como cola torcida 5.7% y cola enrollada con 7.1%, a la par de G1D2 con 8.3% de cola quebrada y 7.3% de cola enrollada. Sin haber diferencias significativas en los tratamientos con GnRH alternada. (Tabla 8)

Tabla 8: Efecto del acetato de buserelina sobre las morfoanomalías del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada.

| | Macro Cefalia | Micro Cefalia | Doble cabeza | Cabeza desprendida | Cola pequeña | Cola quebrada | Doble cola | Cola torcida | Cola doblada | Cola enrollada | TOTAL |
|--------------------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|------------------|---------------|-----------------|-----------------|-------------------|--------|
| G0D1 (spz en %) | 0 | 3,8 | 3,3 | 6,3 | 4,4 | 6,4 | 4 | 3 | 6,1 | 8,2 | 45,5 % |
| G0D2 (spz en 10%) | 0 | 1,9 | 5,3 | 4,9 | 0 | 8,3 | 0 | 1,9 | 5,1 | 7,5 | 34,9% |
| G1D1 (spz en 10%) | 0 | 2 | 0 | 4,4 | 2,5 | 4,3 | 2,2 | 5,7 | 4,2 | 7,1 | 32,4% |
| G1D2 (spz en 10%) | 0 | 3 | 0 | 5,1 | 2,5 | 8,3 | 2 | 4,8 | 4,3 | 7,3 | 37,3% |
| G2D1 (spz en 10%) | 0,3 | 1,9 | 3 | 3,5 | 1,9 | 2,9 | 2 | 2,4 | 2,6 | 2,9 | 23,4% |
| G2D2 (spz en 10%) | 0,1 | 1,3 | 3,4 | 2,8 | 2,3 | 2,7 | 1,5 | 3,1 | 2,8 | 2,8 | 22,8% |

Los valores se ponderaron en una escala sobre 100 % Anomalías primarias; Tamaño de cabeza: microcefalia, macrocefalia, cabeza desprendida, doble cabeza. Anomalías secundarias: Espermatozoide con cola enrollada; espermatozoide con cola doblada; espermatozoide con cola enrollada.

G0D1: Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed.

En el ADEVA la resistencia osmótica a las 0 horas presento una diferencia ($P < 0,0001$) solo el G2D1 con un (43,28%) tuvo una resistencia osmótica aceptable; a las 2 horas la resistencia osmótica con una diferencia ($P < 0,0001$) tuvo valores cercanos a los requeridos para una buena calidad seminal; en los tratamientos con GnRH alterado (G2D1= 36.10% y G2D2= 32.92%). Además a las 4 horas post-descongelación se evaluó la resistencia osmótica con una diferencia ($P < 0,0001$) obteniendo bajos valores en los tratamientos con GnRH alterado (G2D1= 27.83 % y G2D2= 24.33%) (Tabla 9).

En el arreglo factorial hubo una diferencia ($P=<0,0001$) en el cual solo los tratamientos con GnRH alternada a las 0 horas registro la mejor resistencia osmótica con un (41.73%) en comparación con los otros tratamientos, a las 2 y 4 horas los tratamientos registraron valores menores a un 40% (Tabla 10).

La mejor integridad del acrosoma se obtuvo en los tratamientos con GnRH alterado (>50%) a las 0 y 2 horas, además solo el G1D1 manifestó un valor mayor a un 35% en comparación con los otros tratamientos (Tabla 9).

Tabla 9: Efecto del acetato de buserelina sobre la integridad acrosomal y la resistencia osmótica del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada/ADEVA.

| | G0D1 | G0D2 | G1D1 | G1D2 | G2D1 | G2D2 | SD | P- VALOR |
|---|----------|---------|----------|---------|----------------|----------------|------|-------------------|
| HOST hora 0 (%) | 31,82 c | 30,38 c | 32,63 bc | 29,08 c | 43,28 a | 40,17 ab | 1,77 | <0,0001 |
| HOST hora 2 (%) | 24,08 bc | 21,40bc | 26,53 b | 19,95 c | 36,10 a | 32,92 a | 1,24 | <0,0001 |
| HOST hora 4 (%) | 15,00 b | 14,05 b | 15,75 b | 12,42 b | 27,83 a | 24,33 a | 1,22 | <0,0001 |
| Integridad del acrosoma HORA 0 % | -50% | -50% | -50% | -50% | 50% | 50% | - | |
| Integridad del acrosoma HORA 2 % | -35% | -35% | -35% | -35% | 35% | -35% | - | |

HOST: Resistencia Osmótica; >40 % representa una buena calidad de semen; < 40 % representa una mala calidad seminal.

Integridad de acrosoma: Al menos el 50% de las células deben presentar acrosomas intactos, y el 35% luego de las 2 horas de incubación

SD: Desviación estándar; **ab:** medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente ($P<0,05$).

G0D1: Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed.

Tabla 10: Efecto del acetato de buserelina sobre la resistencia osmótica del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada/arreglo factorial.

| | | HOST hora 0 (%) | | | | | | | |
|-------------------|----------|-----------------|------|----------------|------|------|------|------|-------------------|
| | | G0D1 | G0D2 | G1D1 | G1D2 | G2D1 | G2D2 | SD | P- VALOR |
| GnRH | 0 | | | 31.10 b | | | | 1,25 | <0,0001 |
| % | 1 | | | 30.86 b | | | | | |
| | 2 | | | 41.73 a | | | | | |
| Diluyentes | 0 | | | 35,91 | | | | 1.02 | 0,0717 |
| % | 1 | | | 33,21 | | | | | |
| | | HOST hora 2 (%) | | | | | | | |
| GnRH | 0 | | | 22.74 b | | | | 0.88 | <0,0001 |
| % | 1 | | | 23.24 b | | | | | |
| | 2 | | | 34.51 a | | | | | |
| Diluyentes | 1 | | | 28.91 a | | | | 0.72 | 0,0003 |
| % | 2 | | | 24.76 b | | | | | |
| | | HOST hora 4 (%) | | | | | | | |
| GnRH | 0 | | | 14.533 b | | | | 0.87 | <0,0001 |
| % | 1 | | | 14.08 b | | | | | |
| | 2 | | | 26.08 a | | | | | |
| Diluyentes | 1 | | | 19.53 a | | | | 0.71 | 0,0144 |
| % | 2 | | | 16.93 b | | | | | |

HOST: Resistencia Osmótica; >40 % representa una buena calidad de semen; < 40 % representa una mala calidad seminal.

SD: Desviación estándar; **ab:** medias con letras distintas entre columnas difieren significativamente (P<0,05).

G0D1: Semen ovino sin GnRH diluido con Triladyl; **G0D2:** Semen ovino sin GnRH diluido con Andromed; **G1D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Triladyl; **G1D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis continúa diluido con Andromed; **G2D1:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Triladyl; **G2D2:** Semen de carneros tratados GnRH a dosis alternada diluido con Andromed.

En la concentración del eyaculado y la concentración de semen post-descongelado no se reportaron diferencias, seguramente a que la aplicación de GnRH no genera un cambio a nivel de los receptores ER-BETA a nivel testicular para aumentar la concentración de espermatozoides ,con relación a la concentración del eyaculado, semejante a lo reportado por (Bustos 2020).La concentración de semen post

descongelado no tuvo diferencias significativas al ser comparado, debido a que los diluyentes, ni el proceso de congelación lento generaron cambios sobre esta característica seminal (Tabla 3).

Se presentaron más anomalías morfológicas en las muestras de semen post descongelado de los tratamientos control (G0D1 y G0D2) y en los tratamientos con GnRH continua (G1D1 y G1D2) (Tabla 8), lo cual seguramente está relacionado con el consumo de fitoestrógenos como el cumestrol en altas cantidades, llegando a actuar como antagonistas al unirse a los receptores ER beta. Produciéndose un acoplamiento del estrógeno al receptor, cambiando su transcripción genómica y disminuyendo la cantidad de hormona liberada por el hipotálamo. Provocando cambios reproductivos sobre los ER beta receptores que se encuentran a nivel testicular en el epidídimo, conductos deferentes, próstata, células de Sertoli, espermatogonias y espermatoцитos; al relacionar las morfoanomalías secundarias que se presentaron se podría asegurar que hubo un cambio en la espermatogénesis que tiene lugar en las células de Sertoli, específicamente en las fases acrosomal y de maduración, fases en las que se da el cambio de espermátides a espermatozoides y se forma el flagelo, respectivamente. **(Pérez y Valiente et al., citado por Bustos 2019)**

Los tratamientos con GnRH alternado (G2D1 y G2D2) registraron menos morfoanomalías secundarias (13,83%) y (12,83%) respectivamente en comparación con los otros tratamientos seguramente porque la aplicación de GnRH sintética actúa sobre las células de Sertoli, provocando un normal proceso de espermatogénesis disminuyendo el porcentaje de anomalías morfológicas. Estos datos tienen una semejanza a lo **Giriboni, J., Gökdal, Ö., et al. (2019)** refirió en su investigación al administrar de acetato de buserelina continuamente en carneros, los cuales registraron una disminución de la cantidad de cabezas sueltas, en las muestras seminales que el evaluó. Debido a que la GnRH actúa sobre las células de Sertoli, provocando la efectiva disminución de anomalías morfológicas. (Tabla 7)

La motilidad masal e individual mostraron diferencias debido a las morfoanomalías del espermatozoide que por razones explícitas impedían la capacidad de movilizarse.

Se obtuvo una mejor motilidad masal e individual en los tratamientos en los cuales se aplicó GnRH (tabla 5), seguramente porque los espermatozoides estaban mejor capacitados debido a que tuvieron un bajo porcentaje de anomalías morfológicas.

La motilidad masal mostró un efecto significativo del Triladyl sobre AndroMed (tabla 5), seguramente porque la adición de yema de huevo al dilutor tiene un efecto favorecedor sobre el porcentaje de motilidad al momento de realizar la congelación, ya que las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo actúan como crioprotectores, frente al shock térmico y conservan la viabilidad del espermatozoide (**Fiser y Fairfull citados por Cabrera; Próspero; Ayulo y Pantoja 2011**).

Herold et al citado por Ramón (2013) obtuvo resultados semejantes, ya que después de descongelar semen bovino, reconoció que la motilidad fue mayor al utilizar el diluyente Triladyl que con el diluyente AndroMed. Dichos resultados son semejantes a los que mencionados por **Cabrera; Próspero; Ayulo y Pantoja (2011a)** al usar Triladyl.

No hubo diferencias significativas en la motilidad individual progresiva entre tratamientos al congelar el semen con Triladyl y Andromed, seguramente por la proporción de ácido cítrico que contienen los dilutores, ya que este elemento ejerce una acción directa en la membrana espermática en la adherencia de calcio, que junto con los iones de sodio y potasio, mantienen el equilibrio osmótico favoreciendo de esta manera la motilidad de los espermatozoides **Borque et al citado por Cabrera; Próspero; Ayulo y Pantoja (2011b)**. Además, **Muiño (s/f)** menciona que la adición de ácido cítrico y glicerol a un diluyente con yema de huevo aumenta la motilidad. (Tabla 5)

Solo las pajuelas que se evaluaron a las 0 horas con el tratamiento de GnRH alternado mantuvieron un índice adecuado de HOST (43,28% y 40,17 %) debido a que se requiere de un mínimo de 40% para determinar una buena calidad seminal según lo describe (**Bó 2016**). Estas evaluaciones indicarían que el semen utilizado tuvo una adecuada integridad funcional de la membrana espermática con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. Lo cual genera la entrada de agua provocando en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Esta prueba HOST somete a los espermatozoides a un medio de presión hiposmótica más baja que la presión hiposmótica fisiológica, iniciando la entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (**Chirinos 2004 a**). (TABLA 9)

Al haber obtenido valores semejantes a los requeridos en cuanto a la integridad del acrosoma en los tratamientos con GnRH alternado (>50%) a las 0 horas y a las 2 horas postdescongelamiento un valor (> 35%) solo en el tratamiento G2D1 en comparación con los otros tratamientos se podría afirmar, debido al efecto protector de la yema de huevo ,por su fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDL), las cuales serían las responsables de la resistencia al choque térmico, a través de la prevención de la pérdida de los fosfolípidos de la membrana **Amirat y Cardoso et al., citados por Restrepo et al (2017)**. Además, se menciona que la yema de huevo junto a un dilutor Tris llega a reducir la pérdida de enzimas acrosomales y previene cambios degenerativos en el acrosoma durante el almacenamiento líquido del semen ovino **Córdova, et. Al citado por Valdez (2013)**. (TABLA 9)

Con referencia a los valores inferiores a 50% a la hora 0 y < 35% después de dos horas en los tratamientos control y en los tratamientos con GnRH continua se podría mencionar que los mismos se generaron debido a que durante el proceso de criopreservación se produce una depreciación del 50% de la viabilidad espermática, debido a que las células espermáticas manifestaron un daño en la membrana por lo cual no experimentarán cambios en la forma del flagelo, este daño pudo generarse por efecto de la temperatura y la presión osmótica, que generan cambios en la

permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular **Thomas et al citado por Próspero Cabrera y Pantoja A. (2002 c).**

El daño efectuado por la temperatura pudo haberse manifestado por el proceso de congelación lenta al cual se sometió a las pajuelas evaluadas, debido a que a través de este proceso se pudo haber formado cristales de hielo dentro de las células germinales seguramente debido a que la dilución seminal alcanzó temperaturas entre -5 y -10°C llegando a formar núcleos de hielo, que se distribuyeron en el medio extracelular **(Monzón 2005a).**

A bajas temperaturas suele presentarse la cristalización en el medio extracelular dando lugar a la formación de hielo puro, generándose una crioconcentración, es decir: los solutos progresivamente se concentran en la fracción líquida, la cual se hace hipertónica y en respuesta a la diferencia de gradientes de concentración, la célula se deshidrata. Además, se produce la máxima concentración de solutos llegando a solidificarse junto con la fracción no congelada. Al producirse la cristalización, hay una liberación de energía en forma de calor latente de solidificación, el cual elevó transitoriamente la temperatura de las muestras seminales evaluadas.

La lesión celular crioinducida de células espermáticas evaluadas, con valores inferiores a los estandarizados pudieron manifestarse también por la acción combinada de factores físicos como: el estrés osmótico y la presión que sufren las células en sus membranas por la expansión del hielo, la cual produce una deformación celular que a bajas temperaturas resulta letal. Las membranas celulares son las estructuras que soportan un mayor daño en la criopreservación, por la pérdida de fluidez de sus componentes lipídicos. Además de que a temperaturas entre 10 y 16°C se genera la transición de lípidos fluidos a sólidos lo cual altera todas las funciones de la membrana, confiriéndole un alto grado de fragilidad **(Monzón 2005b).**

Además, **Próspero; Cabrera y Pantoja (2002d)** menciona que a temperaturas menores a 37 °C, el flujo de iones, moléculas y proteínas a través de la membrana espermática disminuye. (TABLA 9)

Los tratamientos con una integridad acrosómica menor a los valores indispensables, seguramente tuvieron lugar por un hinchamiento y disrupción de la membrana acrosomal, cambios en la fluidez, alteración del flujo de calcio y cambios en la actividad enzimática que pudieron inducir una capacitación espermática anticipada, estas alteraciones tienden a presentarse en el proceso de refrigeración, congelación y descongelamiento **Peña y Linde-Forsberg citado por Próspero Cabrera y Pantoja (2002e)**.

Es debido a esto que la velocidad de congelamiento es un factor importante en la criopreservación. Porque cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente produciéndose una inadecuada deshidratación y el agua que se encuentra dentro de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula. Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema llegando a un colapso celular, produciéndose la desnaturalización de macromoléculas y una disminución del tamaño celular hasta el colapso irreversible de la membrana plasmática. Por lo tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exhibición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y debe ser lo suficientemente lenta para que ocurra la deshidratación celular. Ya que gracias a esto la supervivencia celular será más elevada a una velocidad de congelamiento adecuada (**Boiso 2001**).

La velocidad de congelamiento es un factor que se debe tomar muy en cuenta debido a que las velocidades de enfriamiento más altas son necesarias para la congelación exitosa de espermatozoides de carnero, y el control cuidadoso de la velocidad de enfriamiento es esencial para la recuperación máxima de células viables y funcionales(**Kumar et al. 2003**).

Se puede mencionar que las pajuelas post descongeladas de los tratamientos G2D1 y G2D2 tuvieron la mejor calidad seminal debido a que manifestaron una MMSL de 4 y 3, MIP 4 y 3,67 (TABLA 4), MRF 13.83 % y 12.83 (TABLA 7), HOST a las 0 horas de 43,28% y 40,17% e integridad acrosómica 50% a la hora 0 y 35% a las 2 horas(TABLA 9),determinando que la correlación de estas pruebas permiten pronosticar una buena capacidad fecundante del semen (**Hafez; Zaneveld y Jeyendran; Van den Saffele et al., citados por Chirinos 2004 b**).

3.1 Verificación de hipótesis

Según los resultados obtenidos en este proyecto investigativo se acepta la hipótesis alternativa ya que el acetato de buseralina aplicada de manera alternada influyó eficientemente sobre la calidad del semen al presentar una integridad funcional de la membrana espermática, relacionando a esta variable con su capacidad fecundante, en conjunto con un menor índice de morfoanomalías primarias y secundarias que provocaron un efecto positivo en la motilidad del semen criopreservado y diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- ❖ Se evaluó los efectos de acetato de buseralina (12 ug) a dosis continua y alternada sobre la calidad espermática de semen ovino post-descongelado a través de un espermatograma, obteniendo que la dosis alternada de GnRH alcanzó mejores resultados como se evidencio al disminuir el índice de morfoanomalías primarias y secundarias , al aplicar el análogo unos 30 minutos antes de la extracción seminal durante 7 días continuos (G2D1-G2D2) ,además consecuentemente se generó un adecuado rango de motilidad masal como

individual. Aunque no se registraron diferencias significativas en cuanto a la concentración espermática.

- ❖ Se determinó los cambios en la calidad de semen criopreservado en función del tiempo de post-descongelación, registrando que a las 0 horas se mantenía una buena calidad seminal en los tratamientos con acetato de buserelina alternada, mientras que en los otros tratamientos no se obtuvo una buena calidad seminal debido a que se obtuvieron resultados menores a un 40% en la prueba HOST, por otro lado se determinó que a las 2 y 4 horas los valores obtenidos fueron <40 % determinando que este semen carecía de una buena calidad seminal, según los parámetros establecidos para semen criopreservado .

- ❖ Se evaluó la eficacia protectora de Triladyl y Andromed en la criopreservación de semen ovino a través de un espermograma, en el cual el Triladyl tuvo una diferencia significativa en la motilidad masal, mas no en la motilidad individual progresiva, concentración espermática ni en la morfología, por lo cual los dos dilutores no difieren significativamente en la criopreservación.

4.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda la aplicación de acetato de buserelina a dosis de 12µg/carnero IM 30 minutos previos al proceso de extracción seminal, junto con la elaboración de pajuelas seminales de 0.5 ml con Triladyl para criopreservación, debido a que mejora la calidad seminal de carneros criollos alimentados con *Medicago sativa* contaminada al 70% del hongo *Pseudopeziza medicaginis*.

C.MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

A, C-SAl-SJj-GFd-RMv-C. 2016. Alimentos funcionales, alfalfa y fitoestrógenos (en línea). Revista Mutis 6(1):28. DOI: <https://doi.org/10.21789/22561498.1110>.

Al-Badry, KI. 2012. Effect of various thawing times and temperatures on frozen semen quality of Friesian bulls in Iraq. International Journal of Animal and Veterinary Advances 4(6):384–388. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/332465334_Effect_of_Various_Thawing_Times_and_Temperatures_on_Frozen_semen_Quality_of_Friesian_Bulls_in_Iraq

Asociación Nacional de Criadores de Ovejas del Ecuador. 2019. La Ovejería del Ecuador (en línea, sitio web). Consultado 8 jun. 2019. Disponible en <http://www.geocities.ws/ancoec/ovejeria.html>.

Bó,G.2016. Aplicaciones Prácticas de los Programas de IATF.

Boiso, I. 2001. Ponencia Principios básicos de Criobiología (en línea). Revista Iberoamericana de Fertilidad 18(4):4–6. Disponible en http://www.revistafertilidad.org/RecursosWEB/fertilidad/Fert_Jul_Ag01-Ponen3.pdf.

Bustos, B. 2020. Efecto de la aplicación de gnrh sintética sobre la calidad seminal y características reproductivas de carneros alimentados con alfalfa contaminada con *pseudopeziza medicaginis* (en línea). s.l., s.e. 37 p. Disponible en <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/handle/123456789/5301/Mg.DCEv.Ed.1859.pdf?sequence=3>.

Cabrera, P; Ayulo, A; Pantoja, C. 2011. Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. Redalyc 22(2):105–113.

Cajilema, D. 2017. Evaluación de la condición corporal y el rendimiento a la canal de los ovinos faenados en el camal municipal de la ciudad de Riobamba (en línea)Tesis. Ing.Producción Animal,Riobamba,Ecuador. Consultado 6 jun. 2019. Disponible en <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7210/1/27T0369.pdf>.

Carretero, MI; Fumuso, FG; Miragaya, M; Giuliano, SM. 2015. Evaluación del estado

acrosomal en espermatozoides de llama. *Spermova* 5(2):258–263. DOI: <https://doi.org/10.18548/aspe/0002.46>.

Chirinos, J. 2004. Características seminales e integridad de la membrana espermática post refrigeración en carneros blackbelly y assaf del banco nacional de semen.(en línea).Tesis.Ing.Zootecnista,Huancayo,Perú,UNCP.Disponible en : <http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/2934/Orellana%20Chirinos.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Choez, K. (2010). Criopreservación de semen en camélidos sudamericanos (en línea). Lima, s.e. Disponible en <https://www.yumpu.com/es/document/read/13191886/criopreservacion-de-semen-en-camelidos-sudamericanos>.

Cortez, C; Gallegos,J.2018.Biotecnologías reproductivas, moleculares y génicas en ovinos - 1a edición. Guadalajara Colegio de Postgraduados.285 p

Cueto, M; Gibbons, A; Macarena, M; Galarraga, B; Fernández, J. 2016. Manual de procesamiento y conservación del semen ovino.(en línea).22p.Disponible en https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf

Fila, D; Carabetta, S; Gomez, S; Ungerfeld, R. 1985. El contenido de fluido testicular en carneros aumenta tras la administración de GnRH. :1984.

Foulkes, J.A., 1977. The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and the integrity of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 49, 277-284.

Flores Virginio, Vásquez R. , Orihuela Agustín, 2003. Entrenamiento de carneros para recolección de semen mediante vagina artificial, utilizando como estímulo objetos inanimados. (en línea)México. 36, 105-111.Disponible en: https://www.academia.edu/30336036/Entrenamiento_de_carneros_para_recolecci%C3%B3n_de_semen_mediante_vagina_artificial_utilizando_como_est%C3%ADmulo_objetos_inanimados

Gabriel A. Bó. 2016. Aplicaciones Prácticas de los Programas de IATF. 54(0).

Galarza, A. 2013. “Eficacia de dos diluyentes: tris + lecitina de soya(andromed®) y tris + yema de huevo (triladyl ®), en la crioconservación de semen de toro de la raza Jersey en Cuenca – Ecuador(en línea).Tesis Mg. Reproducción Animal.Cuenca,Ecuador, UCuenca.Consultado 20 jun.2019.Disponible en :

Giriboni, J; Gökdal, Ö; Eren, V; Yaralı, E; Santiago-Moreno, J; Ungerfeld, R. 2019. Daily administration of a GnRH analogue enhances sperm quality in bucks during the non-breeding season (en línea). *Animal Reproduction Science* 200:43–50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.11.009>.

González Jiménez, E; Cañadas de la Fuente, GA; Fernández Castillo, R; Álvarez Ferre, J; González Antón, C. 2016. Fitoesgrógenos y sus efectos sobre la Osteoporosis en la Mujer Posmenopáusica. *Revista Clínica de Medicina de Familia* 3(3):201–205. DOI: <https://doi.org/10.4321/S1699-695X2010000300008>.

Kumar, S; Millar, JD; Watson, PF. 2003. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines (en línea). *Cryobiology* 46(3):246–253. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00040-3).

López de Armentia, F. 2019. Hallazgo de *Campylobacter fetus* en semen ovino congelado (en línea). Tesis.M.V,Tandil.Argentina.UNCPBA. Disponible en <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/2867073#.XPlDbRx8hwk.mendeley>.

Martínez, M. (s/f). Estudio de la actividad aminopeptidásica en espermatozoides astenozoospermicos. Comparación clínica. s.l., s.e.

Medina-Robles, V. M.; Sanchez-Carvajal, E.; Velasco-Santamaria, Y.M.; Cruz-Casallas, PE. 2007. Crioconservación de semen bovino usando un congelador programable (CL-8800) y determinación de su calidad postdescongelación por medio un sistema de análisis espermático asistido por computador (CASA) (en línea). *Orinoquia* 11(1):75–86. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89611108>.

Memon, MA; Bretzlaff, KN; Ott, RS. 1985. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. (en línea). *American*

journal of veterinary research 46(2):473–5. Consultado 13 jun. 2019. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3888011>.

Minitube s/f .Triladyl®, 250 g(en línea, sitio web). Consultado 20 ene. 2020. Disponible en <https://www.minitube.de/produkte/kleine-wiederkaeuer/samenverduenner/triladyl-250-g>.

Minitube. 2014. AndroMed®, 200 ml (en línea, sitio web). Consultado 11 jun. 2019. Disponible en <https://www.minitube.es/es/Productos/Bovino/Diluyentes-de-Semen/AndroMed-R-200-ml>.

Monzón, RSS. 2005. Criopreservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes (en línea). Tesis.M.V.Lima,Perú.UNMSM.Disponible en http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/674/Sandoval_mr.pdf?sequence=1.

Moreno, P; Veterinario, M; Universitaria, F; De Castellanos, J; Mendoza, G; Médico, DF; Zootecnista, V; González, P&. 2012. Correlación entre diámetro testicular y calidad espermática en ovinos criollos del municipio de Soracá, Boyacá. Conexión Agropecuaria JDC 2(2):45–55.

Morgan, W. C., & Parbery, D. G. 1977. Ascospore liberation, germination and attachment to host surface by *Pseudopeziza medicaginis*. Australian

Journal of Agricultural Research, 28(5), 777-784. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/248895602_Ascospore_liberation_germination_and_attachment_to_host_surface_by_Pseudopeziza_medicaginis

Muiño,R. s/f. Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen bovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas (en línea). s.l., Universidade de Santiago de Compostela . 157 p. Consultado 17 oct. 2017. Disponible en https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2406/9788497509886_content.pdf;jsessionid=50E2EB9511A51746D75688A43081C735?sequence=1.

Naim, P; Cueto, M; Gibbons, A. 2009. Inseminación Artificial a Tiempo Fijo Con Semen Ovino Refrigerado Timed Artificial Insemination With Ram Chilled Semen (en línea). Arch. Zootec 58(223):24–31. Disponible en <http://scielo.isciii.es/pdf/azoo/v58n223/art12.pdf>.

Novillo, M. 2016. Efecto de alfalfa contaminada con *Pseudopeziza medicaginis* sobre la calidad del semen de carneros criollos (en línea). Tesis M.V.Z. Cevallos, Ecuador, UTA. Consultado 6 jun. 2019. Disponible en [http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23778/1/Tesis 59 Medicina Veterinaria y Zootecnia -CD 419.pdf](http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/23778/1/Tesis%2059%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20419.pdf).

Pérez-rivero, J; Aguilar-setién, Á; Martínez-maya, J. 2007. Phytoestrogens consumption and their effects in different organs and systems of domestic animals. 67(3):325–331.

Próspero Cabrera, V; Pantoja A., C. 2012. Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales (en línea). 23(2):192–200. Consultado 9 ene. 2020. Disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172012000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

Ramónez, JC. 2013. Evaluación de dos agentes crioprotectores no permeables y un diluyente comercial (triladyl) en la congelación de semen bovino. (en línea) Tesis. Mg. Reproducción Animal, Cuenca, Ecuador. UCuenca. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/4535>

Restrepo, GB; Andrés Madrid, CR; Prieto, LR; Esteban Duque, JC; Usuga, AS. 2017. Congelación de semen epididimal canino con yema de huevo centrifugada. (en línea). Rev Inv Vet Perú 28(4):876–885. DOI: <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i4.13886>.

Santos, A; Barragán, A. 2013. Recolección y manipulación seminal in vitro. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México. 53(9):1689–1699 p. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Tapia, L. 2014. Valoración seminal en ovinos de raza corriedale y mestizos en la parroquia Cochapamba del cantón Saquisilí (en línea). s.l., s.e. Consultado 6 jun. 2019. Disponible en <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/4182/1/UTC-TC->

000871.pdf.

Valdez, D. 2013. Efecto del dodecil sulfato ionico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado.(en línea)Tesis Mg.Reproducción animal,Cuenca,Ecuador.UCUENCA.Disponible en : <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/500>

Valiente, C. 2008. Uso DE análogos DE gnRH En El control DE la REpRoDUcción inDEsEaDa canina gnRH analogs in tHE contRol of tHE UnDEsiRable canine REpRoDUction. Ciencias Veterinarias 28(2):45–51.

Veloz, DMV. (2017). “Evaluación de la calidad espermática de reproductores bovinos mediante el uso de sistemas de evaluación seminal convencional y sistema CASA (análisis seminal asistido por computadora) y su respuesta con la fertilidad por inseminación artificial” Tesis.Mg.Reproducción animal.Cuenca,Ecuador.UCUENCA.Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28466>

Anexos

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

MOTILIDAD MASAL

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| motilidad masal | 36 | 0,54 | 0,47 | 25,31 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 16,33 | 5 | 3,27 | 7,17 | 0,0002 |
| tratamientos | 16,33 | 5 | 3,27 | 7,17 | 0,0002 |
| Error | 13,67 | 30 | 0,46 | | |
| Total | 30,00 | 35 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,18525

Error: 0,4556 gl: 30

| <u>tratamientos</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> | | |
|---------------------|---------------|----------|-------------|---|---|
| G2D1 | 4,00 | 6 | 0,28 | A | |
| G2D2 | 3,00 | 6 | 0,28 | A | B |
| G1D1 | 2,50 | 6 | 0,28 | | B |
| G0D1 | 2,33 | 6 | 0,28 | | B |
| G1D2 | 2,17 | 6 | 0,28 | | B |
| G0D2 | 2,00 | 6 | 0,28 | | B |

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

MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R²</u> | <u>Aj</u> | <u>CV</u> |
|----------------------|----------|----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| motilidad individual | 36 | 0,63 | 0,57 | 21,16 | |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 18,81 | 5 | 3,76 | 10,26 | <0,0001 |
| tratamientos | 18,81 | 5 | 3,76 | 10,26 | <0,0001 |
| Error | 11,00 | 30 | 0,37 | | |
| Total | 29,81 | 35 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,06335

Error: 0,3667 gl: 30

| <u>tratamientos</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> | | |
|---------------------|---------------|----------|-------------|---|-----|
| G2D1 | 4,00 | 6 | 0,25 | A | |
| G2D2 | 3,67 | 6 | 0,25 | A | B |
| G1D1 | 2,67 | 6 | 0,25 | | B C |
| G1D2 | 2,50 | 6 | 0,25 | | C |
| G0D1 | 2,33 | 6 | 0,25 | | C |
| G0D2 | 2,00 | 6 | 0,25 | | C |

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

RESISTENCIA OSMÓTICA HORA 0

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R²</u> | <u>Aj</u> | <u>CV</u> |
|------------------------------|----------|----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| resistencia osmótica hora .. | 36 | 0,64 | 0,58 | 12,55 | |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 997,25 | 5 | 199,45 | 10,60 | <0,0001 |
| tratamientos | 997,25 | 5 | 199,45 | 10,60 | <0,0001 |
| Error | 564,74 | 30 | 18,82 | | |
| Total | 1561,99 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,61911

Error: 18,8247 gl: 30

| <u>tratamientos</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> | | |
|---------------------|---------------|----------|-------------|---|-----|
| G2D1 | 43,28 | 6 | 1,77 | A | |
| G2D2 | 40,17 | 6 | 1,77 | A | B |
| G1D1 | 32,63 | 6 | 1,77 | | B C |
| G0D1 | 31,82 | 6 | 1,77 | | C |
| G0D2 | 30,38 | 6 | 1,77 | | C |
| G1D2 | 29,08 | 6 | 1,77 | | C |

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

RESISTENCIA OSMÓTICA HORA 2

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R²</u> | <u>Aj</u> | <u>CV</u> |
|------------------------------|----------|----------------------|----------------------|-----------|-----------|
| resistencia osmótica hora .. | 36 | 0,82 | 0,79 | 11,34 | |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1244,59 | 5 | 248,92 | 26,88 | <0,0001 |
| tratamientos | 1244,59 | 5 | 248,92 | 26,88 | <0,0001 |
| Error | 277,79 | 30 | 9,26 | | |
| Total | 1522,38 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,34361

Error: 9,2595 gl: 30

| tratamientos | Medias | n | E.E. | | |
|--------------|--------|---|------|---|---|
| G2D1 | 36,10 | 6 | 1,24 | A | |
| G2D2 | 32,92 | 6 | 1,24 | A | |
| G1D1 | 26,53 | 6 | 1,24 | B | |
| G0D1 | 24,08 | 6 | 1,24 | B | C |
| G0D2 | 21,40 | 6 | 1,24 | B | C |
| G1D2 | 19,95 | 6 | 1,24 | | C |

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

RESISTENCIA OSMÓTICA HORA 4

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| resistencia osmótica hora .. | 36 | 0,81 | 0,78 | 16,44 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|---------|----|--------|-------|---------|
| Modelo | 1183,95 | 5 | 236,79 | 26,36 | <0,0001 |
| tratamientos | 1183,95 | 5 | 236,79 | 26,36 | <0,0001 |
| Error | 269,45 | 30 | 8,98 | | |
| Total | 1453,40 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,26278

Error: 8,9815 gl: 30

| tratamientos | Medias | n | E.E. | | |
|--------------|--------|---|------|---|--|
| G2D1 | 27,83 | 6 | 1,22 | A | |
| G2D2 | 24,33 | 6 | 1,22 | A | |
| G1D1 | 15,75 | 6 | 1,22 | B | |
| G0D1 | 15,00 | 6 | 1,22 | B | |
| G0D2 | 14,05 | 6 | 1,22 | B | |
| G1D2 | 12,42 | 6 | 1,22 | B | |

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

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

MORFOLOGÍA

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------|----|----------------|-------------------|-------|
| morfología | 36 | 0,62 | 0,56 | 25,25 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo | 1150,25 | 5 | 230,05 | 9,74 | <0,0001 |
| tratamientos | 1150,25 | 5 | 230,05 | 9,74 | <0,0001 |
| Error | 708,50 | 30 | 23,62 | | |
| Total | 1858,75 | 35 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,53395

Error: 23,6167 gl: 30

| tratamientos | Medias | n | E.E. | | |
|--------------|--------|---|------|---|---|
| G2D2 | 12,83 | 6 | 1,98 | A | |
| G2D1 | 13,83 | 6 | 1,98 | A | |
| G1D1 | 17,33 | 6 | 1,98 | A | |
| G1D2 | 17,83 | 6 | 1,98 | A | B |
| G0D1 | 26,33 | 6 | 1,98 | B | C |
| G0D2 | 27,33 | 6 | 1,98 | | C |

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

ANALISIS FACTORIAL

MOTILIDAD MASAL

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| motilidad masal | 36 | 0,54 | 0,47 | 25,31 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 16,33 | 5 | 3,27 | 7,17 | 0,0002 |
| GnRH | 12,67 | 2 | 6,33 | 13,90 | 0,0001 |
| Diluyentes | 2,78 | 1 | 2,78 | 6,10 | 0,0195 |
| GnRH*Diluyentes | 0,89 | 2 | 0,44 | 0,98 | 0,3886 |
| Error | 13,67 | 30 | 0,46 | | |
| Total | 30,00 | 35 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,67930

Error: 0,4556 gl: 30

GnRH Medias n E.E.

G2 3,50 12 0,19 A

G1 2,33 12 0,19 B

GO 2,17 12 0,19 B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,45948

Error: 0,4556 gl: 30

Diluyentes Medias n E.E.

D1 2,94 18 0,16 A

D2 2,39 18 0,16 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,18525

Error: 0,4556 gl: 30

| GnRH | Diluyentes | Medias | n | E.E. | |
|------|------------|--------|---|------|-----|
| G2 | D1 | 4,00 | 6 | 0,28 | A |
| G2 | D2 | 3,00 | 6 | 0,28 | A B |
| G1 | D1 | 2,50 | 6 | 0,28 | B |
| GO | D1 | 2,33 | 6 | 0,28 | B |
| G1 | D2 | 2,17 | 6 | 0,28 | B |
| GO | D2 | 2,00 | 6 | 0,28 | B |

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

MOTILIDAD INDIVIDUAL PROGRESIVA

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| motilidad individual | 36 | 0,63 | 0,57 | 21,16 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-----------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo | 18,81 | 5 | 3,76 | 10,26 | <0,0001 |
| GnRH | 18,06 | 2 | 9,03 | 24,62 | <0,0001 |
| Diluyentes | 0,69 | 1 | 0,69 | 1,89 | 0,1789 |
| GnRH*Diluyentes | 0,06 | 2 | 0,03 | 0,08 | 0,9272 |
| Error | 11,00 | 30 | 0,37 | | |
| Total | 29,81 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,60943

Error: 0,3667 gl: 30

| GnRH | Medias | n | E.E. | |
|------|--------|----|------|---|
| G2 | 3,83 | 12 | 0,17 | A |
| G1 | 2,58 | 12 | 0,17 | B |

GO 2,17 12 0,17 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,41222

Error: 0,3667 gl: 30

Diluyentes Medias n E.E.

D1 3,00 18 0,14 A

D2 2,72 18 0,14 A

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,06335

Error: 0,3667 gl: 30

GnRH Diluyentes Medias n E.E.

G2 D1 4,00 6 0,25 A

G2 D2 3,67 6 0,25 A B

G1 D1 2,67 6 0,25 B C

G1 D2 2,50 6 0,25 C

GO D1 2,33 6 0,25 C

GO D2 2,00 6 0,25 C

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

RESISTENCIA OSMÓTICA HORA 0

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| resistencia osmótica hora .. | 36 | 0,64 | 0,58 | 12,55 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|------|----|----|----|---|---------|
|------|----|----|----|---|---------|

| | | | | | |
|-----------------|---------|----|--------|-------|---------|
| Modelo | 997,25 | 5 | 199,45 | 10,60 | <0,0001 |
| GnRH | 924,13 | 2 | 462,07 | 24,55 | <0,0001 |
| Diluyentes | 65,61 | 1 | 65,61 | 3,49 | 0,0717 |
| GnRH*Diluyentes | 7,50 | 2 | 3,75 | 0,20 | 0,8204 |
| Error | 564,74 | 30 | 18,82 | | |
| Total | 1561,99 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=4,36669

Error: 18,8247 gl: 30

GnRH Medias n E.E.

| | | | | |
|----|-------|----|------|---|
| G2 | 41,73 | 12 | 1,25 | A |
| GO | 31,10 | 12 | 1,25 | B |
| G1 | 30,86 | 12 | 1,25 | B |

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,95363

Error: 18,8247 gl: 30

Diluyentes Medias n E.E.

| | | | | |
|----|-------|----|------|---|
| D1 | 35,91 | 18 | 1,02 | A |
| D2 | 33,21 | 18 | 1,02 | A |

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=7,61911

Error: 18,8247 gl: 30

GnRH Diluyentes Medias n E.E.

| | | | | | |
|----|----|-------|---|------|-----|
| G2 | D1 | 43,28 | 6 | 1,77 | A |
| G2 | D2 | 40,17 | 6 | 1,77 | A B |
| G1 | D1 | 32,63 | 6 | 1,77 | B C |
| GO | D1 | 31,82 | 6 | 1,77 | C |

| | | | | | |
|----|----|-------|---|------|---|
| GO | D2 | 30,38 | 6 | 1,77 | C |
| G1 | D2 | 29,08 | 6 | 1,77 | C |

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

RESISTENCIA OSMÓTICA HORA 2

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| resistencia osmótica hora .. | 36 | 0,82 | 0,79 | 11,34 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-----------------|---------|----|--------|-------|---------|
| Modelo | 1244,59 | 5 | 248,92 | 26,88 | <0,0001 |
| GnRH | 1062,57 | 2 | 531,28 | 57,38 | <0,0001 |
| Diluyentes | 155,00 | 1 | 155,00 | 16,74 | 0,0003 |
| GnRH*Diluyentes | 27,02 | 2 | 13,51 | 1,46 | 0,2485 |
| Error | 277,79 | 30 | 9,26 | | |
| Total | 1522,38 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,06255

Error: 9,2595 gl: 30

GnRH Medias n E.E.

| | | | | |
|----|-------|----|------|---|
| G2 | 34,51 | 12 | 0,88 | A |
| G1 | 23,24 | 12 | 0,88 | B |
| GO | 22,74 | 12 | 0,88 | B |

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,07151

Error: 9,2595 gl: 30

Diluyentes Medias n E.E.

| | | | | |
|----|-------|----|------|---|
| D1 | 28,91 | 18 | 0,72 | A |
|----|-------|----|------|---|

D2 24,76 18 0,72 B

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,34361

Error: 9,2595 gl: 30

| GnRH | Diluyentes | Medias | n | E.E. | | |
|------|------------|--------|---|------|---|---|
| G2 | D1 | 36,10 | 6 | 1,24 | A | |
| G2 | D2 | 32,92 | 6 | 1,24 | A | |
| G1 | D1 | 26,53 | 6 | 1,24 | B | |
| GO | D1 | 24,08 | 6 | 1,24 | B | C |
| GO | D2 | 21,40 | 6 | 1,24 | B | C |
| G1 | D2 | 19,95 | 6 | 1,24 | | C |

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

RESISTENCIA OSMÓTICA HORA 4

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| resistencia osmótica hora .. | 36 | 0,81 | 0,78 | 16,44 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-----------------|---------|----|--------|-------|---------|
| Modelo | 1183,95 | 5 | 236,79 | 26,36 | <0,0001 |
| GnRH | 1111,16 | 2 | 555,58 | 61,86 | <0,0001 |
| Diluyentes | 60,58 | 1 | 60,58 | 6,75 | 0,0144 |
| GnRH*Diluyentes | 12,21 | 2 | 6,11 | 0,68 | 0,5144 |
| Error | 269,45 | 30 | 8,98 | | |
| Total | 1453,40 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,01622

Error: 8,9815 gl: 30

GnRH Medias n E.E.

| | | | | |
|----|-------|----|------|---|
| G2 | 26,08 | 12 | 0,87 | A |
| GO | 14,53 | 12 | 0,87 | B |
| G1 | 14,08 | 12 | 0,87 | B |

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,04017

Error: 8,9815 gl: 30

Diluyentes Medias n E.E.

| | | | | |
|----|-------|----|------|---|
| D1 | 19,53 | 18 | 0,71 | A |
| D2 | 16,93 | 18 | 0,71 | B |

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

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=5,26278

Error: 8,9815 gl: 30

GnRH Diluyentes Medias n E.E.

| | | | | | |
|----|----|-------|---|------|---|
| G2 | D1 | 27,83 | 6 | 1,22 | A |
| G2 | D2 | 24,33 | 6 | 1,22 | A |
| G1 | D1 | 15,75 | 6 | 1,22 | B |
| GO | D1 | 15,00 | 6 | 1,22 | B |
| GO | D2 | 14,05 | 6 | 1,22 | B |
| G1 | D2 | 12,42 | 6 | 1,22 | B |

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

MORFOLOGIA

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|-----------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| morfología | 36 | 0,62 | 0,56 | 25,25 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1150,25 | 5 | 230,05 | 9,74 | <0,0001 |
| GnRH | 1143,50 | 2 | 571,75 | 24,21 | <0,0001 |
| Diluyentes | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,01 | 0,9187 |
| GnRH*Diluyentes | 6,50 | 2 | 3,25 | 0,14 | 0,8720 |
| Error | 708,50 | 30 | 23,62 | | |
| Total | 1858,75 | 35 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=4,89101

Error: 23,6167 gl: 30

GnRH Medias n E.E.

G2 13,33 12 1,40 A

G1 17,58 12 1,40 A

GO 26,83 12 1,40 B

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=3,30828

Error: 23,6167 gl: 30

Diluyentes Medias n E.E.

D1 19,17 18 1,15 A

D2 19,33 18 1,15 A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,53395

Error: 23,6167 gl: 30

| GnRH | Diluyentes | Medias | n | E.E. | | |
|------|------------|--------|---|------|---|---|
| G2 | D2 | 12,83 | 6 | 1,98 | A | |
| G2 | D1 | 13,83 | 6 | 1,98 | A | |
| G1 | D1 | 17,33 | 6 | 1,98 | A | |
| G1 | D2 | 17,83 | 6 | 1,98 | A | B |
| GO | D1 | 26,33 | 6 | 1,98 | B | C |
| GO | D2 | 27,33 | 6 | 1,98 | | C |

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

CONCENTRACIÓN POR PAJUELA Y POR EYACULADO

Análisis de la varianza

concentración seminal por pajuela

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|------|
| concentración seminal por .. | 36 | 0,32 | 0,21 | 3,55 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------|------|----|------|------|---------|
| Modelo | 1,42 | 5 | 0,28 | 2,88 | 0,0307 |

| | | | | | |
|--------------|------|----|------|------|--------|
| tratamientos | 1,42 | 5 | 0,28 | 2,88 | 0,0307 |
| Error | 2,95 | 30 | 0,10 | | |
| Total | 4,37 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55067

Error: 0,0983 gl: 30

| tratamientos | Medias | n | E.E. | |
|--------------|--------|---|------|---|
| G2D1 | 9,12 | 6 | 0,13 | A |
| G2D2 | 9,12 | 6 | 0,13 | A |
| G0D2 | 8,73 | 6 | 0,13 | A |
| G0D1 | 8,73 | 6 | 0,13 | A |
| G1D2 | 8,67 | 6 | 0,13 | A |
| G1D1 | 8,67 | 6 | 0,13 | A |

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

Concentración por eyaculado

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Concentración por eyaculad.. | 36 | 0,13 | 0,00 | 2,27 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo | 0,23 | 5 | 0,05 | 0,92 | 0,4843 |
| tratamientos | 0,23 | 5 | 0,05 | 0,92 | 0,4843 |
| Error | 1,50 | 30 | 0,05 | | |
| Total | 1,73 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,39267

Error: 0,0500 gl: 30

| tratamientos | Medias | n | E.E. | |
|--------------|--------|---|------|---|
| G0D2 | 9,92 | 6 | 0,09 | A |

| | | | | |
|------|------|---|------|---|
| G0D1 | 9,92 | 6 | 0,09 | A |
| G2D1 | 9,88 | 6 | 0,09 | A |
| G2D2 | 9,88 | 6 | 0,09 | A |
| G1D2 | 9,73 | 6 | 0,09 | A |
| G1D1 | 9,73 | 6 | 0,09 | A |

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

Nueva tabla : 9/1/2020 - 21:35:56 - [Versión : 20/9/2019]

ANÁLISIS FACTORIAL

concentración/pajuela fresco

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|------|
| concentración/pajuela fres.. | 36 | 0,32 | 0,21 | 3,55 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-----------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo | 1,42 | 5 | 0,28 | 2,88 | 0,0307 |
| GnRH | 1,42 | 2 | 0,71 | 7,20 | 0,0028 |
| Diluyentes | 0,00 | 1 | 0,00 | 0,00 | >0,9999 |
| GnRH*Diluyentes | 0,00 | 2 | 0,00 | 0,00 | >0,9999 |
| Error | 2,95 | 30 | 0,10 | | |
| Total | 4,37 | 35 | | | |

concentración/pajuela postdescongelamiento

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|------|
| concentración/pajuela post.. | 36 | 0,21 | 0,07 | 3,12 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-----------------|-------------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0,62 | 5 | 0,12 | 1,55 | 0,2034 |
| GnRH | 0,58 | 2 | 0,29 | 3,59 | 0,0399 |
| Diluyentes | 0,00 | 1 | 0,00 | 0,00 | >0,9999 |
| GnRH*Diluyentes | 0,05 | 2 | 0,02 | 0,29 | 0,7494 |
| Error | 2,40 | 30 | 0,08 | | |
| <u>Total</u> | <u>3,03</u> | <u>35</u> | | | |

Nueva tabla : 9/1/2020 - 21:38:13 - [Versión : 20/9/2019]

ANÁLISIS DE LA VARIANZA

concentración/pajuela fresco

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|------------------------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| concentración/pajuela fres.. | 36 | 0,32 | 0,21 | 3,55 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|--------------|-------------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 1,42 | 5 | 0,28 | 2,88 | 0,0307 |
| tratamientos | 1,42 | 5 | 0,28 | 2,88 | 0,0307 |
| Error | 2,95 | 30 | 0,10 | | |
| <u>Total</u> | <u>4,37</u> | <u>35</u> | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55067

Error: 0,0983 gl: 30

| <u>tratamientos</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> |
|---------------------|---------------|----------|-------------|
| G1D2 | 8,67 | 6 | 0,13 A |
| G1D1 | 8,67 | 6 | 0,13 A |
| G0D1 | 8,73 | 6 | 0,13 A |
| G0D2 | 8,73 | 6 | 0,13 A |

G2D2 9,12 6 0,13 A

G2D1 9,12 6 0,13 A

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

concentración/pajuela postdescongelación

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|------------------------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| concentración/pajuela post.. | 36 | 0,21 | 0,07 | 3,12 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|--------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0,62 | 5 | 0,12 | 1,55 | 0,2034 |
| tratamientos | 0,62 | 5 | 0,12 | 1,55 | |
| Error | 2,40 | 30 | 0,08 | | |
| Total | 3,03 | 35 | | | |

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,49704

Error: 0,0801 gl: 30

| <u>tratamientos</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> |
|---------------------|---------------|----------|-------------|
| G0D2 | 8,85 | 6 | 0,12 A |
| G0D1 | 8,92 | 6 | 0,12 A |
| G2D2 | 9,12 | 6 | 0,12 A |
| G1D1 | 9,12 | 6 | 0,12 A |
| G2D1 | 9,15 | 6 | 0,12 A |
| G1D2 | 9,22 | 6 | 0,12 A |

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

ANÁLISIS FACTORIAL

concentración/pajuela postdescongelación

| <u>Variable</u> | <u>N</u> | <u>R²</u> | <u>R² Aj</u> | <u>CV</u> |
|------------------------------|----------|----------------------|-------------------------|-----------|
| concentración/pajuela post.. | 36 | 0,21 | 0,07 | 3,12 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo | 0,62 | 5 | 0,12 | 1,55 | 0,2034 |
| GnRH | 0,58 | 2 | 0,29 | 3,59 | 0,0399 |
| Diluyentes | 0,00 | 1 | 0,00 | 0,00 | >0,9999 |
| GnRH*Diluyentes | 0,05 | 2 | 0,02 | 0,29 | 0,7494 |
| Error | 2,40 | 30 | 0,08 | | |
| Total | 3,03 | 35 | | | |

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,28486

Error: 0,0801 gl: 30

GnRH Medias n E.E.

GO 8,88 12 0,08 A

G2 9,13 12 0,08 A

G1 9,17 12 0,08 A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19268

Error: 0,0801 gl: 30

Diluyentes Medias n E.E.

D1 9,06 18 0,07 A

D2 9,06 18 0,07 A

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

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,49704

Error: 0,0801 gl: 30

| <u>GnRH</u> | <u>Diluyentes</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> | |
|-------------|-------------------|---------------|----------|-------------|---|
| GO | D2 | 8,85 | 6 | 0,12 | A |
| GO | D1 | 8,92 | 6 | 0,12 | A |
| G1 | D1 | 9,12 | 6 | 0,12 | A |
| G2 | D2 | 9,12 | 6 | 0,12 | A |
| G2 | D1 | 9,15 | 6 | 0,12 | A |
| G1 | D2 | 9,22 | 6 | 0,12 | A |

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

KARDEX PARA EL CONGELAMIENTO SEMINAL

| Durante el congelamiento | | | | | | | Post descongelamiento | | | |
|--------------------------|----------|-------------|-------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|-----------|-----|--------------|
| A | B | C | D | E | F | G | H | Mot Masal | MIP | Conc. Esperm |
| Identif. carnero | vol eyac | Conc esperm | SPZ totales | N DOSIS E/50 base | Vol.total F*0,5 | Vol diluy (G – C) | Vol A/Vol B: | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

(Cueto et al. 2016)

A. Identif carnero: Identificación del animal

B. Vol eyac: Volumen del eyaculado en ml

C. Conc esperm: Concentración espermática en millones/ml

D. Spz totales: Número total de espermatozoides en el eyaculado (C x D)

E. N dosis: Número de dosis a obtener del eyaculado (Espz totales/Número de espermatozoides por dosis= E / 50)

F. Vol total: Número de dosis a obtener del eyaculado x Volumen de la dosis (F x 0.25)

G. Vol diluy: Volumen total – Volumen de eyaculado (G – C)

H. Vol A/Vol B: Volumen de diluyente A y Volumen de diluyente B (H / 2)

Mot. Masal: Motilidad masal del semen post descongelamiento (Escala subjetiva: Tiene motilidad masal-No tiene motilidad masal)

MIP: Motilidad individual progresiva post descongelamiento (Escala subjetiva: máximo, 5; mínimo, 0)

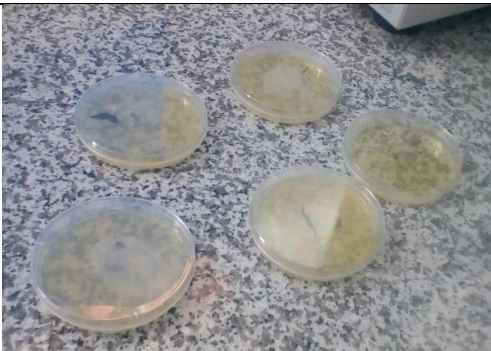
Conc esperm: Concentración espermática por dosis post descongelamiento.



Pesaje de Agar papa + dextrosa para preparar los medios de cultivo del hongo *Pseudopeziza medicaginis*



Colocación de agares en cajas Petri para una posterior contaminación con el hongo *Pseudopeziza medicaginis*.



Medios de cultivo con hojas de *Medicago sativa* contaminada con el hongo *Pseudopeziza medicaginis*



Cultivo contaminado con *Pseudopeziza medicaginis*



***Pseudopeziza medicaginis* observado con el microscopio**



Colocación del hongo en botellas



Fumigación del alfalfar



Corte del alfalfar



**Alfalfa contaminada con
*Pseudopeziza medicaginis***



Secado de los forrajes



Obtención de harinas forrajeras



Realización del balanceado



Vaginas artificiales



Extracción seminal



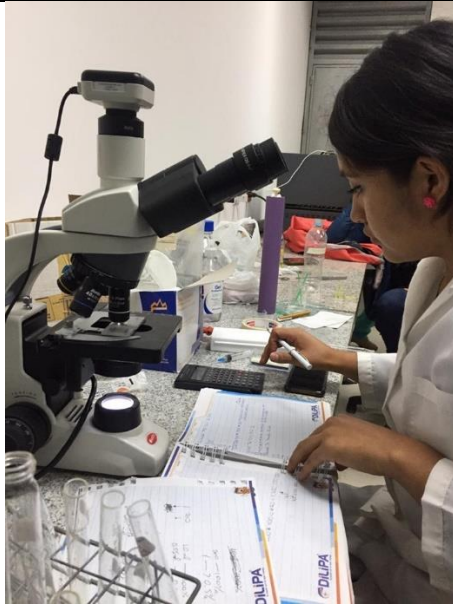
**Evaluación de concentración seminal
de las muestras seminales**



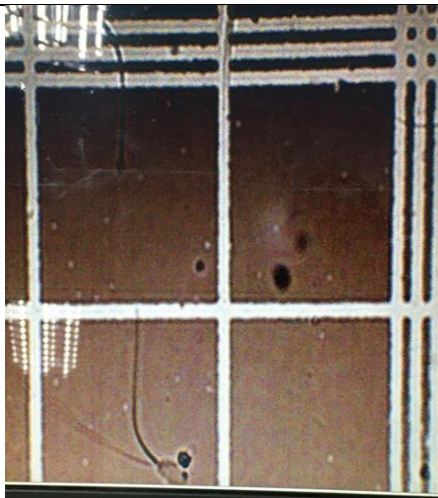
Elaboración de pajuelas seminales



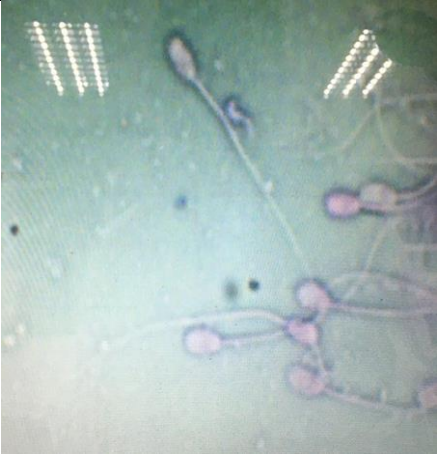

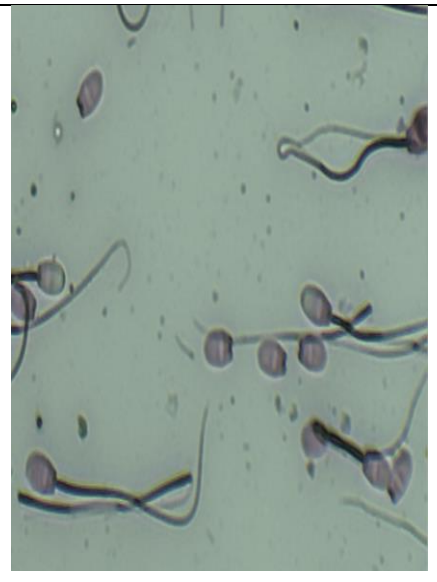
Extracción de pajuelas del tanque de nitrógeno



Evaluación de pajuelas post descongelamiento



Observación de espermatozoides en cámara de Neubauer

| | |
|---|--|
|  | <p>Observación de integridad del acrosoma</p> |
|  | <p>Motilidad masal</p> |
|  | <p>Anomalías morfológicas</p> |