

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE  
PRODUCCION ANIMAL**



**“DILUCION Y CONGELACION DE SEMEN DE MACHO  
CABRIO CON EL USO DE DOS DILUTORES TRIS Y  
TRILADYL”**

**Presentado por:**

**ANA MARIA CECILIA NOEL ROJAS**

**TRABAJO MONOGRAFICO PARA OPTAR POR EL TITULO  
DE INGENIERO ZOOTECNISTA.**

**Lima – Perú**

**2017**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
LA MOLINA**

**FACULTAD DE ZOOTECNIA**

**DEPARTAMENTO ACADEMICO DE PRODUCCION ANIMAL**

**“DILUCION Y CONGELACION DE SEMEN DE MACHO CABRIO  
CON EL USO DE DOS DILUTORES TRIS Y TRILADYL”**

**Presentado por:**

**ANA MARIA CECILIA NOEL ROJAS**

**TRABAJO MONOGRAFICO PARA OPTAR POR EL TITULO DE  
INGENIERO ZOOTECNISTA**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

.....

**Dr. German Rodríguez Franco**  
**Presidente**

.....

**Ing. Amalia Gallegos Cárdenas**  
**Miembro**

.....

**Ing. Gustavo Gutiérrez Reynoso**  
**Miembro**

.....

**Ing. Prospero Cabrera Villanueva**  
**Patrocinador**

## **DEDICATORIA**

**En primer lugar a DIOS, porque sin EL nada es posible.**

**A mis hijos Diego y Fátima, mis más grandes tesoros y mi mayor motivación.**

**A mis padres y hermanos los amo familia. A Ethel mi gran amiga hermana, quien me apoyo y confió siempre en mí. A mis amigas Gladys y Wendy que están siempre a mi lado. A mi patrocinador y profesores por su gran apoyo.**

**“PORQUE NUNCA ES TARDE Y EL TIEMPO SOLO SE ACABA CUANDO SE  
ACABA LA VIDA Y HASTA ESE MOMENTO, SIEMPRE EXISTE UNA  
POSIBILIDAD PARA TODO”...**

## INDICE

- Introducción.....pág. 01
- Objetivos.....pág. 02
- Revisión Literaria
- Inseminación Artificial.....pág. 03
- Conservación prolongada del semen.....pág. 05
- Preparación de los machos.....pág. 06
- Colección de semen.....pág. 07
- Manejo y valoración de semen.....pág. 08
- Control de la cantidad y calidad del semen.....pág. 09
- Volumen y concentración del eyaculado.....pág. 10
- Motilidad masal.....pág. 12
- Motilidad individual.....pág. 15
- Crio preservación del semen.....pág. 15
- Protocolo de crio preservación de semen OVINO-CAPRINO.....pág. 16
- Dilutores (Tris y Triladyl).....pág. 18
- Desarrollo del tema:
- Materiales y métodos.....pág. 22
- Metodología de investigación.....pág. 23
- Análisis Estadístico.....pág. 25
- Discusiones - Resultados.....pág. 27
- Conclusiones.....pág. 28
- Recomendaciones.....pág. 29
- Revisión Bibliográfica.....pág. 30
- Anexos.....pág.32 - 45.

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en instalaciones del Laboratorio de Animales Menores de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina, con el apoyo de la ONG PROCABRA (Ing. Oscar Arroyo Barreto).

Se emplearon para este trabajo cuatro machos cabríos, dos de raza Saanen uno cruce de Saanen con Alpino y uno Murciano Granadino con Anglonubian y Criollo, con edades entre los 2 y 8 años para la colecta de semen y evaluación de respuesta a dos dilutores TRIS y TRILADYL.

El análisis seminal macroscópico y microscópico incluye una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática como son: concentración espermática y volumen en semen fresco; motilidad, % de vivos y muertos y endosmosis en semen refrigerado y finalmente motilidad, % de vivos y muertos y endosmosis en semen congelado. La colección del semen se realizó con vagina artificial dos veces por semana durante 10 semanas, obteniéndose en total 80 eyaculados. La vagina artificial estuvo a una temperatura interna de 38 - 40°C; el tubo colector graduado en mililitros y estéril a 32 - 34°C para evitar el shock por frío de los espermatozoides; luego de recolectado el semen se procedió a la evaluación de características seminales: volumen, densidad, color, pH, concentración espermática y motilidad masal, para luego hacer el pre diluido del semen con dilutores TRIS y TRILADYL (según sea el caso), mantenidas en baño maría a 34°C. El color, densidad y volumen seminales se evaluaron visualmente, el pH se evalúa con el papel tornasol, la concentración espermática se determinó con la lectura de la cámara de Neubauer, preparada previamente. La motilidad masal del semen obtenido se estimará en base al vigor de la onda de movimiento y la evaluación de la motilidad progresiva se dará con una gota de semen en una lámina porta objeto, limpia y mantenida a 37°C en platina caliente, puesta al microscopio. El porcentaje de vivos y muertos con la prueba de eosina – nigrosina y por último se aplicó el Test de Host (Hipo osmótico) para evaluar la funcionalidad de membrana plasmática.

En base a los datos obtenidos se pudo determinar con que dilutor se tiene los mejores resultados de las evaluaciones macroscópicas y microscópicas de la evaluación seminal, tanto en semen refrigerado como en semen congelado.

## INTRODUCCION

La inseminación artificial (IA) es una de las biotecnologías de mayor relevancia que se viene desarrollando desde hace varios años y que permite un rápido avance genético, con el mejor aprovechamiento de los sementales de características productivas sobresalientes; el éxito de los programas de inseminación artificial se basa en el buen funcionamiento de los diversos procesos que intervienen en la misma; en el caso del ganado caprino el éxito de la IA dependerá en gran medida del uso de diluyentes satisfactorios para el semen, el cual incrementa el volumen de un eyaculado, protege a los espermatozoides durante el enfriamiento y prolonga su vida con un mínimo efecto sobre la fertilidad; algunos de estos procesos están totalmente estandarizados mientras que otros siguen siendo objeto de investigación.( D. Tapia<sup>1</sup>, G. Dueñas<sup>2</sup>, A. Gallegos<sup>1</sup>, J. Sarria<sup>1</sup>, E. Mellisho<sup>1</sup>)

La IA en caprinos es limitada en comparación con otras especies, debido entre otros factores a la dificultad para congelar y descongelar el semen, ya que algunos diluyentes pueden resultar tóxicos para los espermatozoides, acompañado de otros factores en nuestro país como son los terrenos marginales y agrestes en los que se encuentran los caprinos, la costumbre nómada de su crianza que recorre grandes distancias para conseguir su alimento que generalmente está constituido de rastrojos de sembríos de pan llevar en la costa peruana.

En el Perú la crianza de cabras está relacionada a los pobladores de sectores marginales que tienen pobres recursos económicos y subsisten con su escasa producción de leche y carne. Esta actividad se desarrolla mayormente en base a sistemas extensivos, donde los hatos están conformados generalmente por criollos y cruces con las razas Saneen, Anglo Nubian y Murciano-Granadina. El uso de técnicas reproductivas modernas ha sido bastante limitada, por lo que realizar investigaciones aplicadas en reproducción de cabras, permitiría a los criadores individuales y asociaciones utilizar herramientas modernas para lograr un rápido avance genético en esta especie.

## OBJETIVOS:

### GENERAL:

Evaluar el efecto de los dilutores TRIS Y TRILADYL, en la conservación de características seminales del macho cabrío y poder determinar cuál sería el de óptimo uso en un posterior manejo a otro nivel.

### ESPECIFICO:

Evaluar el efecto de los dilutores TRIS Y TRILADYL al momento de la congelación en:

- Motilidad.
- Porcentaje de vivos y muertos.
- Integridad de membrana citoplasmática del espermatozoide.

## REVISION LITERARIA:

### LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La inseminación artificial (IA) es la práctica de manejo más valiosa para el productor de ganado. En el procedimiento se hace uso eficaz de la generosa dotación de espermatozoides disponibles de un macho, de manera que se incrementa considerablemente el progreso genético y se mejora en muchas ocasiones la eficiencia de la reproducción (Bearden y Fuquay, 1982; Foote, 2002).

La eficiencia de la reproducción usando inseminación artificial por lo menos es tan buena como el apareamiento natural cuando no hay enfermedades. Cuando aparecen éstas, especialmente venéreas, la inseminación artificial representa un importante factor de control (Bearden y Fuquay, 1982; Foote, 2002).

El desarrollo de la vagina artificial para grandes especies puede muy bien ser el desarrollo más importante en la historia de la inseminación artificial

Los investigadores y muchos criadores reconocieron a finales de los años 30 que la inseminación artificial representa un tremendo apoyo para el progreso genético. Una limitación era que el semen tenía que ser utilizado para que diera buenos resultados. Cuando Phillips y Lardy de la Universidad de Wisconsin descubrieron un medio nutritivo amortiguador para diluir el eyaculado, se dio el primer paso para corregir el problema (Bearden y Fuquay, 1982; Foote, 2002).

### VENTAJAS DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

#### Mejora genética

Los ganaderos, por lo general, están muy interesados en el mejorar las producciones de sus rebaños y para ello seleccionan los animales de calidad superior. Como un macho produce más crías que una hembra se hace especial hincapié en la selección de aquellos (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; Hafez y Hafez, 2000; Foote, 2002).

La utilización de sementales superiores puede tener un beneficio directo sobre la producción de la progenie resultante y esto puede que sea todo lo que el ganadero precise. También existe un efecto a más largo plazo sobre la producción de las generaciones futuras si esos programas se continúan. Naturalmente, los progresos genéticos se aceleran al utilizar sementales más superiores siempre y cuando se evite el que aparezcan problemas de consanguinidad (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; Hafez y Hafez, 2000; Foote, 2002).

Con el uso de la inseminación artificial se puede incrementar el número de crías por semental al año. Utilizando un sistema de cruce convencional, en un rebaño normal puede cubrir de 50 a 100 hembras por año. Cuando se utiliza semen fresco diluido, con inseminación intracervical, un semental ovino o caprino puede ser utilizado para inseminar más de 1000 hembras en un periodo de 2-3 semanas (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000; Foote, 2002).

Depositando intrauterinamente semen conservado mediante congelación se pueden inseminar bastantes hembras con el semen recogido de un solo semental, en un año. Aunque se tenga en cuenta la baja de fertilidad que se observa, en ocasiones, utilizando inseminación artificial, el número de crías por semental supera con creces al que se obtiene mediante la monta natural (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000; Foote, 2002).

Otro uso de la inseminación artificial es el cruzar nuevas estirpes o genotipos de animales. Un ejemplo de esto es el uso de sementales de Angora en rebaños de cabras salvajes. Esto se obtiene por cruce de cada generación de hembras con sementales de pura raza Angora. La utilización de sementales destacados tiene un campo de aplicación más amplio con la inseminación artificial porque permite un uso más amplio de sementales selectos con el propósito a los requisitos del mercado (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000; Foote, 2002).

## Fácil transporte de material genético

A menudo, los criadores desean introducir sangre nueva en sus rebaños y el transportar el semen es mucho más barato que transportar a los sementales y, de esta forma, se evita también el riesgo de extender posibles enfermedades.

La inseminación artificial ha posibilitado la importación de nuevos genes, procedentes de otros continentes, a países que no permiten la entrada de animales vivos.

En suma, la inseminación artificial ha hecho posible el intercambio internacional de semen. La utilización de semen congelado ha facilitado, también la operación de producción cooperativa y el uso de esquemas de sementales de referencia por cuanto los mejores sementales, de esta forma, pueden mantenerse en los centros de reproducción desde los cuales se envía el semen a los dueños de los rebaños. . (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; Hafez y Hafez, 2000).

## CONSERVACIÓN PROLONGADA DE SEMEN

El semen procedente de sementales valiosos se puede conservar para utilizarlo en años venideros, incluso después de muerto el semental. Algunos ganaderos conservan el semen de sus mejores sementales para prevenir el trastorno que ocasionaría una muerte temprana de los mismos. Los bancos de semen se pueden utilizar también para conservar semen control en los programas de selección a largo plazo. En este caso, el semen se conserva para uso futuro. Con lo que los animales producidos después de varios años de selección se pueden comprar con los animales básicos como monitores de los progresos genéticos (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Chemineau *et al.*, 1991; Hafez y Hafez, 2000).

## AUMENTO DE EFICACIA REPRODUCTORA

Los machos sub fértiles pueden identificarse con facilidad y eliminarlos del grupo de sementales. La inseminación artificial puede asegurar el que se inseminen todas las hembras, evitándose así problemas relacionados con las preferencias macho-hembra que a menudo se manifiestan en algunos estros de hembras. Si se utilizan inseminaciones

secuenciales, las hembras podrán cubrirse así cuando no presenten comportamiento estral (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

## PREVENCIÓN Y CONTROL DE ENFERMEDADES

La inseminación artificial elimina el contacto directo macho-hembra con lo que se controla el propagar enfermedades venéreas u otras enfermedades. Es conveniente advertir que la inseminación artificial es una medida profiláctica, pero no curativa, de la enfermedad (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990; Hafez y Hafez, 2000).

## PREPARACIÓN DE LOS MACHOS

Los machos pueden mostrar esterilidad transitoria como consecuencia de condiciones estresantes, como altas temperaturas o humedad, cambio de ambiente o de dieta, molestias por las moscas, enfermedades y otros factores. Por ello, se recomiendan tratamientos adecuados, unas 6-8 semanas antes del comienzo de los programas de inseminación. Adviértase que muchos de los manejos rutinarios que reciben los machos pueden causar estrés como, por ejemplo, el recortar las pezuñas, administrar purgantes, esquila y baños.

Se ha demostrado que las raciones con alto contenido en proteína pueden incrementar la producción de espermatozoides y al no ser que se trate de machos en óptimas condiciones, se aconseja mejorar las raciones unas 6-8 semanas antes de comenzar la colección del semen. Los suplementos nutritivos se suelen administrar en el campo, aunque si se les administra en los cobijos puede que se familiaricen con otros ambientes, buenos desde el punto de vista de la adaptación para recoger el semen (Salamón, 1990).

Por ello, se aconseja planear los programas de inseminación coincidiendo con la estación reproductora natural. Si se precisa utilizar semen fuera de estación es posible conservarlo congelado hasta su uso. Se han realizado varios intentos de manipular la estación reproductora de los machos utilizando luz artificial. Estos métodos han obtenido algunos éxitos, pero en la práctica son impredecibles y no se logra mantener un alto nivel de calidad del semen, a lo largo del año (Bon Durant, 1979; De Alba, 1985; Salamón, 1990; Haibel, 1990).

## ENTRENAMIENTO DE LOS MACHOS PARA LA RECOGIDA DE SEMEN

### COLECCIÓN DEL SEMEN

#### Colección de semen por vagina artificial

La vagina artificial es una imitación de la vagina de la hembra, que proporciona el estímulo térmico y mecánico para la erección del pene del macho y que son, igualmente, necesarios para producir la eyaculación. La vagina artificial utilizada para caprinos es similar a la usada para toros. Consiste de una caperuza externa (de 20 x 5,5 cm. para el carnero y 15 x 5,5 cm. para el macho cabrío) fabricada con goma fuerte, plástico u otro material sintético que tenga propiedades aislantes, y un conducto interno fabricado de goma o material sintético apropiado. El tamaño de la vagina artificial está en relación con la longitud del pene, el del macho cabrío es más corto. El conducto interno suele tener unos 2-3 cm. más que la caperuza externa con el fin de poderse plegar sobre ésta, sujetándolo con sendas bandas de goma, para formar una especie de depósito para el agua. La vagina deberá estar limpia, seca y estéril, de ser posible debe utilizarse una vagina por cada carnero para las recogidas de semen. Después de cada uso se debe lavar, enjuagar con agua destilada y secarla profundamente; si se pasa por el interior de la funda lineal y el cono una delgada película de alcohol al 70% en agua destilada, se secará luego, mejor. A continuación se llena la mitad del depósito donde va el agua a 48-50°C, a través del tapón colocado en el lateral y con la ayuda de un embudo o jeringa de 100 ml (el calor del agua contribuirá a evaporar el alcohol). Si se llena demasiado de agua, se saldrá, cuando se deje la vagina en posición vertical. Evitar, en todo momento, que el agua penetre en el tubo interno ya que puede ser la causa de mortalidad de los espermatozoides (Salamons, 1990; Arthur *et al.*, 1991; Chemineau *et al.*, 1991; Wallance, 1992; Cambell *et al.*, 1996) uno de los extremos del conducto interno se debe lubricar ligeramente con vaselina, en una extensión de no más de 3 cm. utilizando una varilla de plástico o de vidrio. En el otro extremo se debe colocar el tubo de colección estéril y graduado en cc, para recoger el semen, insertándolo 1,5-2,0 cm. Mientras se coloca el tubo se debe insuflar aire, por el extremo abierto, y luego se cierra, todo ello con el fin de que el tubo quede perfectamente acoplado.

La insuflación debe ser de tal magnitud que ejerza presión pero que permita una fácil penetración del pene. La presión óptima para algunos machos solo puede conocerse a través de la experiencia (Salamóns, 1990).

La temperatura de la vagina artificial, inmediatamente antes de recoger el semen, deberá ser de 38-40°C, lo que se puede controlar mediante la inserción de un termómetro limpio. Si la vagina se encuentra demasiado fría, se debe rellenar con agua más caliente, que la que se utilizó con anterioridad. Con el fin de evitar el shock por frío, de los espermatozoides, los tubos de recogida se deben calentar a 30-34 °C. En los climas fríos, donde sea difícil mantener la temperatura de la vagina a 38-40°C, puede calentarse, durante un corto tiempo, en una estufa de cultivo a 37 ° C antes de añadir el agua. Sin embargo, la exposición prolongada a estas temperaturas, producirá cierto deterioro del tubo interior (Rishen y Rise, 1999). El semen se debe recoger en un ambiente libre de polvo. Antes de la recogida de semen, se debe limpiar cuidadosamente, el prepucio del macho, para evitar cualquier contaminación de aquel. Los movimientos vigorosos hacia arriba y hacia delante significan que se ha producido la eyaculación. Se debe dejar que el macho retire el pene de la vagina antes de intentar retirar esta (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990). Inmediatamente después de la recogida la vagina se cambia de posición, quedando el tubo de vidrio en la parte inferior, a la vez que se sujeta este con la mano. Se quita la presión al abrir la válvula, teniendo la precaución de que no salpique agua cerca del tubo de recogida de semen. Luego se tapa y se coloca en un baño maría a 30 °C (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990)

## MANEJO Y VALORACIÓN DEL SEMEN

### MÉTODO DE DILUCIÓN

La dilución del semen se debe hacer tan pronto como se pueda una vez recolectado y analizado de forma rutinaria. Tanto el semen como el diluyente se colocan en baño maría 32°C para que en el momento de la dilución tenga la misma temperatura.

El diluyente se debe colocar en el baño maría antes que el semen (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990).

La dilución del semen con diluyente frío puede ocasionar el shock por el frío con la consiguiente reducción de la fertilidad. Para la dilución se debe utilizar una pipeta calibrada o la misma pipeta de inseminación unida a una jeringa de 1,0 ml. La pipeta que se utilice debe estar estéril y seca. La dilución se realiza pipeteando la cantidad calculada de diluyente y adicionándola lentamente al recipiente donde se encuentre el semen. Siempre adicionar el diluyente al semen, nunca al contrario. Después de adicionar el diluyente se agita todo convenientemente y se examina al microscopio para comprobar la motilidad de los espermatozoides (Bearden y Fuquay, 1982; Salamón, 1990).

#### CONTROL DE LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL SEMEN

El semen del macho cabrío se evalúa igual que el de toro; tradicionalmente se analizan una serie de parámetros morfológicos y funcionales: volumen, color, olor, concentración, motilidad masal, motilidad individual, porcentaje de formas anormales.

Características del eyaculado de caprino obtenido por medio de la vagina artificial.

CARACTERÍSTICA	PATRÓN NORMAL
Volumen (cc)	0,59
Motilidad Progresiva (%)	81,76
Células espermáticas vivas (%)	91,36
Concentración (espermatozoides/cc)	3,128x10 <sup>6</sup>
Anormalidades primarias (%)	2,2
Anormalidades secundarias (%)	4,13
Total anormalidades (%)	6,36
Normales (%)	93,63

Fuente: Grajales et al., (2011).

Evaluación microscópica de la motilidad individual progresiva en el semen caprino.

MOTILIDAD (%)	EVALUACIÓN	VALOR NÚMÉRICO
80-100	Muy buena	5
60-80	Buena	4
40-60	Media	3
20-40	Pobre	2
0-20	Mala	1

Fuente: Pineda, (2002).

#### VOLUMEN DE EYACULADO

La medida del volumen del eyaculado se efectúa por lectura directa de la graduación que hay en el tubo de recolección del semen. El volumen medio por eyaculado está entre 1 y 1,5 ml pero puede ser muy variable.

#### CONCENTRACIÓN DEL EYACULADO.

El objetivo de esta medida es poder determinar el número de espermatozoides por ml de semen puro utilizando la mínima cantidad de semen. La concentración espermática varía generalmente de 2 a  $10 \times 10^9$  espermatozoides por mililitro. Hay varios métodos para determinarla:

- Apreciación visual de la consistencia del eyaculado.

Este método no se recomienda pues su grado de imprecisión es enorme.

- Contaje exacto mediante la utilización de un contador de hematíes o cámara de Burker.

Esta técnica es precisa pero se debe realizar de manera cuidadosa. El principio de la medida es el contaje del número exacto de células espermáticas que se encuentran en un volumen determinado. La mayoría de las cámaras se componen de unas cuadrículas de un tamaño de  $1/400 \text{ mm}^2$ . La distancia entre el porta y el cubre es constante de manera que el volumen que alberga es de  $1/4000 \text{ mm}^3$  por cada cuadrícula.

De manera que contando 10 grandes cuadrículas que a su vez albergan a 16 del tamaño anteriormente mencionado, el volumen que se analiza es de  $4/100 \text{ mm}^3$ .

Si la dilución inicial es de 0,01 ml de semen puro por 4 ml de suero fisiológico formolado, es decir, 1/400, la concentración real del eyaculado se podrá calcular fácilmente.

Las diferentes etapas a seguir para un contaje de este tipo son:

- \* Hacer un muestreo de precisamente 0,01 ml de semen puro y diluirlo en 4 ml de suero formolado (0,9% de cloruro de sodio; 0,1% de formaldehído en agua destilada) y después homogeneizar la solución.

- \* Preparar la cámara de Burker presionando fuertemente el cubre contra el porta lo que permite adherir el porta al cubre.

- \* Con una pipeta Pasteur, se deposita un gota de la solución, sin burbujas de agua en el borde del porta de manera que por capilaridad penetra la solución del semen.

- \* Dejar reposar por 10 minutos a fin de que los espermatozoides se depositen en el fondo de la cámara.

- \* Colocar la cámara en el microscopio con contraste de fase y un aumento de 200.

- \* Contar al menos 10 cuadrados grandes por rejilla y 3 o 4 rejillas por eyaculado. Si un contaje difiere de la media en más del 10% es necesario comenzar de nuevo a contar.

\* Esta técnica es muy precisa pero requiere práctica y tiempo de dedicación para ser utilizada como rutina en un centro de IA.

Medida de la densidad óptica mediante un espectrofotómetro.

Es la técnica más eficaz puesto que aúna rapidez y precisión. El principio general es el medir la densidad óptica (a 550 nm) de la solución salina formolada anteriormente mencionada, conteniendo los espermatozoides, y compararla con un blanco que no contenga espermatozoides. Antes de utilizar esta técnica es necesario obtener una curva estándar utilizando de 20 a 50 muestras de semen con concentraciones de espermatozoides conocidas determinadas, normalmente con la técnica anterior. La correlación y la pendiente de la regresión lineal se calculan entre la densidad óptica de la muestra y su concentración de espermatozoides.

El coeficiente de correlación debe ser superior a 0,9 y la pendiente de la curva próxima a 1 de todos modos todos los años es necesario realizar un control de rutina para evitar que se produzca una deriva en el espectrofotómetro.

#### MOTILIDAD MASAL

Es una medida rápida y fácil que necesita de un examen microscópico del semen, desde el momento que es recogido. Una gota de semen puro se deposita en una porta sobre la platina caliente del microscopio con unos 100 aumentos. La observación se debe hacer muy rápidamente puesto que la motilidad del semen puro a esta temperatura disminuye rápidamente en 15-20 segundos.

La medida se realiza utilizando una escala que va del 0 (sin ningún movimiento) a 5 (movimientos muy fuertes), de manera que es necesario también que la persona que la realice esté entrenada. Esta técnica es suficiente para detectar los eyaculados en los que los espermatozoides están muertos o son muy poco motiles, pero es muy imprecisa para diferenciar los eyaculados con diferentes porcentajes de espermatozoides motiles o diferentes motilidades individuales.

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDEOS MÓTILES.

Esta medida es similar a la anterior pero a 200 aumentos y con semen diluido entre 60 y 200 x 10<sup>6</sup> espermatozoides. El observador decide, tras el examen sucesivo de 5 campos de una misma preparación, de una estimación visual del porcentaje de espermatozoides motiles, de forma que si la realiza una persona entrenada el resultado es bastante repetible. Para el aprendizaje y el entrenamiento, es necesario comparar esta estimación visual con el porcentaje exacto de espermatozoides vivos que se obtiene con el test de eosina/nigrosina.

Este test, que utiliza una coloración eosina/nigrosina, es eficaz para determinar el porcentaje exacto de espermatozoides muertos y el de los espermatozoides anormales. El porcentaje de formas anormales puede cambiar con la estación del año en el caso de la especie ovina pero no en la especie caprina y con la temperatura ambiente elevada tanto en ovino como caprino. Por ello, si no se producen problemas debido a temperaturas muy elevadas este análisis no es frecuente realizarlo en la especie caprina.

Para conocer la calidad del semen, es útil determinar el porcentaje de formas anormales en muestras de semen cada dos semanas. El semen de los reproductores no debe contener más de un 15-20% de espermatozoides muertos (coloreados) y no más de un 10- 15% de espermatozoides anormales, en el primer eyaculado de una serie. Estos valores disminuyen normalmente con el número de colectas.

## COMO PREPARAR EL COLORANTE EOSINA/NIGROSINA

- Eosina (es soluble en el agua):	1 g
- Nigrosina (soluble en agua):	2 g
- Tricitrato de sodio:	3,57 g
- Agua destilada:	100 ml

El colorante se elabora de la siguiente manera: tras la obtención de una solución homogénea, se debe dejar reposar durante 24 h y luego filtrarla. Se debe medir el pH ya que debe estar comprendido entre 6,7 y 6,8 de manera que se debe añadir citrato sódico si fuera necesario.

La presión osmótica de la solución debe ser de unos 310 miliosmoles y puede conservarse a 4°C y el pH debe controlarse mensualmente.

- Coloración del semen y preparación de las muestras.
- Utilizar una porta objeto limpio y seco sobre una platina caliente a 30°C.
- En la parte izquierda del porta, se colocan 3 gotas de colorante.
- Añadir una gota de semen diluido (dilución de 1 parte de semen y 4 partes de diluyente) y mezclar con el colorante durante 10 segundos.
- Dejar reposar la mezcla durante 50 segundos.
- Extender la mezcla colorante y semen con la ayuda de un cubre.
- Identificar el porta con el número del macho y del eyaculado.
- Conservar la preparación en una estufa a 30°C o en una caja de portas cerrada.

En estas condiciones la preparación puede conservarse sin alteración durante varios meses.

Método de contaje de las diferentes clases de los espermatozoides. Colocar la preparación sobre una platina caliente del microscopio y examinar distintos campos de la misma hasta que se cuenten aproximadamente unos 150 espermatozoides. Este contaje se debe repetir al menos una vez para obtener una medida precisa.

Es necesario distinguir:

- Los espermatozoides coloreados: todo espermatozoide coloreado, en su totalidad o en parte, en rosa o en rojo, se considera como muerto en el momento de la coloración. Este número es utilizado para calcular el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.

- Los espermatozoides normales que puede repartirse en distintas clases:

- \* Sin cola, con una anomalía a nivel de la cabeza, con anomalía en la cola, con gota citoplasmática proximal o distal.

El cálculo de los distintos porcentajes permite clasificar los animales y decidir cuáles pueden ser utilizados para IA. Un examen regular del semen de cada macho permite la detección de anomalías inesperadas o de descubrir que un macho sufre alteraciones espermáticas. En efecto los espermatozoides sufren muy rápidamente las alteraciones en el caso de infecciones incluso muy localizadas.

#### MOTILIDAD INDIVIDUAL DE LOS ESPERMATOZOIDES.

Se realiza al mismo tiempo que la estimación de motilidad masal, y se realiza sobre una escala de 0 (ningún movimiento de los espermatozoides) a 5 (espermatozoides rápidos y con movimiento rectilíneo). Esta estimación debe tener en cuenta la velocidad de desplazamiento de los espermatozoides, de la rectitud de este movimiento y de los movimientos laterales. También se necesita un entrenamiento pero no hay pruebas objetivas que permitan su estandarización.

Estos tests son suficientemente precisos como para juzgar si los eyaculados se deben aceptar o no en función del porcentaje de espermatozoides móviles o no. Son utilizados igualmente para apreciar la calidad del semen una vez que éste ha sido descongelado.

## CRIO PRESERVACIÓN DEL SEMEN:

La crio preservación de semen ofrece muchas ventajas en los sistemas de producción, sobre todo en los programas de mejoramiento genético, pero es sabido que la fertilidad obtenida por I.A es menor en comparación a la obtenida con semen fresco (Watson, 2000) ya que el proceso de crio preservación produce un daño celular que disminuye el porcentaje de espermatozoides viables (Quinn y col., 1969).

El objetivo principal de la crio preservación es el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad celular por un período prolongado de tiempo. Para lo cual, es necesario mantener el semen a temperaturas inferiores a  $-130^{\circ}\text{C}$  para detener completamente los procesos metabólicos (Medeiros y col., 2002). La velocidad de congelamiento es un factor importante en la crio preservación. Cuando la velocidad de congelamiento es muy rápida, la célula no es capaz de deshidratarse lo suficiente (Boiso, 2001).

Produciéndose una inadecuada deshidratación y el agua que aún se encuentra en el interior de la célula forma cristales de hielo, que tienen un efecto letal para la célula (Mazur, 1984). Por el contrario, si la velocidad es demasiado lenta, la deshidratación será extrema y la célula podría colapsar (Boiso, 2001). Por tanto, la velocidad de congelamiento debe ser lo suficientemente rápida para reducir el tiempo de exposición del espermatozoide a condiciones hiperosmóticas y al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente lenta para permitir que ocurra la deshidratación celular. La supervivencia celular será máxima a una velocidad de congelamiento adecuada, que es específica para cada tipo celular. (Holt, 2000). La velocidad de congelamiento es de considerable importancia durante el “rango crítico de temperatura”, definido como el período donde ocurre la formación de cristales de hielo y la deshidratación celular (Kumar y col., 2003). Las membranas celulares es la que sufre mayor daño en los procesos de crio preservación, debido a que pierde fluidez de los componentes lipídicos. La transición de lípidos fluidos a sólidos se presenta a temperaturas entre  $10$  y  $16^{\circ}\text{C}$  alterando todas las funciones de la membrana y confiriéndole un alto grado de fragilidad (Grossmann y Santaló, 1991).

## PROTOCOLOS DE CRIO PRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO – CAPRINO:

La crío preservación de semen emplea el protocolo de congelación lenta con descongelación rápida. Este protocolo está conformado por el proceso de enfriamiento, el proceso de congelamiento y el proceso de descongelamiento (Santiani, 2003). El enfriamiento se da en dos fases, en la primera el semen diluido es enfriado hasta temperaturas de 5°C, para luego, en una segunda fase que permite la estabilización del semen diluido con la adición de sustancias crío protectoras (Salamon y Maxwell, 2000). El período de disminución de temperatura entre 35 a 5°C se da entre a 0.5 a 3 horas (Aisen y col., 2000; Molinia y col., 1994a, 1994b; Gil y col., 2003a, 2003b) y tiene por finalidad el reducir la motilidad espermática (Fiser y Fairfull, 1986). Para permitir la estabilización celular, se mantiene el semen a 5°C por un período de 0.5 a 1.5 horas a antes de iniciar el congelamiento (Aisen y col., 2000; Molinia y col., 1994a, 1994b).

Por otro lado, Santiani (2003) sustenta que el estrés oxidativo se incrementa cuando se mantienen los espermatozoides a 5°C por períodos prolongados, produciéndose una per oxidación lipídica de las membranas. El proceso de congelamiento empieza cuando la temperatura llega a 5°C y se realiza exponiendo las pajuelas a los vapores de nitrógeno líquido (Salamon y Maxwell, 2000). Durante este proceso se presenta el “rango crítico de temperatura”, que se produce entre los -10°C a -25°C (Salamon y Maxwell, 1995a), tanto al congelar como al descongelar, y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Mazur, 1965). Según Byrne y col. (2000), una velocidad de congelamiento de 5°C/minuto entre 5 a -25°C; 50°C/minuto entre -25°C a -130°C y la posterior inmersión en nitrógeno líquido produce la mejor viabilidad en espermatozoides. Por lo tanto, la reducción de la temperatura a 5°C/minuto durante el rango crítico de congelamiento parece ser la velocidad óptima de congelamiento del semen. Otros sostienen que manteniendo las pajuelas 8 cm encima de nitrógeno líquido también permite reducir la temperatura dentro de las pajuelas a -150°C en 15 minutos (El-Alamy y Foote, 2001).

Finalmente, el descongelamiento del semen es tan importante como el congelamiento, porque los espermatozoides tienen que atravesar nuevamente el “rango crítico de temperatura” (Salamon y Maxwell, 2000). El descongelamiento rápido es necesario para prevenir la recristalización de cualquier cristal de hielo intracelular presente en el espermatozoide. En la mayoría de trabajos, la descongelación de pajuelas de semen se ha realizado en baño maría a 37- 50°C durante algunos segundos hasta 5 minutos (Fiser y col., 1981; El-Alamy y Foote, 2001; Gil y col., 2003).

Por otro lado, el descongelamiento a una temperatura menor a 37°C previene el estrés osmótico y mantiene la integridad de membrana en espermatozoides bovinos (Correa y col., 1996)

#### DATOS DEL SEMEN CONGELADO EN CAPRINOS:

El semen de mamífero, en especial el de carnero y chivo, es sensible al enfriamiento rápido (shock frío), traducándose en un aumento del número de espermatozoides muertos, alteración de la distribución de lípidos de membrana y aumento del calcio intracelular. En caso de los espermatozoides de ovino, existe una distribución desigual de proteínas del citoesqueleto asociadas a la membrana, por lo que son más sensibles a los cambios de temperatura por refrigeración (Aisen, 2004).

La congelación del semen en ganado caprino presenta, además de los problemas comunes a la congelación del semen de otras especies, formación de cristales de hielo intra y extracelulares y aumento de la concentración de solutos, ciertas características o particularidades específicas en la composición de su plasma seminal. Las glándulas bulbo uretrales del macho cabrío producen una enzima, la fosfolidasa o lecitinasa, que hidroliza la lecitina de la yema de huevo, utilizada en el diluyente, dando lugar a ácidos grasos y lisolecitina, esta última actúa sobre la membrana plasmática destruyéndola y provocando la muerte de los espermatozoides.

Por otra parte, en los últimos años, se ha puesto de manifiesto la existencia de una fracción proteica del plasma seminal conocida como BU-III, procedente también de las glándulas bulbouretrales, que interacciona con la leche utilizada en los diluyentes produciendo inhibición de la motilidad espermática e induciendo la reacción acrosómica.

#### DILUTORES:

Triladyl es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la congelación de semen bovino en un solo paso. Triladyl se presta también para la congelación de semen de otros rumiantes por ejemplo ovino, caprino, ciervo etc. Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407.

## 1. Composición

- TRIS
- Ácido cítrico
- Azúcar
- Tampones (Buffer)
- Glicerina
- Antibióticos
- Agua de extrema pureza

100 ml del diluyente preparado contienen (unidades activas)

- Tilosina 5,7 mg
- Gentamicina 28,6 mg
- Espectinomicina 34,3 mg
- Lincomicina 17,2 mg

Preparación del diluyente listo para su uso:

Para la preparación del diluyente se requiere de Triladyl concentrado agua pura estéril yema de huevo fresca probeta graduada estéril o matraz de Erlenmeyer papel filtro estéril filtro-embudos estériles El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl, tres partes de agua pura estéril y de una parte de yema de huevo, lo que equivale al 20% de su volumen final.

La solución madre se prepara vertiendo primero un frasco completo de concentrado de Triladyl (250 g) en un matraz graduado, y agregando en varios pasos 750 ml de agua pura estéril. Esta solución madre es estable y puede mantenerse a +5°C por alrededor de una semana. Para completar el diluyente, deben agregarse a la solución madre 250 ml de yema de huevo fresca. Es posible pesar 250 g de yema de huevo, por cuánto el volumen y peso son equivalentes. Se puede esterilizar la cáscara del huevo pasándolo por una llama; también se puede esterilizar la cáscara del huevo, pasando un algodón empapado con alcohol y dejarlo secar.

En seguida se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar yema y clara, vertiendo la yema, sin romperla, de una a otra mitad de la cáscara. Para liberar completamente la yema de la clara y las membranas, se colocan una por una sobre papel toalla, haciéndolas rodar sobre el papel, que retiene los restos de clara de huevo. Finalmente, la yema se posiciona en el borde del papel, se envuelve en el papel y se presiona para abrir la membrana de tal forma, que la yema escurra libremente, dejando adherida la membrana al papel. Enseguida, se le agrega a la yema lentamente la solución madre, mezclándola con un agitador magnético o una varilla de vidrio estéril. La observación estricta de este orden es de importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl (agregar la solución madre a la yema, no al revés).

Para terminar, el diluyente preparado debe filtrarse a través de un filtro-embudo estéril o una gasa estéril, con lo que queda listo para su utilización.

En el caso de caprinos:

La preparación del diluyente de congelación de semen caprino, requiere de una cantidad menor de yema de huevo, en comparación con el diluyente descrito para semen bovino y ovino. Se usa sólo un 5% de yema de huevo, lo que equivale a 60 ml de yema. Las cantidades de concentrado de Triladyl® y de agua bidestilada permanecen iguales: 250 g y 750 ml respectivamente. El grado de dilución recomendado para semen caprino es de 5 a 7:1 (diluyente: semen).

TRIS:

El compuesto tris-[hidroximetil] aminometano ( $C_4H_{11}NO_3$ ), se emplea en la criopreservación de semen bovino, verraco (Salamon y Maxwell, 2000), caprino (Bittencourt y col., 2004; Aboagla y Terada, 2003) y ovino (Salamon y Maxwell, 2000), entre otros. Es de aspecto cristalino, puede formar soluciones acuosas y sistemas reguladores de la concentración de iones de hidrógeno. Tiene capacidad amortiguadora, osmótica y el ser de baja toxicidad, aun en altas concentraciones, es empleado en la crio preservación de semen.

## Preparación de diluyente

- TRIS 3.63 g
- Glucosa 0.50 g
- Ácido cítrico 1.95 g
- Yema de huevo 15 ml
- Glicerol 5 ml
- Estreptomicina 0.1 g
- Penicilina 500 a 1000 U.I. /cc de dilutor preparado
- Agua destilada apirógena hasta completar 100 ml

FUENTE: Evans & Maxwell (1987).

Los diluyentes contienen TRIS o citrato como buffers y glucosa como fuente de energía. Además, deben contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5°C (generalmente yema de huevo) y el congelamiento (generalmente glicerol).

Solución Madre: La solución madre está formada por TRIS, glucosa y ácido cítrico. Esta solución puede conservarse enfriada en la heladera por 2 o 3 días, o congelada por un tiempo mayor. En una probeta de 100 ml se colocan el TRIS, la glucosa y el ácido cítrico y se enrasa a 80 ml con agua destilada. Es conveniente completar la preparación del diluyente, agregando la yema de huevo a la solución madre; esta última debe entibiarse previamente en baño maría para facilitar la homogenización. La yema debe ser fresca, proveniente de un huevo de no más de 3 días de conservación. La cáscara de huevo, se limpia con alcohol, y se deja secar. Luego de que se separa la clara, la yema se sitúa sobre un papel toalla, cuidando de que no se rompa su membrana. El resto de clara puede terminar de separarse haciendo rodar la yema suavemente sobre el papel. Atravesando la membrana de esta última con una jeringa, se extrae la yema desde el interior y se enrasa la cantidad necesaria en la probeta

## DESARROLLO DEL TEMA:

### MATERIALES Y METODOS

#### LUGAR DE EJECUCION:

La presente evaluación se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Animales Menores de la Facultad de Zootecnia de la Universidad Nacional Agraria La Molina. (Son 5 corrales individuales con sus respectivos comederos y bebederos) y el Laboratorio del Banco Nacional de Semen del Servicio de Reproducción Animal – Programa de Mejoramiento Genético

#### Materiales:

- Cuatro machos cabríos, dos son de raza Saanen uno de raza Saanen con Alpino y uno Murciano Granadino con Anglonubian y Criollo, con edades entre los 2 y 8 años 01 hembra adulta de la granja de animales menores de la UNALM.
- Concentrado y forraje para la alimentación a razón de 1 kg /día/animal (alimento donado por PROCABRA).
- Botas de trabajo.
- Lampas.
- Pico.
- Rastrillo
- Escobas
- Baldes
- Libreta de campo y lapiceros.
- 01 mandil para laboratorio.
- Implementos de laboratorio (prestados por el Banco de Semen)
- 01 computadora
- 01 impresora.
- 01 millar papel bond.

## METODOLOGIA DE INVESTIGACION

Se colectaron a cuatro machos, los cuales fueron previamente preparados junto a una hembra Saanen usando el brete de colección 2 a 3 semanas antes del inicio de las colecciones. La colección del semen de caprino se realizó en el brete de colección, utilizando para ello, el método de vagina artificial y una hembra sujeta a un brete, los machos fueron trasladados desde su corral al área de extracción de semen, se les limpió con cuidado el prepucio y se permitió que efectúen montas falsas sobre la hembra para estimular su libido (se puede ver el efecto Flehmen). Una vez obtenida la muestra, el tubo colector fue retirado de la vagina artificial y protegido de los rayos solares con el papel toalla, se realizó con vagina artificial dos veces por semana durante 10 semanas, obteniéndose en total 80 eyaculados. La vagina artificial estará a una temperatura interna de 42°C - 45°C; el tubo colector graduado en mililitros y estéril estará a 37°C para evitar el shock por frío de los espermatozoides. Inmediatamente después de recogido el semen se procederá a la evaluación del volumen, densidad, color, pH, concentración espermática y motilidad masal, para luego ser pre diluido con TRIS y TRILADYL (según sea el caso), mantenidas en baño maría a 37°C

Valoración del eyaculado:

### a) Características Macroscópica y Microscópica:

El color del semen se valoró en el mismo tubo de colección, resultando blanco cremoso. El pH se midió con el papel tornasol, dando 7.0 como resultado. El volumen se midió directamente en el tubo graduado de colección, el cual vario en un rango de 0.5 – 2.0 ml (valor normal de 0.59 ml (Grajales et al., 2011), dicha muestra se tuvo que repartir equitativamente en dos tubos para la evaluación de los dos dilutores. La concentración espermática se determinó con la lectura de la cámara de Neubauer, variando el resultado de  $3,317.3 \times 10^6$  con dilutor Tris y en  $3,171.25 \times 10^6$  con dilutor Triladyl, siendo el promedio normal  $3,128 \times 10^6$  (Grajales et al., 2011).

La evaluación de la motilidad progresiva en semen refrigerado se realizó evaluando una gota de semen en una lámina porta objeto, limpia y mantenida a 37°C al microscopio, dando como resultado 83.78 % con Tris y 81.63 con Triladyl; usando el test de Eosina – Nigrosina se determinó el porcentaje de vivos y muertos, dio como resultado 79.2% con Tris y 79.9% con Triladyl; para la endosmosis se aplicó el test de Host, el mismo que dio como resultados 79.65% con Tris y 74.68% con Triladyl.

En la evaluación del semen congelado se midió de igual forma, motilidad progresiva obteniéndose 51.68% con Tris y 56.03 % con Triladyl; en % vivos y muertos se obtuvo 51.18 % con Tris y 52.28 % con Triladyl, finalmente la endosmosis 39.18 % con Tris y 40.3 % con Triladyl.

Procesamiento de refrigerado y congelación de pajillas:

Para el proceso de congelación, el descenso de la temperatura se realizó en cubetas con agua a temperatura ambiente (20 °C) y luego en refrigeradora (5 °C) por 18 a 22 horas. Si la temperatura no alcanzó los 5 °C antes de la congelación se agregó cubos de hielo al envase de agua para lograr la temperatura adecuada. La congelación de semen se realizó siguiendo el método que usa el Banco Nacional de Semen (vapores de nitrógeno líquido para descender a razón de 20 °C por minuto, durante 7 minutos, y luego se sumergieron las pajillas en nitrógeno líquido para llegar a -196 °C). El semen se almacenó en tanques criogénicos. Para la descongelación, las pajillas se sumergieron en agua a 37 °C por espacio de 15 a 20 segundos y fueron secadas con papel toalla. (Prospero Cabrera, Cesar Pantoja, 2012.)

- a) Acondicionamiento: refrigeración a 5 °C:  
Degradación de la T°C - (congelación)
- b) Dilución del semen: Diluyente a utilizar: Triladyl y  
TRIS
- c) Estabilización/equilibrio: tiempo adecuado = 2 horas
- d) Fraccionamiento / Envasado: pajuelas 0.25

Congelado de pajuelas en congelado horizontal:

- Vapores de Nitrógeno ( $T^{\circ} C$  inicial =  $5^{\circ}C$ )
- Durante 7 minutos se debe llegar a  $-120^{\circ}C$ .
- Luego sumergir las pajillas en el Nitrógeno Líquido ( $-196^{\circ} C$ )

Evaluación del semen crio preservado: Control de Calidad.

a) Descongelado del semen: a  $38^{\circ}C$

Pruebas a realizar:

- MIP
- % Vivos y muertos.
- Endosmosis.

Almacenamiento del semen: En tanques de nitrógeno en pajillas de 0.25ml a  $-196^{\circ} C$ .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se realizó la prueba de desviación estándar y el análisis de varianza, aplicando el T. student, dando como conclusión que el Triladyl tiene menos varianza que el Tris, sobre todo en las evaluaciones en Semen Congelado.

CUADRO . CV . CUADRO ESTADISTICO DESCRIPTIVO  
GENERAL

Volumen ( ml)	n	Concentración TRIS	Concentración Triladyl
0.54 - 064	40	$2\ 990.68 \times 10^6$	$2\ 860.83 \times 10^6$

CUADRO.CV - 1. ANALISIS COMPARATIVO DE CARACTERISTICAS SEMINALES EN MUESTRAS REFRIGERADAS

CARACTERISTICA	UNIDAD	n	TRIS	TRILADYL
Motilidad progresiva	%	40	76.77 +- 2.70 a	74.03 +- 2.45a
Espermatozoides vivos (refrigerado)	%	40	70.96 +- 1.55 a	71.55 +- 1.48 a
Endosmosis (refrigerado)	%	40	71.76 +- 1.60 a	72.34 +- 1.43 a

CUADRO.CV - 2. ANALISIS COMPARATIVO DE CARACTERISTICAS SEMINALES EN MUESTRAS CONGELADAS

CARACTERISTICA	UNIDAD	N	TRIS	TRILADYL
Motilidad progresiva	millones /ml	40	47.99 +- 4.90 a	54.11 +- 4.11 b
espermatozoides vivos (congelado)	%	40	42.27 +- 3.74 a	45.45 +- 2.54 b
endosmosis (congelado)	%	40	34.30 +- 3.02 a	36.05 +- 1.45 b

## DISCUSIONES - RESULTADOS:

El presente estudio tiene como finalidad evaluar el efecto de los dilutores Tris y Triladyl, en la conservación de características seminales del macho cabrío y poder determinar cuál sería el de óptimo uso en un posterior manejo a otro nivel, así como también evaluar el efecto de los dilutores Tris y Triladyl al momento de la congelación en motilidad, porcentaje de vivos y muertos e integridad de membrana citoplasmática del espermatozoide, es decir a la prueba de t, el triladyl proporciona en la dilución, refrigeración y congelación mejores respuestas al 0.05 de probabilidad. La evaluación de dichos parámetros se detallan en los cuadros 1 y 2, hay una diferencia significativa en el semen congelado (cuadro 2), con el uso del Triladyl se obtienen resultados con menor variabilidad. (MIP de 54%, % Vivos de 45% y la endosmosis de % 36).

## CONCLUSIONES

Al finalizar la presente monografía se puede concluir que el trabajo de colecta de semen de machos cabríos es un trabajo interesante que requiere de un buen manejo previo de adecuación de los machos, de mucha paciencia, tener los ambientes adecuados y una hembra que se adapte al trabajo.

Asimismo se concluye que el trabajo de crío conservación del semen, desde la colecta, dilución, refrigeración, congelación y post descongelación, se pudo realizar sin ningún inconveniente ya que se contaba con los equipos e implementos necesarios en el laboratorio del Banco Nacional de Semen.

Finalmente después de haber realizado los análisis macro y microscópicos se concluye que el dilutor comercial Triladyl fue mejor ya que a la prueba de t, el triladyl proporciona en la dilución, refrigeración y congelación mejores respuestas al 0.05 de probabilidad, al obtener 54.11 % en MIP congelado, 45.4% en espermatozoides vivos en congelado y 36.05% en endosmosis congelado mientras que con el Tris se obtuvo 47.99 % en MIP congelado, 42.27% en espermatozoides vivos y % 34.30 en endosmosis, habiendo una diferencia estadística significativa (alta variabilidad con Tris).

## RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos se recomienda el uso del dilutor comercial Triladyl por ser más fácil su preparación, además que da mejores resultados en MIP, % Vivos y Endosmosis en semen congelado.
- Se recomienda el uso de las pajillas obtenidas del presente estudio en Inseminación Artificial, lo cual sería objeto de estudio de un nuevo proyecto en esta especie.
- Se recomienda usar machos en buen estado de salud y en buen estado de adaptación que no perjudique la colecta con montas falsas.
- Se recomienda tener un brete de colección con un lugar adecuado para la persona encargada de la colección (a diferente altura), ya que al ser animales con cachos puede causar algún incidente.
- Se recomienda mucho la higiene en la colecta, limpieza del prepucio antes de la misma, ya que una muestra sucia perjudica todo el proceso.
- Se recomienda respetar los protocolos de dilución, refrigeración y congelación para poder tener resultados óptimos de evaluación y posterior uso.
- Por último se recomienda seguir haciendo proyectos de investigación en esta especie tan interesante.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bearden, H. J. y J. Fuquay (1982) *Reproducción animal aplicada*. Manual Moderno. México D. F.
- BonDurant, B (1979) *Pregnancy diagnosis in sheep and goats: A clinical syllabus*. Departament of Reproduction. School of Veterinariy Medicine. University of Davis, California – USA.
- Cabrera V., Próspero; Pantoja A., César. (2012), *Viabilidad Espermática e Integridad del Acrosoma en Semen Congelado de Toros Nacionales*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, Lima – Perú.
- Chemineau, P., Cagnie, Y., Guerin, Yorgueur, P. y Vallet, J. C.(1991) *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. Food and agriculture organization of the United Nations (FAO). Roma – Italia.
- Cortés Gallego Susana (2003) *Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino* (tesis de doctorado) Universidad Complutense de Madrid - Facultad De Ciencias Biológicas, Madrid – España.
- De Alba, J. (1985). *Reproducción animal*. La Prensa Medica Mexicana. México.
- D. Tapia, G. Dueñas, A. Gallegos, J. Sarria, E. Mellisho (2011) *Inseminación Laparoscópica con Semen Congelado en Cabras Criollas de Cañete-Lima*, Lima – Perú.
- Delgado Cáceres Belma Exrlalia (2013) *Evaluación espermática de semen de ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad* (tesis de pregrado) Universidad Ricardo Palma, Lima – Perú.
- Foote, R. H (2002), *the history of artificial insemination: Selected notes and notables*. J. Animal.

- Hafez, E.S.E. y Hafez B (2000) *Reproducción e inseminación artificial en animales*, México, D.F., Ed. McGraw-Hill Interamericana, 7ª ed.
- Hernández Corredor, Leonardo (2014) *Evaluación de la motilidad espermática de semen caprino crio preservado bajo diferentes medios diluyentes a través del sistema Casa* (tesis de especialización) - Universidad Nacional Abierta y a Distancia, Cucuta – Venezuela.
- Marcela Cueto, Alejandro Gibbons, María Macarena Bruno-Galarraga y Jimena Fernández, (2016), *Manual De Obtención, Procesamiento y Conservación del Semen Ovino*, Argentina, Editorial INTA.
- Manual, Triladyl - Diluyente de Semen Bovino – Minitub, Alemania.
- Sandoval Monzón, Rocío Silvia (2005) *Crio preservación de semen ovino empleando diferentes dilutores y combinaciones de agentes crio protectores permeantes y no permeantes* (tesis de pregrado) Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.
- Wallance, M. J (1992) *Artificial Insemination and embryo transfer. Progress in sheep and goat reserch*, ED. A.W: Speedy. CAB International. Wallingford-U. K

## ANEXOS

**ANEXO 1:** Laboratorio de Animales Menores – Zona de jaula de machos cabríos.



**ANEXO 2:** Macho Saanen – Ulises.



**ANEXO 3: Hembra para la colecta**



**ANEXO 4: Vagina artificial**





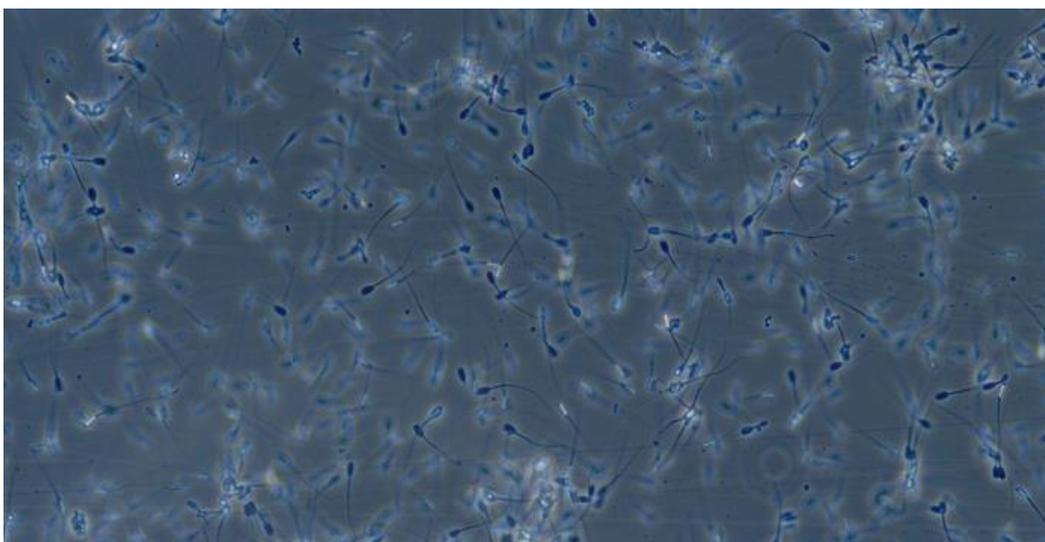
**ANEXO 5: Metodología de colecta de semen**



**ANEXO 6:** Evaluación y pre dilución del semen



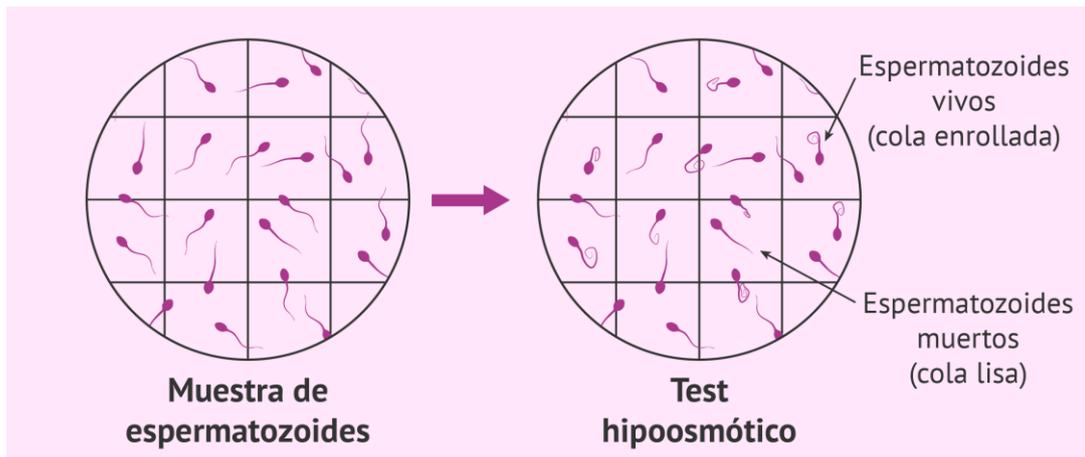
**ANEXO 7:** Motilidad progresiva



**ANEXO 8: Test de Eosina – Nigrosina (% VIVOS)**



**ANEXO 9: Test Host (Endosmosis)**



**ANEXO 10: Descongelamiento de pajilla de 37 ° C**



**ANEXO 11: Trabajo en laboratorio del BNS**



**ANEXO 12: Tablas de análisis estadístico:**

**CONCENTRACIÓN**

No. De machos cabríos	TRIS	TRILADYL
1	3500	3350
2	3700	3300
3	2900	3200
4	3400	3300
5	3500	3200
6	3300	3200
7	3500	3350
8	3600	3300
9	2900	3300
10	3300	3100
11	3350	3200
12	3450	3300
13	3200	2900
14	3500	3300
15	3550	3300
16	3500	3300
17	3400	3200
18	3000	3000
19	3300	3200
20	3200	3000
21	3200	3000
22	3500	3300
23	3200	3000
24	3500	3300
25	3000	2900
26	3000	2900
27	3350	3100
28	3300	3200
29	3200	3150
30	3250	3100
31	3350	3100
32	3250	3100
33	3350	3200
34	3200	3150
35	3100	2950
36	3350	3200
37	3350	3150
38	3500	3400
39	3400	3200
40	3300	3150

DS 106.7708 108.282

PROM **2990.68** **2860.83**

CV 3.570% 3.785%

Ambos tienen ligeramente igual dispersión de datos

**MIP REFRIG.**

No. De machos cabríos	TRIS	TRILADYL
1	87	86
2	89	86
3	83	83
4	86	80
5	86	83
6	80	79
7	80	80
8	76	73
9	80	80
10	80	79
11	89	83
12	83	79
13	86	83
14	83	80
15	86	86
16	86	83
17	83	80
18	80	80
19	86	86
20	83	83
21	86	80
22	79	80
23	76	80
24	80	80
25	86	83
26	80	83
27	86	80
28	86	80
29	86	86
30	83	80
31	86	86
32	86	83
33	83	80
34	80	83
35	89	83
36	86	80
37	83	80
38	86	83
39	89	86
40	83	80

DS 2.7 2.244994

PROM **76.77** **74.0245**

CV 3.517% 3.033%

Ambos tienen ligeramente igual dispersión de datos

**% VIVOS REFRIG**

No. De machos cabríos	TRIS	TRILADYL
1	79	83
2	80	81
3	78	79
4	76	84
5	79	80
6	80	78
7	82	79
8	81	80
9	78	82
10	80	80
11	82	80
12	81	80
13	79	83
14	80	79
15	78	83
16	82	82
17	80	80
18	80	82
19	79	81
20	81	80
21	79	80
22	76	79
23	75	78
24	78	80
25	81	77
26	76	81
27	80	79
28	79	75
29	78	80
30	80	81
31	80	76
32	80	78
33	78	80
34	78	80
35	76	79
36	79	81
37	80	78
38	80	78
39	76	79
40	81	81

DS 1.552417 1.48324

PROM **70.9552** **71.5483**

CV 2.188% 2.073%

Ambos tienen ligeramente igual dispersión de datos

**% ENDOSMOSIS REFRIG**

No. De machos cabríos	TRIS	TRILADYL
1	81	80
2	80	81
3	79	78
4	76	79
5	78	76
6	80	75
7	79	79
8	77	74
9	78	79
10	79	81
11	80	80
12	80	79
13	82	81
14	81	80
15	82	83
16	80	80
17	79	78
18	80	81
19	81	83
20	80	80
21	80	80
22	74	80
23	79	79
24	78	82
25	82	78
26	80	81
27	81	80
28	80	78
29	82	82
30	80	80
31	82	84
32	78	79
33	78	80
34	78	80
35	81	80
36	80	81
37	82	79
38	81	82
39	78	80
40	80	81

DS 1.6 1.431782

PROM **71.76** **72.3432**

CV 2.230% 1.979%

Tris tiene mayor dispersión que Triladyl

**MIP CONG**

No. De machos cabríos	TRIS	TRILADYL
1	40	50
2	53	60
3	50	60
4	46	50
5	60	66
6	50	46
7	46	50
8	50	56
9	49	50
10	50	54
11	66	60
12	60	53
13	60	56
14	50	56
15	50	50
16	46	60
17	50	56
18	56	60
19	50	63
20	49	53
21	66	50
22	40	53
23	56	60
24	46	53
25	49	56
26	49	60
27	50	50
28	49	50
29	46	50
30	50	50
31	60	63
32	56	53
33	56	60
34	59	60
35	46	63
36	50	60
37	60	60
38	49	59
39	50	63
40	49	59

DS 4.90306 4.109745  
 PROM **47.9903** **54.111**  
 CV 10.217% 7.595%

Tris tiene mayor dispersión que Triladyl

**% VIVOS CONG**

No. De machos cabríos	TRIS	TRILADYL
1	71	65
2	66	52
3	70	60
4	50	53
5	48	51
6	50	50
7	49	48
8	48	51
9	48	49
10	50	51
11	68	86
12	45	42
13	50	49
14	54	52
15	46	52
16	49	56
17	50	54
18	50	52
19	47	55
20	51	50
21	63	51
22	55	49
23	42	50
24	52	50
25	50	49
26	48	55
27	51	50
28	50	51
29	49	48
30	52	52
31	56	56
32	51	47
33	46	51
34	46	51
35	50	50
36	42	53
37	50	52
38	48	48
39	46	54
40	40	46

DS 3.742993 2.537716  
 PROM **42.2743** **45.4538**  
 CV 8.854% 5.583%

Tris tiene mayor dispersión que Triladyl

**% ENDOSMOSIS CONG**

No. De machos cabríos	TRIS	TRILADYL
1	52	57
2	40	40
3	40	38
4	35	38
5	38	41
6	39	36
7	34	38
8	35	37
9	30	40
10	38	40
11	55	52
12	51	40
13	40	42
14	38	39
15	30	41
16	38	40
17	39	37
18	38	42
19	37	40
20	36	38
21	47	40
22	43	41
23	38	43
24	38	38
25	39	40
26	40	41
27	41	37
28	37	36
29	36	39
30	40	40
31	45	42
32	33	40
33	40	39
34	40	38
35	38	39
36	36	41
37	40	40
38	37	39
39	40	43
40	36	40

DS            3.014963            1.445683

PROM	<b>34.3015</b>	<b>36.0446</b>
------	----------------	----------------

CV            8.790%            4.011%

Tris tiene mayor dispersión que Triladyl
---

CONCENTRACIÓN SEMEN FRESCO	1	
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>TRIS</i>	<i>TRILADYL</i>
Media	3317.5	3171.25
Varianza	35455.12821	18062.5
Observaciones	40	40
Coefficiente de correlación de Pearson	0.676455954	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	39	
Estadístico t	6.661427443	
P(T<=t) una cola	3.1352E-08	
Valor crítico de t (una cola)	1.684875122	
P(T<=t) dos colas	6.2704E-08	
Valor crítico de t (dos colas)	2.02269092	
<b>No tienen igual concentración t calculada = 6,6614 &gt; t tabulada 2,0226</b>		

MIP REFRIG		
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	<i>TRIS</i>	<i>TRILADYL</i>
Media	83.775	81.7
Varianza	11.71730769	7.6
Observaciones	40	40
Coefficiente de correlación de Pearson	0.65836706	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	39	
Estadístico t	4.999032555	
P(T<=t) una cola	6.28123E-06	
Valor crítico de t (una cola)	1.684875122	
P(T<=t) dos colas	1.25625E-05	
Valor crítico de t (dos colas)	2.02269092	
<b>En la refrigeración no tienen igual MIP t calculada =4,999 &gt; t tabulada 2,0226</b>		

% VIVOS REFRIG		
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	TRIS	TRILADYL
Media	79.125	79.9
Varianza	3.240384615	3.528205128
Observaciones	40	40
Coefficiente de correlación de Pearson	-0.094791678	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	39	
Estadístico t	-1.800668907	
P(T<=t) una cola	0.039746167	
Valor crítico de t (una cola)	1.684875122	
P(T<=t) dos colas	0.079492334	
Valor crítico de t (dos colas)	2.02269092	
Tienen igual % vivos refriger t calculada = -1,8006 < t tabulada 2,0226		

% ENDOSMOSIS REFRIG		
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	TRIS	TRILADYL
Media	79.65	79.825
Varianza	3.053846154	3.891666667
Observaciones	40	40
Coefficiente de correlación de Pearson	0.383418151	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	39	
Estadístico t	-0.533625684	
P(T<=t) una cola	0.298314501	
Valor crítico de t (una cola)	1.684875122	
P(T<=t) dos colas	0.596629002	
Valor crítico de t (dos colas)	2.02269092	
Tienen igual % endosmosis refriger t calculada = -0,5336 < t tabulada 2,0226		

MIP CONG		
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	TRIS	TRILADYL
Media	51.675	56.025
Varianza	36.84038462	25.61474359
Observaciones	40	40
Coefficiente de correlación de Pearson	0.319959827	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	39	
Estadístico t	-4.205429701	
P(T<=t) una cola	7.37263E-05	
Valor crítico de t (una cola)	1.684875122	
P(T<=t) dos colas	0.000147453	
Valor crítico de t (dos colas)	2.02269092	
Tienen igual MIP cong t calculada =-4,2054< t tabulada 2,0226		

% VIVOS CONG		
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	TRIS	TRILADYL
Media	51.175	52.275
Varianza	50.55833333	44.15320513
Observaciones	40	40
Coefficiente de correlación de Pearson	0.618715966	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	39	
Estadístico t	-1.155557914	
P(T<=t) una cola	0.127446311	
Valor crítico de t (una cola)	1.684875122	
P(T<=t) dos colas	0.254892623	
Valor crítico de t (dos colas)	2.02269092	
Tienen igual % vivos cong t calculada =-1,1555< t tabulada 2,0226		

% ENDOSMOSIS CONG		
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas		
	TRIS	TRILADYL
Media	39.175	40.3
Varianza	25.84038462	14.16410256
Observaciones	40	40
Coefficiente de correlación de Pearson	0.612368063	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	39	
Estadístico t	-1.747722777	
P(T<=t) una cola	0.044191082	
Valor crítico de t (una cola)	1.684875122	
P(T<=t) dos colas	0.088382163	
Valor crítico de t (dos colas)	2.02269092	
Tienen igual %endosmosis calculada =-1,74772< t tabulada 2,0226		