

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MEDICINA VETERINARIA



**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO**

“Efecto del plasma seminal y vitamina E sobre el proceso de crioconservación y calidad post descongelado de semen ovino”

AUTOR: INCA PILCO DAYANA MISHEL

TUTOR: ING. GONZALO ARAGADVAY YUNGÁN, PhD

Cevallos – Ecuador

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, DAYANA MISHEL INCA PILCO, portador de cédula de identidad número: 1501043689, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “Efecto del plasma seminal y vitamina E sobre el proceso de criopreservación y calidad post descongelado de semen ovino” es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



DAYANA MISHEL INCA PILCO

C.I. 1501043689

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “Efecto del plasma seminal y vitamina E sobre el proceso de crioconservación y calidad post descongelado de semen ovino” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, 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.



.....
DAYANA MISHEL INCA PILCO

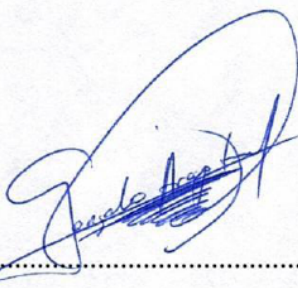
C.I. 1501043689

AUTORA

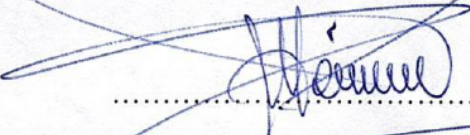
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“Efecto del plasma seminal y vitamina E sobre el proceso de crioconservación y calidad post descongelado de semen ovino”

REVISADO POR:



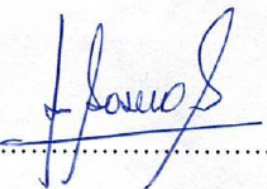
.....
Ing. Gonzalo Aragadvay Yungán, PhD.
TUTOR



.....
Ing. Patricio Núñez Torres, PhD.
PRESIDENTE TRIBUNAL

FECHA

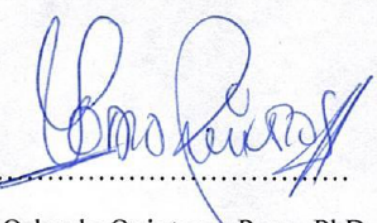
31/08/2023



.....
Dr. Marco Rosero Peñaherrera, Mg.

31/08/2023

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN



.....
Dr. Orlando Quinteros Pozo, PhD.

31/08/2023

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

A mi madre Ligia Pilco la mujer más hermosa y fuerte que conozco, gracias por brindarme la oportunidad de vivir y enseñarme a brillar con luz propia.

A mi padre Fausto Jara, pilar fundamental en mi vida e inspiración para conseguir todas mis metas.

A mi compañero de vida, mi hermano Samir Leandro por ser mi confidente y mejor aliado en todas las etapas de mi vida.

A mis amuletos de la buena suerte, Rosita y David por ser la familia que uno escoge.

En memoria de mi mascota Bombón, quien desde su nacimiento me llenó de inspiración para aventurarme en esta hermosa carrera. A mis queridas mascotas Oddy y Freya por sus lamidas llenas de amor y tranquilidad, por siempre recibirme con su colita moviéndose de tanta alegría. También a mis futuros pacientes. Todo mi esfuerzo y dedicación es por y para ustedes.

Por último, este trabajo va dedicado a mi persona por trabajar duro, ser muy resiliente y por seguir siempre a su corazón. Estoy segura de que la Daya de 8 años y la de 80 años están orgullosas de ti.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la niña María de Jerusalén por brindarme la fortaleza necesaria para afrontar todas las adversidades. Gracias papá, por cuidar de mi desde el cielo, siempre te llevo presente dentro de mi corazón.

A mi brillante madre y extraordinario padre por ser mis guías a lo largo de estos maravillosos 22 años, han formado una grandiosa mujer, llena de principios y valores. Gracias por ser mis pilares y todo el sacrificio que hacen a diario. A Samir Leandro por ser mi fuente de inspiración y red de apoyo de principio a fin. Los amo, mis logros también son suyos.

A mis abuelitos Miguel Ángel, Clarita, Flor, Antonio y Yolita. A toda mi familia por sus buenos consejos, cálidos abrazos y bendiciones. A mi padrino Juanito y su hermano, gracias por ser mi mano amiga y cuidar siempre de mí.

Agradezco a mi tutor, Ing. Gonzalo Aragadvay por su apoyo incondicional y paciencia, gracias por compartirme sus conocimientos durante este trabajo de investigación.

A David Isaac por secar mis lágrimas, brindarme soluciones, creer en mí y recordarme lo asombrosa que soy cada que se me olvida, te respeto y amo mucho.

A Rosita Viteri por ser mi mejor mitad y nunca abandonarme en este difícil camino. A Ibeth Saltos que a pesar de los años siempre cuidó de mí. A Cata Proaño por su ayuda y amistad incondicional. A Emily Zurita por apoyarme a la distancia, aunque no entendía nada de mi carrera. A todas, gracias por haberme hecho sentir lo que es realmente una amistad incondicional, siempre en las buenas y malas, entre risas o tristezas.

A todos mis amigos de escuela, colegio y universidad por su apoyo a través de todos estos maravillosos años, me llevo gratos recuerdos de cada uno de ustedes.

Un agradecimiento especial a los trabajadores, Don Panchito el chófer y guardias, Dios le pague todo el cariño y palabras de aliento que me brindaron.

Son muchas las personas que han formado parte de este sueño. Millón gracias a todos.

RESUMEN EJECUTIVO

En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto del plasma seminal y vitamina E sobre la calidad post descongelado de semen ovino para lo cual se trabajó con tres tratamientos: **T0:** tratamiento control donde se utilizó un diluyente comercial, **T1:** se añadió al diluyente comercial vitamina E (25%), **T2:** se añadió al diluyente comercial vitamina E (25%) más plasma seminal (50%). Se trabajó con 3 carneros y 1 oveja, llegando a evaluar 210 pajuelas ovinas en total. Mediante un diseño completamente al azar con 7 réplicas por tratamiento, se comparó los resultados mediante la prueba estadística de Tukey con un nivel de significancia del 95% utilizando el programa estadístico Infostat.

Se analizaron las siguientes variables en dos fases, para el semen fresco se procedió a una evaluación individual por eyaculado/carnero que consistió en un estudio macroscópico (volumen, color, translucidez) y una evaluación microscópica mediante técnicas convencionales (concentración, movilidad masal, morfología, vitalidad). Mientras que para el semen post descongelado se procedió a realizar un pool de semen heteroespérmico y la formación de alícuotas para cada tratamiento correspondiente, se diluyeron, envasaron, congelaron y se evaluó el post descongelado a las 0 y 2 horas microscópicamente mediante técnicas convencionales (concentración, movilidad individual, morfología, vitalidad) adicionadas la resistencia osmótica (HOST) e integridad del acrosoma. En conclusión, se obtuvo resultados positivos en la calidad seminal post descongelado al adicionar vitamina E y plasma seminal al diluyente comercial.

Palabras clave: Semen, plasma seminal, vitamina E, diluyente comercial, técnicas convencionales, HOST e integridad del acrosoma.

ABSTRACT

In this research work, the effect of seminal plasma and vitamin E on the post-thaw quality of ovine semen was evaluated using three treatments: T0: control treatment where a commercial extender was used, T1: vitamin E (25%) was added to the commercial extender, T2: vitamin E (25%) plus seminal plasma (50%) was added to the commercial extender. We worked with 3 rams and 1 ewe, evaluating a total of 210 sheep straws. Using a completely randomized design with 7 replicates per treatment, the results were compared by Tukey's statistical test with a significance level of 95% using the statistical program Infostat.

The following variables were analyzed in two phases: for fresh semen, an individual evaluation per ejaculate/carrier was performed, consisting of a macroscopic study (volume, color, translucency) and a microscopic evaluation using conventional techniques (concentration, mass motility, morphology, vitality). For the post-thawed semen, a pool of heterospermic semen was made and aliquots were formed for each corresponding treatment, diluted, packaged, frozen and the post-thawed semen was evaluated microscopically at 0 and 2 hours by conventional techniques (concentration, individual mobility, morphology, vitality) plus osmotic resistance (HOST) and acrosome integrity. In conclusion, positive results were obtained in post-thawed semen quality by adding vitamin E and seminal plasma to the commercial diluent.

Key words: Semen, seminal plasma, vitamin E, commercial diluent, conventional techniques, HOST and acrosome integrity.

INDICE

DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN EJECUTIVO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I.-MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.2. Marco conceptual	3
1.2.1. Ovino cultura en Ecuador.....	3
1.2.2. Biotecnología de la reproducción.....	4
1.2.3. Características reproductivas del ovino	4
1.2.4. Madurez sexual	4
1.2.5. Espermatozoide.....	5
1.2.6. Espermatogénesis.....	5
1.2.7. Características del semen	6
1.2.8. Plasma seminal.....	6
1.2.9. Colecta de semen.....	8
1.2.10. Criopreservación de semen.....	8
1.3. Objetivos.....	11
▪ Objetivo General	11
▪ Objetivos Específicos	11
1.4. Hipótesis	11
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA	12
2.1. Ubicación del experimento	12

2.2. Características del lugar	12
2.3. Materiales.....	12
2.4. Diseño experimental.....	14
2.5. Métodos.....	15
Adaptación de los animales.....	15
Evaluación de la calidad seminal (técnicas convencionales)	16
Dilución y congelación del semen	18
Estudio de la resistencia osmótica e integridad del acrosoma	21
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1. Análisis y discusión de los resultados.....	23
3.1.1. Análisis semen fresco.....	23
3.1.2. Análisis de semen heteroespérmico postdescongelado.....	25
3.2. Verificación de hipótesis.....	29
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	30
4.1. Conclusiones	30
4.2. Recomendaciones.....	30
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	31
ANEXOS.....	35

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1 Composición Seminal	7
Tabla 2 Propiedades químicas del plasma seminal	7
Tabla 3 Características metereológicas	12
Tabla 4 Composición química del diluyente comercial	19
Tabla 5 Análisis de semen fresco de ovinos criollos	23
Tabla 6 Evaluación de los parámetros de calidad seminal postdescongelado a las 0 y 2 horas	25

CAPÍTULO I.-MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

La explotación ovina en Ecuador ha tenido importancia desde la llegada de los españoles, en la actualidad representa una gran fuente de ingreso para pequeños productores y campesinos debido a que estos animales les proporcionan lana, carne e incluso abono, para lo cual es importante un correcto manejo de nutrición, genética, salud que asegurará un incremento en los ingresos (**Quishpi, 2015**).

Para tener una producción sustentable se debe invertir en tecnologías que aporten al ámbito reproductivo, una de ellas es la criopreservación siendo la más aplicada debido a que tiene como objetivo mantener la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides para su uso en un futuro en inseminaciones artificiales (**Ledesma et al., 2013**), para conseguir su conservación por un período largo de tiempo es necesario mantenerlo a temperaturas inferiores a -130°C , con ayuda de crioprotectores encargados de proteger a los espermatozoides durante la fase de cristalización (**Barrera, 2020**).

A diferencia de otras especies los espermatozoides ovinos tienen mayor sensibilidad al estrés térmico debido al frío, provocando una pérdida en las proteínas de la membrana del espermatozoide, lo que tiene como consecuencia un descenso en la viabilidad del semen post descongelado (**Parada, 2016**). Sin embargo, el espermatozoide ovinos presenta mayor supervivencia post descongelado con un 42.2% de concepción lo que representa 20% menos que la fertilidad con semen fresco (**Domínguez et al., 2007**).

Con el fin de mejorar la calidad seminal post descongelado, se han buscado diferentes sustancias, entre ellas están los antioxidantes, como la vitamina E y plasma seminal que

ayudarán a prolongar la vida de los espermatozoides y mejorar su funcionalidad post descongelado. En los estudios realizados por **(Cardozo et al., 2009)** se concluyó que el momento más adecuado para agregar el plasma seminal es antes de la congelación y a un 50%, debido a que se tuvo mayor porcentaje de ovejas preñadas asemejándose a las ovejas del grupo control, los resultados demostraron que la movilidad aumentó al agregar el tratamiento que contiene proteínas del plasma seminal ($22\% \pm 1,22\%$ para el control vs. $40\% \pm 2,74\%$ para el tratamiento con proteínas del plasma seminal), las mismas que se obtuvieron mediante electroforesis en geles de acrilamida conocido como 2D-PAGE.

(Parada, 2016), en su investigación concluye que es suficiente que el plasma esté 15 minutos en contacto con la muestra para obtener una mejora significativa en la cinética espermática y que el tratamiento post descongelado con plasma seminal es de gran ayuda para mejorar la calidad seminal del ovino, sin embargo, hay que tener en cuenta que el PS difiere según la estación de año en el que se encuentra. Para esta investigación se trabajó con 5 carneros, se extrajo el semen mediante vagina artificial y electroeyaculador, para conseguir el plasma seminal se obtiene del pool de eyaculados es decir del semen heteroespérmico.

Otro estudio realizado por **(Vargas, 2019.)** manifiesta que el uso de 5% de plasma seminal heteroespecífico (Toro a carnero) es el más óptimo debido a que en los resultados se observó la mejora de la integridad de la membrana plasmática y motilidad progresiva, también recomienda el uso de menor concentración para el beneficio de los espermatozoides post descongelación, debido a que con porcentajes como 10% y 20% se obtuvo resultados negativos. Para su investigación se utilizó eyaculados de carneros Black Belly y se trabajó con 4 tratamientos T0:0, T5:5, T10:10, T20:20 y 10 réplicas. Los parámetros que evaluaron fueron motilidad progresiva, velocidad progresiva, velocidad del trayecto, espermatozoides estáticos, HOST, etc. mediante el sistema CASA.

En contraste con el resto de investigaciones (**Jiménez et al., 2021**) concluye que existe un efecto nulo o desfavorable al añadir vitamina E, debido a que su respuesta varía de acuerdo a los diferentes componentes por ejemplo azúcar y amortiguadores utilizados en los diluyentes. Los tratamientos utilizados en esta investigación fueron 200 μM de quercetina, 100 μM de vitamina E y una combinación de ambas en las mismas dosis. Los tratamientos que utilizó en su investigación, tratamiento control, tratamiento con quercetina (200 μM), tratamiento con vit E (100 μM), tratamiento de quercetina + vit E a mismas dosis. Siendo el tratamiento con quercetina 200 μM el que obtuvo mejores resultados en cuanto a espermatozoides vivos y con acrosoma intacto ($22.33 \pm 2.51\%$).

La autora (**Chango, 2023**) trabajó con tres tratamientos uno control (Tc), con el jugo de tuna (Tt) y una mezcla de jugo de tuna y vitamina E (Tt+E) con semen heteroespérmico proveniente de 3 carneros y manifiesta que la adición de 25% de jugo de Tuna fue el tratamiento con resultados más alentadores sobre los parámetros de calidad seminal, mientras que la adición de 25 % de vitamina E mejoró la concentración, morfología y vitalidad pero no la movilidad, mientras que la adición de vitamina E + jugo de Tuna disminuyó las anomalías presentes en los espermatozoides.

1.2. Marco conceptual

1.2.1. Ovino cultura en Ecuador

Actualmente las comunidades indígenas utilizan una explotación de tipo extensivo con ovinos pertenecientes a razas criollas y mestizas. Sin embargo, existen productores que utilizan razas como Rambouillet con el fin de conseguir un mejoramiento genético, nutricional y sanitario (**Pazmiño & Rubio, 2012**).

1.2.2. Biotecnología de la reproducción

Mediante el uso de biotecnologías la monitorización y procesos reproductivos se vuelven más fáciles de controlar, existen varios beneficios entre ellos el sexaje de semen, fertilización in vitro, crioconservación de semen y embriones, etc (**Choudhary et al., 2016**).

1.2.3. Características reproductivas del ovino

El aparato reproductor tiene 3 funciones importante como son: La producción de espermatozoides, maduración y almacenamiento y por último el depósito de semen dentro de la hembra. Su conformación es la siguiente: pene, uretra, testículos, epidídimo, escroto, glándulas accesorias y prepucio (**Zarraga, 2021**).

Los testículos tienen un diámetro de 3.5 a 6.8 cm, longitud de 7.5 a 11.5 cm y un peso aproximado de 200 g. Mientras que los tubos seminíferos tienen una longitud de 4.000 m, las vesículas seminales tienen una longitud de 4 a 5 cm y tienen una forma lobulada. El pene contiene una estructura llamada flexura sigmoidea y es fibroelástica, con una longitud de 30 cm y un diámetro de 1.5 cm y por último el glande mide 5 cm aproximadamente (**Zarraga, 2021**).

1.2.4. Madurez sexual

Se comienza a producir espermatozoides (espermatogénesis) por lo que se puede conseguir una reproducción exitosa, sin embargo, se presenta menor libido y concentración espermática. Comienza entre los 5 y 8 meses con cambios producidos por

la GnRh (hormona liberadora de gonadotropinas) hacia la LH (hormona luteinizante) permitiendo una serie de cambios en cuanto a maduración testicular permitiendo la aparición de conductas de apareamiento (**Zarraga, 2021**). La producción de espermatozoides tiene dos fases: división y diferenciación que están comprendidas en un aproximado de 49 días, y este proceso se considera constante con una producción espermática de 20 millones por gramo de testículo al día (**Garcia, 2014**).

1.2.5. Espermatozoide

Mide 60 μm y tienen su origen en los testículos específicamente en los tubos seminales, se conforman por una cabeza y cola. Tiene una pequeña membrana llamada acrosoma que rodea la cabeza del espermatozoide y contiene varias enzimas. Dentro del núcleo de la cabeza se encuentran los cromosomas portadores de información genética (ADN). El cuello es más grueso y se encuentra muchas mitocondrias que proveen energía. La cola se divide en dos partes: la larga que contiene proteínas y fibrinas y la pequeña que se encuentra al último que no tiene actividad proteica (**Vargas, 2019**).

1.2.6. Espermatogénesis

Formación de gametos masculinos, se desarrollan desde espermatogonias hasta espermatozoide (células diploides) donde solamente llevarán la mitad del material genético que contenían las espermatogonias. Contiene 3 etapas: la espermatogénesis que está controlada a nivel endocrino por la secreción de GnRH en el hipotálamo, después llega la etapa de la meiosis I donde el espermatozoide primario se convertirá en secundario dando paso a la meiosis II dando como resultado las primeras células haploides y la última etapa es la espermiogénesis donde las células son liberadas a los túbulos seminíferos (**Zarraga, 2021**).

1.2.7. Características del semen

Conformada por dos fracciones, la primera donde están los gametos masculinos (26%) y la segunda una fracción líquida o plasma seminal (74%) que contiene varias secreciones de las glándulas accesorias, próstata y vesículas seminales. La principal función del semen es transportar y depositar el espermatozoides dentro de la hembra **(Zarraga, 2021)**.

1.2.8. Plasma seminal

Dentro de su composición están péptidos, proteínas y demás compuestos nitrogenados, su principal función es transportar los espermatozoides desde los genitales del macho hasta el tracto reproductivo de la hembra, encargado de regular el pH y osmolaridad, mejorar la vitalidad y a su vez es un gran antioxidante que protege a los espermatozoides **(Parada, 2016)**.

Las principales moléculas que contiene son fructosa, inositol, sorbitol, fosfolípidos y proteínas, de donde se obtiene la energía para los espermatozoides. Las proteínas del PS juegan un papel muy importante debido a que se relacionan directamente con la fertilización y maduración del espermatozoide, interacción con el oviducto y ovocito **(Parada, 2016)**.

Debido a que su pH es neutro y posee agentes antimicrobianos, la adición de plasma seminal ayuda en shock térmico a evitar los daños en la membrana, durante la descongelación se ha comprobado que mejora la motilidad la integridad de la membrana **(Gómez, 2006)**. En las siguientes tablas se detalla la composición y propiedades químicas presentes en el semen y plasma seminal de ovinos:

Tabla 1
Composición Seminal

SEMEN	CANTIDAD
Células espermáticas (%)	33
Concentración espermática ($\times 10^6/\text{ml}$)	2 000 - 5 000
pH	5.9 – 7.3
Solidos totales (%)	14.8
Volumen (ml)	0.5 - 2

Fuente: Traducida de Chenoweth y Lorton (2014).

Tabla 2
Propiedades químicas del plasma seminal

PLASMA SEMINAL	CANTIDAD
Acetilglucosaminidasa (unidades/ml)	16 000
Ácido ascórbico (mg/100ml)	5
Ácido cítrico (mg/100ml)	137
Ácido glutámico (mg/100ml)	76
Bicarbonato (mmol/l)	7.1
Calcio (mmol/l)	1.9
Cloro (mmol/l)	18
Ergotioneina (mg/100ml)	Rastros
Fructosa (mg/100ml)	150-600
Glicerofosforilcolina (mg/100ml)	1 600 – 2 000
Inositol (mg/100 ml)	10-15
Magnesio (mmol/l)	2.4
Manosidasa (unidades/ml)	50
Potasio (mmol/l)	23
Sodio (mmol/l)	78
Sorbitol (mg/100ml)	26 - 120

Fuente: Traducida de Chenoweth y Lorton (2014)

1.2.9. Colecta de semen

Existen dos diferentes métodos la vagina artificial (VA) y el electroeyaculador (EE), el método más utilizado ha sido la vagina artificial debido al análisis de bienestar animal y por ser semejante a las condiciones naturales de una vagina (**Vargas, 2019**). Se producen varios estímulos como son el térmico y la presión que se insulfa, Sin embargo, después de varias colectas el volumen va disminuyendo por lo que se recomienda una colecta máxima de 3-5 al día con 2-3 días de descanso y es necesario entrenar a los carneros previamente (**Parada, 2016**).

1.2.10. Criopreservación de semen

Comprende una serie de procesos que incluyen el enfriamiento, congelamiento y por último el almacenamiento dentro de nitrógeno líquido a -196°C . La técnica más utilizada para criopreservación es la congelación lenta, proceso progresivo que dura entre 2 a 4 horas, responsable de provocar la cristalización y daño físico y químico de los espermatozoides. La otra técnica es la congelación rápida donde se somete a la pajilla a baños de nitrógeno durante 8 a 10 min y después se lo conserva en el tanque, igual que la anterior presenta problemas con el shock térmico disminuyendo la fertilidad (**Zarraga, 2021**).

- ***Diluyentes***

Contiene:

- **Antibióticos:** para contrarrestar las infecciones al inseminar a una hembra se agrega antibióticos a los diluyentes ya que existen muchos microorganismos entre ellas bacterias que compiten con los espermatozoides por los nutrientes (**Vargas, 2019**).
- **Proteínas:** se han utilizado con mayor frecuencia la yema de huevo y la leche descremada, sin embargo, para evitar contaminaciones de la muestra se ha comenzado a usar proteínas de origen vegetal como la lecitina de soya debido a que poseen algunas ventajas como su baja citotoxicidad e incremento de fosfolípidos (**Vargas, 2019**).
- **Azúcares:** con el fin de disminuir la cantidad de hielo que se forma en el interior de la célula se utilizan diferentes tipos de azúcares, los más usados han sido la lactosa, sucrosa, y diferentes dextranos (**Vargas, 2019**).
- **Crioprotectores:** moléculas que son las encargadas de proteger las estructuras celulares, se dividen en dos clases y esto lo determina el grado de permeabilidad.

Crioprotectores no penetrantes:

Recubren la membrana plasmática, sin permitir que el frío actúe dentro de la estructura. Los más utilizados son la glucosa, lactosa o fructosa (**Gómez, 2006**).

Crioprotectores penetrantes:

No permiten que se genere estrés osmótico mediante la formación de cristales de hielo intracelular, para esto penetran la célula. Los más utilizados son el DMSO, propileno-glicol, etanol, glicerol y etileno-glicol (**Gómez, 2006**).

- **Antioxidantes:** utilizados para mejorar la viabilidad y motilidad de espermatozoides debido a que previene la peroxidación lipídica de las

membranas provocadas por flotamiento de radicales peroxilo y alcoxilo **(Bintara et al., 2022)**. Existen dos tipos de antioxidantes, los primeros son los preventivos que comienzan a actuar al inicio para reducir o eliminar por completo la oxirreducción entre ellos encontramos la catalasa y peroxidasa. Por otro lado tenemos a los antioxidantes secundarios y su forma de actuar es bloqueando una etapa de cadena de oxidación entre ellos encontramos a la vitamina E y C **(Gómez, 2006)**.

Vitamina E

Es lipofílica es decir que tiene la capacidad de atraer grasas y aceites, también conocida como α tocoferol es un antioxidante primario que participa en la peroxidación de lípidos evitando la agresión de dichos peróxidos sobre los ácidos insaturados de los lípidos de la membrana **(Gómez, 2006)**.

1.3.Objetivos

- **Objetivo General**

- Evaluar el efecto del plasma seminal y vitamina E sobre el proceso de crioconservación y calidad post descongelado de semen ovino.

- **Objetivos Específicos**

- Adicionar 25% de vitamina E y 50% de plasma seminal en un diluyente comercial para la crioconservación de semen ovino.
- Evaluar la calidad de semen ovino a las 0 y 2 horas post descongelado mediante técnicas convencionales (morfología, concentración, movilidad individual).
- Estudiar la resistencia osmótica e integridad del acrosoma de los espermatozoides de semen ovino a las 0 y 2 horas post descongelado.

1.4.Hipótesis

Ha: La incorporación de plasma seminal y vitamina E en el proceso de criopreservación mejora la calidad de semen ovino post descongelado.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La presente investigación se realizó en la Granja Experimental Docente de Querochaca, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato en el cantón Cevallos perteneciente a la provincia de Tungurahua. Sus coordenadas geográficas son 01°22'02" de latitud Sur y 78°36'20" de latitud Oeste.

2.2. Características del lugar

Tabla 3
Características metereológicas

Parámetros	Valor
Temperatura, °C.	14
Precipitación, mm/mes.	27.17
Altitud, msnm.	2865
Humedad, %.	70.7

Fuente: (GADCevallos, 2011)

2.3. Materiales

- Materiales de campo
 - Overol
 - Botas
 - Mascarillas
 - Guantes de examinación
 - Corrales (Bebederos, comederos)

- Material Biológico
 - 3 ejemplares machos
 - 1 ejemplar hembra
 - Alimento (Alfalfa)
 - Vitamina E

- Material no Biológico
 - Microscopio
 - Porta objetos
 - Cubre objetos
 - Espermiométrico
 - Microcentrífuga
 - Baño María
 - Termo de nitrógeno
 - Plancha térmica con agitador
 - Micropipetas de 10-1000 μ l
 - Agua bidestilada
 - Nitrógeno líquido
 - Vagina artificial
 - Tubos de recolección de semen (Criotubos)
 - Papel absorbente
 - Gradilla plástica pequeña
 - Gradilla de metal
 - Probeta
 - Vasos de precipitación
 - Imanes
 - Micropuntas de micropipeta
 - Jeringas
 - Papel aluminio

- Pajuelas de 0.5ml
- Esferas selladoras para pajuelas de 0.5ml

- Material de escritorio
 - Libreta de apuntes
 - Esferográfico
 - Laptop
 - Impresora
 - Resma de hojas de papel bond 75gr A4
 - Calculadora
 - Marcador de CD
 - Tijeras

- Reactivos
 - Diluyente comercial
 - Tinción eosina
 - Tinción nigrosina
 - Solución hiposmótica (fructosa y citrato de sodio)
 - Buffer fosfato salino

2.4. Diseño experimental

Se trabajó con 3 machos para obtener las muestras seminales. Cada muestra seminal o eyaculado se consideró como una unidad experimental. Las extracciones de muestras seminales se realizaron por semana y cada semana se consideró una repetición. La investigación se ejecutó bajo un diseño Completo al Azar con 7 repeticiones por

tratamiento. Se evaluaron 3 tratamientos (T0: Diluyente comercial, T1: Vitamina E, T2: Plasma seminal + Vitamina E).

Para la tabulación, todos los datos se sometieron a una ADEVA para identificar si al menos un tratamiento fue diferente a los demás. Para la comparación de medias se utilizó la prueba estadística de Tukey con un nivel de significancia del 95% utilizando el programa estadístico Infostat®.

2.5. Métodos

Adaptación de los animales

- *Ubicación en jaulas*

Se colocó a cada animal en jaulas individuales equipadas con comederos y bebederos, los animales fueron alimentados con alfalfa dos veces al día (6am-15:00pm) y suplementados con sales minerales. También se les esquiló completamente para evitar contaminación en las muestras, se les desparasitó y por último se los sometió a un entrenamiento previo.

- *Extracción del semen*

La recolección se realizó con la ayuda de una vagina artificial para ovinos que está elaborada con una camisa interna de látex, cuerpo de la vagina que poseen válvulas que nos sirven para el ingreso de agua caliente (42°C) y para el ingreso de aire con la finalidad de tener presión y facilitar la extracción de semen, un cono recolector de látex y por último se le colocó un criotubo para recolectar la muestra (**Vargas, 2019**).

Para la investigación se realizaron 3 extracciones por semana (lunes, miércoles y viernes) con 4 días de descanso (martes, jueves, sábado y domingo). Las muestras seminales se utilizaron aleatoriamente con los tratamientos: T0: diluyente comercial, T1: vitamina E, T2: vitamina E + plasma seminal.

Evaluación de la calidad seminal (técnicas convencionales)

Es muy importante evitar cambios bruscos de temperatura para evitar un shock térmico, adicional evitar la contaminación con agua e impurezas del ambiente (**Chango, 2023**). Por lo que se trasladó lo más pronto posible al laboratorio y los criotubos se colocaron dentro del baño María a 37°C, en este caso se evaluó las muestras seminales por separado.

○ **Evaluación macroscópica:**

Volumen: Para su medición se observó directamente el envase, debido a que el promedio de eyaculación de un ovino tiene un rango de 0.75 a 2 ml (**Parada, 2016**).

Translucidez: Se evaluó bajo los siguientes criterios: Opaco (1), Poco traslucido (2) y transparente (3) (**Chango, 2023**).

Color: Se evaluaron bajo los siguientes criterios: Blanco lechoso (1), Blanco cremoso (2), Amarillento (3), Rojizo chocolate (4). Si el color es rojizo indica presencia de sangre, colores grises o marrones indican contaminación o infección (**Parada, 2016**).

- **Evaluación microscópica**

Concentración: Se utilizó como instrumento un espermiométrico con factor de dilución de 0.1/10, con ayuda de una probeta se aforó 10ml de agua bidestilada, se usó una micropipeta para retirar 100µl de agua bidestilada, se vertió en el espermiométrico y se procedió a tomar 100 µl de muestra seminal para incorporar ambas y observarlas en un fondo blanco.

Movilidad Masal: Con la ayuda de una micropipeta se tomó 5µl de muestra seminal y se colocó en un portaobjetos que se encuentre temperado a 35°C con la ayuda de una plancha térmica. Se contó en el microscopio 100 espermatozoides con ayuda del lente de 4x.

Si se observa ondas de movimientos rápidas corresponde a 90%, es decir, muy bueno, ondas y remolinos no tan rápidos (70-80%), ondas con movimientos lentos (50-60%), sin ondas pero hay existencia de movimientos espermáticos (20-40%), muy pobre si hay nulos signos de vitalidad 10% y 0% sin movimiento es decir muertos (**Evans & Maxwell, 1952**)

Movilidad Individual: Se realizó el mismo proceso que para contabilizar la movilidad masal, sin embargo, en este caso se utilizó el lente 40x y 100x junto con el aceite de inmersión. Se evaluó tomando en cuenta el siguiente rango, no se mueven (0), se mueven en un solo lugar (1), se trasladan lentamente con pausas (2), se puede seguirlos con la vista (3), es difícil seguirlos con la mirada (4), no se puede seguir su trayectoria (5) (**Arias, 2020**).

Morfología: Se tomó 5µl equivalente a una pequeña gota de muestra seminal a la que se le incorporó una gota de Eosina con ayuda de una jeringa de insulina (1ml), seguido de eso se realizó un frotis y con ayuda del microscopio se contó 100 espermatozoides, donde

se observó anomalías en cabeza y cola de cada espermatozoide. Pueden ser provocadas por estrés, temperatura y según la estación del año (**Parada, 2016**).

Vitalidad: Se realizó el mismo proceso para la evaluación de morfología y se observó en el microscopio la presencia de espermatozoides muertos o vivos. Los espermatozoides muertos se mostraron teñidos.

Dilución y congelación del semen

○ **Cálculo de pajuelas**

Posterior a la evaluación de calidad de semen fresco, se realizó un pool de semen heteroespérmico y se procedió con los siguientes cálculos.

Se calculó el número de pajuelas que se van a obtener para lo cual se utilizó la siguiente fórmula.

$$N = \frac{\text{Vol (ml)} * \text{concentración} \left(\frac{\text{millones}}{\text{ml}} \right) * \% \text{movilidad} * \% \text{morfología}}{\text{concentración (400 millones)}}$$

Se procedió a calcular el volumen total del diluyente, se consiguió multiplicando el # de pajuelas por 0.5 equivalente al ml total de las pajuelas (**Arias, 2020**).

○ **Diluyente Comercial**

Diluyente comercial tiene varias características, entre ellas que no existen componentes de origen animal a comparación de otros diluyentes comerciales. Actúa de manera favorable contra los efectos que provocan las bacterias, hormonas o residuos en general y también gracias a su transparencia entrega imágenes muy claras bajo el microscopio. Contiene antibióticos como la tilosina, gentamicina, espectromicina, lincomicina y otros compuestos como fosfolípidos TRIS, ácido cítrico, antioxidantes, etc (Galarza, 2013).

Tabla 4
Composición química del diluyente comercial

DILUYENTE COMERCIAL
Fosfolípidos
TRIS
Ácido cítrico
Glucosa
Antioxidantes
EDTA
Glicerina
Agua de alta pureza
Tilosina
Gentamicina
Lincomicina
Espectromicina

Fuente: (Viquez, 2020)

Para la preparación del diluyente se realizó los siguientes cálculos. Para el tratamiento 0 se utilizó, 80% agua bidestilada, 20% de diluyente comercial, para el tratamiento 1 se utilizó, 25% vitamina E, 75% agua bidestilada, 20% de diluyente comercial y por último para el tercer tratamiento se utilizó, 25%

vitamina E, 50% plasma seminal, 25% agua bidestilada y 20 % de diluyente comercial. Para cada uno se incorporó los ingredientes con ayuda de un imán y la plancha agitadora hasta que se consiguió una mezcla homogénea. Se dejó reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente y se cubrió con papel aluminio con la finalidad de evitar contaminación. El siguiente paso es el envasado de pajuelas para lo cual se utilizó las micropipetas en 500 μ l, se designaron diferentes colores de pajuelas para cada tratamiento (T0: transparente, T1: amarillo, T2: verde) con mucho cuidado se envasó y se colocó una bolita de aluminio para sellarla también se las rotuló para identificarlas. Después de este proceso se refrigeró -4°C durante 4 horas con mucho cuidado para evitar cambios bruscos de temperatura.

- **Plasma Seminal**

Los días que se realizó el tratamiento 2, se extrajo el semen y se trasladó al laboratorio para su posterior centrifugación a 4.800 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 minutos, posterior a eso con ayuda de una micropipeta de plástico se procedió a retirar el plasma y se colocó en un tubo eppendorf y se sumergió en baño María a 37°C .

- **Congelación**

Se procedió a brindar baños de nitrógeno líquido en donde se utilizó un cooler pequeño, una gradilla de metal, que tiene delimitados dos niveles, uno 4cm de la base del cooler y el otro a 2cm durante 8 y 4 minutos respectivamente. Luego con ayuda de una pinza anatómica se colocaron las pajuelas dentro de las canastillas del termo de nitrógeno previamente identificadas, es importante revisar la cantidad de nitrógeno cada congelación con ayuda de su regla. Se recuerda que la descongelación se realizó pasadas las 24 horas a excepción de

las muestras recolectadas el viernes, esas se descongelaron el lunes de la siguiente semana.

- **Descongelación**

Se mantuvo el tanque de nitrógeno cerca del baño María, con ayuda de una pinza sacamos una por una cada pajuela y se las sumergió a 37°C durante 15 segundos, se procedió a secar con papel absorbente, se cortó un extremo, se ingresó el extremo abierto en un tubo eppendorf, se cortó el otro extremo y se vació todo el contenido, por último, se sumergió el tubo eppendorf dentro del baño María se evaluó a las 0 y 2 horas.

Se evaluó todos los parámetros microscópicos como son concentración, morfología, vitalidad y movilidad individual para lo que se utilizó los mismo pasos que para el análisis de semen fresco. Con la única diferencia de que para el análisis de concentración se cambió el factor de dilución en el espermiodensímetro (0.4/10).

Estudio de la resistencia osmótica e integridad del acrosoma

- **HOST (Hypoosmotic Swelling test)**

Se preparó 50 ml de solución hiposmótica para lo cual se utilizó 450g de fructosa y 245g de citrato trisódico y 50 ml de agua bidestilada. Para la evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática se colocó 200µl de solución hiposmótica y 100µl de muestra seminal tomada de una pajuela, se incubó durante 30 minutos en baño María a 37°C. Luego se colocó 5 µl de muestra en un portaobjetos previamente temperado a 35°C y se

procedió a contar las colas enrolladas que significa mejor calidad de semen, mientras que los que no reaccionan significa que tiene una membrana funcionalmente dañada (**Arias, 2020**).

- **Integridad del acrosoma**

Se preparó 50ml de solución de glutaraldehído al 0.2% diluido en buffer fosfato salino. Para la evaluación de integridad del acrosoma se tomó 5 μ l de muestra seminal, se colocó en un portaobjeto templado a 35°C en la plancha térmica, se colocó 5 μ l de la solución, se incorporó, se colocó 1 μ l de nigrosina, 1 μ l de eosina, se mezcló bien y se realizó un frotis. Se contabilizaron 100 espermatozoides en el cual se observa que están vivos los que presentan una coloración rosada en la parte de la membrana acrosoma y un tono azulado en la base, mientras que los muertos tuvieron un solo color (**Arias, 2020**)

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Análisis semen fresco

Tabla 5

Análisis de semen fresco de ovinos criollos

Variables	Tratamientos			E.E	p - Valor
	T0	T1	T2		
Volumen, (ml)	1	1	1	-	-
Concentración, (spz $\times 10^6$)	9,60	9,67	9,68	0,03	0,1883
Movilidad masal, (%)	84,29	88,57	87,14	3,56	0,6925
Vitalidad, (%)	91,43	93,43	93,14	2,11	0,7722
Morfología, (%)	90,57	92,14	89,71	1,34	0,4456

E.E: Error estándar de la media. T0: tratamiento control. T1: tratamiento con vitamina E. T2: tratamiento con plasma seminal + vitamina E. (-) sin datos

El análisis macroscópico de la calidad del semen fresco incluyó la observación del color, volumen y translucidez, dichas pruebas se realizaron después de la recolección, para su correcta evaluación se utilizaron las escalas previamente mencionadas en la metodología.

Durante la investigación las muestras presentaron un color blanco lechoso que en la escala corresponde a una valoración de 1, representando ser una muestra seminal ideal. Es

importante recordar que la valoración 1 (blanco lechoso) y 2 (blanco cremoso) son las adecuadas (**Parada, 2016**).

Todas las muestras seminales tuvieron el mejor valor en cuanto a translucidez que corresponde a opaco (1), demostrando así que existe una buena concentración y la muestra es viable (**Chango, 2023**).

Con respecto a los parámetros que se evalúan microscópicamente como son movilidad, vitalidad y morfología no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en la muestra de semen fresco (tabla 1).

3.1.2. Análisis de semen heteroespérmico postdescongelado

Tabla 6

Evaluación de los parámetros de calidad seminal postdescongelado a las 0 y 2 horas

Variables	Horas	Tratamientos			E.E	p-Valor	Contrastes	
		T0	T1	T2			T0 vs T1 &T2	T1 vs T2
Concentración, (spzx10 ⁶)	0	9,01 ^A	9,00 ^A	9,02 ^A	0,03	0,8960	0,9544	0,6464
	2	9,00 ^A	9,00 ^A	9,01 ^A	0,03	0,9275	0,8264	0,7534
Movilidad individual, (%)	0	55,71 ^A	65,71 ^A	70,00 ^A	3,98	0,0560	0,0226	0,4559
	2	45,71 ^B	55,00 ^{AB}	61,43^A	3,84	0,0311	0,0160	0,2518
Vitalidad, (%)	0	70,57 ^A	78,00 ^A	82,29 ^A	3,43	0,0760	0,0352	0,3887
	2	57,57 ^A	69,00 ^A	68,29 ^A	3,98	0,1026	0,0355	0,9004
Morfología, (%)	0	79,43 ^A	81,29 ^A	83,43 ^A	1,99	0,3819	0,2441	0,4553
	2	77,00 ^A	75,57 ^A	80,43 ^A	2,59	0,4140	0,7565	0,2020
HOST, (%)	0	36,14 ^B	33,43 ^B	41,29^A	1,25	0,0011	0,4393	0,0003
	2	26,29 ^B	26,29 ^B	34,14^A	1,13	0,0001	0,0107	0,0001
Integridad del acrosoma, (%)	0	53,14 ^A	58,00 ^A	55,43 ^A	2,15	0,3041	0,1925	0,4097
	2	42,00 ^B	49,71^A	47,14 ^{AB}	2,12	0,0546	0,0235	0,4023

^{a-b} las medias con letras iguales no tienen una diferencia significativa, es decir p es mayor a 0.05. E.E: Error estándar de la media. T0: tratamiento control. T1: tratamiento con vitamina E. T2: tratamiento con plasma seminal + vitamina E. HOST (Hypoosmotic Swelling test) Prueba de hinchazón hipoosmótica.

En cuanto a la variable concentración, todos los valores fueron similares entre los 3 tratamientos tanto a las 0 horas y las 2 horas, mientras que en los parámetros de vitalidad y morfología del semen post descongelado no se reportaron cambios significativos ($p > 0,05$) a las 0 horas y 2 horas.

Respecto a la variable movilidad individual, el tratamiento con plasma seminal (50%) + vitamina E (25%) T2 a las 2h presentó una diferencia significativa ($p = 0,0311$) y un valor para esta variable del 61.43%, mientras que el tratamiento con vitamina E (20%) T1: 55,00% y por último el tratamiento control T0: 45.71%, este comportamiento probablemente se debe a que fisiológicamente el plasma tiene la función de ser un medio de transporte de los espermatozoides hasta el tracto reproductivo de la hembra, además de presentar dentro de su composición proteínas que proporcionan energía para los espermatozoides (**Parada, 2016**), resultados similares a los obtenidos por (**Restrepo et al., 2019**), que agregó 20% de PS. Sin embargo, (**Restrepo et al., 2019**) también detalla que al agregar PS al 20% no generó ningún efecto sobre la integridad funcional de la membrana plasmática, lo cual difiere con los resultados obtenidos en la presente investigación donde se añadió 50% de plasma seminal y existió una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la prueba HOST en el tratamiento que incluye plasma seminal + vitamina E (T2) a las 0 y 2 horas post descongelado, donde T0: 36,14%, T1: 33,43% y T2: 41,29%, siendo T2 el tratamiento con mejores resultados debido a que el plasma seminal posee grandes agentes antimicrobianos con sistemas enzimáticos y no enzimáticos que evitan la producción excesiva de ROS (Especies reactivas de oxígeno) causante principal de originar daño en la membrana plasmática (**Berríos et al., 2010**), este comportamiento se mantiene pasadas las 2 horas donde los resultados fueron, T0: 26,29%, T1: 26,29% y T2: 34,14%, por lo que se puede manifestar que mientras mayor porcentaje de plasma se agrega mejores resultados se obtienen, sin embargo, se recomiendan más estudios para conocer el porcentaje máximo de adición de plasma seminal.

Los resultados obtenidos al adicionar vitamina E no son concluyentes debido a que en varias investigaciones se mencionan que no existen resultados favorables al incorporar solo vitamina E o acompañado de otra sustancia (vitamina C, quercetina, selenio, etc.), sin embargo, en la presente investigación el añadir vitamina E combinado con plasma seminal mejoró significativamente la integridad de la membrana, esta reacción ocurre debido a que durante el proceso de descongelación se provoca un estrés oxidativo, el contenido de la vitamina E no es suficiente para contrarrestarlo por lo que el aporte que generan los componentes del plasma seminal (enzima superóxido dismutasa, catalasa, etc.) incrementan el efecto protector y evitan la criocapacitación prematura asemejándose a los resultados de la investigación de **(Choudhary et al., 2016)**.

En cuanto a la variable integridad del acrosoma el tratamiento con resultados que presentó una diferencia significativa ($p < 0,05$) fue T1 (Tratamiento con Vit E) con 49,71% mientras que 47,14% en T2 (Tratamiento con Vit E + plasma seminal) y 42,00% en T0 (Tratamiento con diluyente comercial), podemos sugerir que esta reacción se debe a que la vitamina E tiene la capacidad de disminuir el grado de peroxidación lipídica asociada a ROS, principal causante de la disminución de la integridad del acrosoma **(Membrillo et al., 2003)**. Por otro lado, **(Jiménez et al., 2021)**, reporta que la vitamina E no tuvo efectos favorables, explica que se debe a que la vitamina E tiene una respuesta distinta en reacción al azúcar y amortiguadores que se utilizan en los diluyentes comerciales. En la presente investigación se utilizó un diluyente comercial que contiene glucosa como azúcar y como amortiguador principal el TRIS (tris (hidroximetil) aminometano).

Por otro lado, en los contrastes que se observan en la Tabla 5, la comparación del T0 (Control) vs T1 (Vit E) y T2 (Vit E + PS) reporta resultados más bajos en cuanto a movilidad individual, evidenciando valores $p=0,0226$ y $p=0,0160$ a las 0 horas y 2 horas respectivamente, en la misma comparación también se evidencia los valores más bajos en la variable vitalidad, correspondiente a $p= 0,0352$ a las 0 horas, comportamiento que se mantiene a las 2 horas $p=0,0355$.

En cuanto a la variable HOST se observan los valores más bajos en la comparación del T1 (Vit E) vs T2 (Vit E + PS) con valores correspondientes a $p=0,0003$ a las 0 horas, se mantiene este comportamiento a favor de la segunda comparación a las 2 horas ($p=0,0001$), mientras que en la variable integridad del acrosoma a las 2 horas se reportan valores menores de significancia estadística ($p=0,0235$) en la comparación T0 (Control) vs T1 (Vit E) y T2 (Vit E + PS) a diferencia del otro contraste.

Numéricamente se muestra un comportamiento de disminución en los porcentajes de las variables HOST e integridad del acrosoma con el paso del tiempo posterior a la descongelación, es un comportamiento esperado debido al shock térmico y la presión osmótica que se genera en el proceso de descongelamiento, este comportamiento afecta la morfología de las células, alterando la permeabilidad y composición lipídica de las membranas (**Cabrera & Pantoja, 2008**). Para que el semen se considere fértil, el porcentaje que debería existir de espermatozoides que tienen reacción a la prueba HOST deben ser valores superiores al 40%. Por otra parte los espermatozoides que presentan su acrosoma intacto a las 0 horas debe ser por lo menos 50% mientras que a las 2 horas post descongelado debe manifestar por lo menos 35%, valores reportados por (**Arias, 2020**).

El semen ovino es la especie que mejor respuesta reporta frente al proceso de criopreservación, con una fertilidad del 25-45 % en ovejas inseminadas (**Cabrera et al., 2008**), mientras que los espermatozoides porcinos poseen mayor sensibilidad y menor viabilidad de semen descongelado (4 horas), lo que provoca bajos índices de preñez y escaso tamaño de camadas. Las reacciones que traen estas consecuencias son provocadas tanto en el proceso de congelamiento y descongelamiento donde se manifiestan un cambio en la concentración y distribución de la glucosa (GLUT-3) (**Pérez et al., 2010**).

3.2. Verificación de hipótesis

De acuerdo con los resultados obtenidos en este proyecto investigativo se acepta la hipótesis alternativa; debido a que el plasma seminal y la Vitamina E adicionados a un diluyente comercial como antioxidantes para la crio preservación de semen ovino, tuvo un impacto positivo en la calidad seminal post descongelado.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se concluye que el efecto de la vitamina E al 25% y plasma seminal al 50% mejoran la calidad del semen ovino post descongelado en el proceso de criopreservación.
- La incorporación de vitamina E + plasma seminal mejora la movilidad individual a las 2 horas, en comparación con el resto de los tratamientos.
- La vitamina E + plasma seminal incrementa la cantidad de espermatozoides que reaccionan a la prueba de HOST (Hypoosmotic Swelling test) a las 0 y 2 horas post descongelado, por otro lado, al agregar vitamina E mejora la integridad del acrosoma de los espermatozoides a las 2 horas.

4.2. Recomendaciones

- Trasladar la muestra seminal en el cono de recolección perteneciente a la vagina artificial, eso evitará la muerte de los espermatozoides por shock térmico.
- Implementar tratamientos con plasma seminal para conocer los niveles máximos de inclusión.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Arias, A. (2020). Efecto de la GnRH sintética sobre la calidad del semen criopreservado diluido con dos productos comerciales, de carneros criollos alimentados con Medicago sativa contaminada. *File:///C:/Users/VERA/Downloads/ASKEP_AGREGAT_ANAK_and_REMAJA_PRI NT.Docx*, 21(1), 1–9.
- Barrera, C. M. B. (2020). *Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino : leche entera y agua de coco*. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/7955>
- Berrios, O., Valdebenito, I., Treulén, F., & Ubilla, A. (2010). Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y potencial de membrana mitocondrial. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3), 179–186. <https://doi.org/10.4067/s0301-732x2010000300009>
- Bintara, S., Ismaya, I., Widayati, D. T., Aji, R. N., & Asmarawati, W. (2022). The effect of vitamin e antioxidant addition in goat milk diluent on the quality of thin-tailed sheep semen. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1001(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1001/1/012012>
- Cabrera, P., Ayulo, A., & Pantoja, C. (2008). Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Crops*, 14, 131–139.
- Cabrera, P., & Pantoja, C. (2008). Influencia De Los Dilutores Tris Y Ovine Freezing Sobre La Integridad De La Membrana Citoplasmática Durante La Congelación De Semen De Ovinos En Pajillas De 0.5 Ml L Straws. *Rev Inv Vet Perú*, 19(2), 152–159.
- Cardozo, J. A., Grasa, P., Muriño, M. T., & Cebrián, J. Á. (2009). Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 10(1), 51–59.

https://doi.org/10.21930/rcta.vol10_num1_art:128

Chango, M. (2023). Evaluación del efecto del jugo de tuna (*Opuntia ficus-indica* L. mill) y vitamina E sobre los parámetros de calidad seminal en la crio preservación de semen ovino. *Nucl. Phys.*, 13(1), 104–116.

Chenoweth, P. y Lorton, S. (2014). *Animal andrology: Theories and applications*. CABI.

Choudhary, K. K., Kavya, K. M., Jerome, A., & Sharma, R. K. (2016). Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary World*, 9(4), 388–395. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.388-395>

Domínguez, A., Navarrete, L., Cruz, A., Aguiar, A., Erosa, S., Bolio, R., González, E., Paredes, L., & Ramón, J. (2007). Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad Del Zulia*, 17(1), 73–76.

Evans, G., & Maxwell, W. (1952). *Inseminación artificial de ovinos y caprinos por salamonés*. https://www.editorialacribia.com/libro/inseminacion-artificial-de-ovejas-y-cabras_54341/

GAD Cevallos. (2011). Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del cantón Cevallos. Obtenido de <https://cevallos.gob.ec/index.php/municipio/informacionmunicipal/base-legal/category/170-plan-de-ordenamiento-y-desarrolloterritorial-pdot?download=609:pd-y-ot-cevallos>

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*. August, 93. https://www.researchgate.net/publication/306012290_Eficacia_de_dos_diluyentes_TRIS_Lecitina_de_soya_AndroMedR_y_Tris_yema_de_huevo_Triladyl_R_en_la_crioconservacion_de_semen_de_toro_de_la_raza_Jersey_en_Cuenca_-_Ecuador#fullTextFileContent

- García, W. (2014). *Optimización de los protocolos de crioconservación de semen ovino de las razas autóctonas en peligro de extinción xisqueta y aranesa*. 315.
- Gómez, I. (2006). *Evaluación de semen ovino post-congelación utilizando como aditivos antioxidantes*. <https://ri-ng.uaq.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/6144/RI003234.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jiménez, E., Quezada, A., Prieto, M., Orozco, E., Itzá, M., & Carrera, J. (2021). *Evaluación de la adición de quercetina y vitamina E al medio de criopreservación de semen ovino sobre la fertilidad in vivo Evaluation of the addition of quercetin and vitamin E to the cryopreservation medium of ram semen on in vivo fertility INTRODUCCIÓN*. 1–14.
- Ledesma, A., Manes, J., Alberio, R., & Hozbor, F. (2013). ¿Es Posible Mejorar La Fertilidad Del Semen Ovino Criopreservado Mediante La Adición De Plasma Seminal? *Taurus*, 59(January 2015), 16–21.
- Membrillo, A., Córdova, A., Hicks, J., Olivares, I., Martínez, V., & Valencia, J. (2003). *Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. una revisión*.
- Parada, R. (2016). *Tratamiento posdescongelado del semen de carnero. Efecto de diferentes fracciones del plasma seminal sobre la cinética espermática*. 1–23.
- Pazmiño, F., & Rubio, D. (2012). Diagnóstico de producción y comercialización de carne ovina en los principales centros de distribución de las provincias de Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo. *Escuela Politécnica Del Ejercito*, 168. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7210/1/27T0369.pdf>
- Pérez, M., Petrinelli, A., Rodríguez, P., Satorre, M., & Breininger, E. (2010). *Comparación de dos métodos de criopreservación de semen porcino. Efectos sobre la calidad seminal*. 4834(3400).
- Quishpi, J. (2015). *Situación actual de la producción ovina en el Ecuador*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/16261/1/17T01676.pdf>

- Restrepo, G. ., Pizarro, E. ., & Rojano, B. (2019). Aporte antioxidante del plasma seminal y su efecto sobre la calidad del semen equino congelado Antioxidant contribution of seminal plasma and its effect on the quality of frozen equine semen. *Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 30(1), 276–287. <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v30i1.15699%0AAporte>
- Vargas, X. (2019). *Evaluación del efecto de plasma seminal hetero específico (bovino a ovino) sobre la congelabilidad de semen de carnero*. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/1891/1/RI004954.pdf>
- Víquez, L. (2020). *Evaluación de la calidad seminal en bovinos (bos indicus) y la estructura subpoblacional del eyaculado mediante un sistema casa-Mot*. 1–94.
- Zarraga, A. (2021). *Efecto del uso conjunto de plasma seminal bovino y extracto antioxidante de nopal como aditivo para la congelación de espermatozoides ovinos* (p. 116). [https://ri-ng.uaq.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/3139/CNMAC-290948-1021-122-Ana Laura Zárraga González -A.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://ri-ng.uaq.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/3139/CNMAC-290948-1021-122-Ana%20Laura%20Z%C3%A1rraga%20Gonz%C3%A1lez%20-A.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

ANEXOS

GRÁFICOS DE SEMEN EN FRESCO

Concentración

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LOG10 F Co	21	0.17	0.08	0.88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	2	0.01	1.83	0.1883
Tt	0.03	2	0.01	1.83	0.1883
Error	0.13	18	0.01		
Total	0.15	20			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.11534

Error: 0.0071 gl: 18

Tt Medias n E.E.

T2	9.68	7	0.03	A
T1	9.67	7	0.03	A
T0	9.60	7	0.03	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Movilidad

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FmovM	21	0.04	0.00	10.88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	66.67	2	33.33	0.38	0.6925
Tt	66.67	2	33.33	0.38	0.6925
Error	1600.00	18	88.89		
Total	1666.67	20			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=12.86169

Error: 88.8889 gl: 18

Tt Medias n E.E.

T1	88.57	7	3.56	A
T2	87.14	7	3.56	A
T0	84.29	7	3.56	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Vitalidad

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Fvi	21	0.03	0.00	6.03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	16.38	2	8.19	0.26	0.7722
Tt	16.38	2	8.19	0.26	0.7722
Error	562.29	18	31.24		
Total	578.67	20			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=7.62459

Error: 31.2381 gl: 18

Tt Medias n E.E.

T1 93.43 7 2.11 A

T2 93.14 7 2.11 A

T0 91.43 7 2.11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Morfología

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Fmorf	21	0.09	0.00	3.90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	21.24	2	10.62	0.85	0.4456
Tt	21.24	2	10.62	0.85	0.4456
Error	226.00	18	12.56		
Total	247.24	20			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.83384

Error: 12.5556 gl: 18

Tt Medias n E.E.

T1 92.14 7 1.34 A

T0 90.57 7 1.34 A

T2 89.71 7 1.34 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

GRÁFICOS DE SEMEN POSTDESCONGELADO

Concentraciones 0 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LOG10 OCo	21	0.01	0.00	0.99

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.7E-03	2	8.7E-04	0.11	0.8960
Tt	1.7E-03	2	8.7E-04	0.11	0.8960
Error	0.14	18	0.01		
Total	0.14	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
T0 VS T1,T2		4.8E-03	0.08	2.7E-05	1	2.7E-05	3.4E-03	0.9544
T1 VS T2		0.02	0.05	1.7E-03	1	1.7E-03	0.22	0.6464
Total				1.7E-03	2	8.7E-04	0.11	0.8960

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.12110

Error: 0.0079 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T2	9.02	7	0.03 A
T0	9.01	7	0.03 A
T1	9.00	7	0.03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Concentración 2 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
LOG10 2Co	21	0.01	0.00	0.90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9.9E-04	2	4.9E-04	0.08	0.9275
Tt	9.9E-04	2	4.9E-04	0.08	0.9275
Error	0.12	18	0.01		
Total	0.12	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
T0 VS T1,T2		0.02 0.07	3.2E-04	1	3.2E-04	0.05	0.8264
T1 VS T2		0.01 0.04	6.6E-04	1	6.6E-04	0.10	0.7534
Total			9.9E-04	2	4.9E-04	0.08	0.9275

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.11021

Error: 0.0065 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T2	9.01	7	0.03 A
T1	9.00	7	0.03 A
T0	9.00	7	0.03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Movilidad 0 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
OMovM	21	0.27	0.19	16.49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	752.38	2	376.19	3.40	0.0560
Tt	752.38	2	376.19	3.40	0.0560
Error	1992.86	18	110.71		
Total	2745.24	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
T0 VS T1,T2		24.29 9.74	688.10	1	688.10	6.22	0.0226
T1 VS T2		4.29 5.62	64.29	1	64.29	0.58	0.4559
Total			752.38	2	376.19	3.40	0.0560

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=14.35411

Error: 110.7143 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T2	70.00	7	3.98 A
T1	65.71	7	3.98 A
T0	55.71	7	3.98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Movilidad 2 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2MovM	21	0.32	0.24	18.79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	873.81	2	436.90	4.23	0.0311
Tt	873.81	2	436.90	4.23	0.0311
Error	1857.14	18	103.17		
Total	2730.95	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
T0 VS T1,T2		25.00	9.40	729.17	1	729.17	7.07	0.0160
T1 VS T2		6.43	5.43	144.64	1	144.64	1.40	0.2518
Total				873.81	2	436.90	4.23	0.0311

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=13.85673

Error: 103.1746 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.	
T2	61.43	7	3.84	A
T1	55.00	7	3.84	A B
T0	45.71	7	3.84	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Vitalidad 0 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
OVi	21	0.25	0.17	11.80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	491.81	2	245.90	2.98	0.0760
Tt	491.81	2	245.90	2.98	0.0760
Error	1483.14	18	82.40		
Total	1974.95	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
T0 VS T1,T2		19.14 8.40	427.52	1	427.52	5.19	0.0352
T1 VS T2		4.29 4.85	64.29	1	64.29	0.78	0.3887
Total			491.81	2	245.90	2.98	0.0760

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=12.38311

Error: 82.3968 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T2	82.29	7	3.43 A
T1	78.00	7	3.43 A
T0	70.57	7	3.43 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Vitalidad 2 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2Vi	21	0.22	0.14	16.20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	573.81	2	286.90	2.59	0.1026
Tt	573.81	2	286.90	2.59	0.1026
Error	1993.14	18	110.73		
Total	2566.95	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
T0 VS T1,T2		22.14 9.74	572.02	1	572.02	5.17	0.0355
T1 VS T2		-0.71 5.62	1.79	1	1.79	0.02	0.9004
Total			573.81	2	286.90	2.59	0.1026

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.35514

Error: 110.7302 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T1	69.00	7	3.98 A
T2	68.29	7	3.98 A
T0	57.57	7	3.98 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Morfología 0 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
OMorf	21	0.10	1.6E-03	6.46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	56.10	2	28.05	1.02	0.3819
Tt	56.10	2	28.05	1.02	0.3819
Error	496.86	18	27.60		
Total	552.95	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
T0 VS T1,T2		5.86	4.86	40.02	1	40.02	1.45	0.2441
T1 VS T2		2.14	2.81	16.07	1	16.07	0.58	0.4553
Total				56.10	2	28.05	1.02	0.3819

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=7.16727

Error: 27.6032 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T2	83.43	7	1.99 A
T1	81.29	7	1.99 A
T0	79.43	7	1.99 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Morfología 2 horas

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2Morf	21	0.09	0.00	8.83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	87.24	2	43.62	0.93	0.4140
Tt	87.24	2	43.62	0.93	0.4140
Error	847.43	18	47.08		
Total	934.67	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
T0 VS T1,T2		2.00	6.35	4.67	1	4.67	0.10	0.7565
T1 VS T2		4.86	3.67	82.57	1	82.57	1.75	0.2020
Total				87.24	2	43.62	0.93	0.4140

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=9.36030

Error: 47.0794 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T2	80.43	7	2.59 A
T0	77.00	7	2.59 A
T1	75.57	7	2.59 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

HOST 0 HORAS

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
OHOST	21	0.53	0.48	8.98

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	222.95	2	111.48	10.13	0.0011
Tt	222.95	2	111.48	10.13	0.0011
Error	198.00	18	11.00		
Total	420.95	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
T0 VS T1,T2		2.43 3.07	6.88	1	6.88	0.63	0.4393
T1 VS T2		7.86 1.77	216.07	1	216.07	19.64	0.0003
Total			222.95	2	111.48	10.13	0.0011

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=4.52450

Error: 11.0000 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.	
T2	41.29	7	1.25	A
T0	36.14	7	1.25	B
T1	33.43	7	1.25	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

HOST 2 HORAS

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2HOST	21	0.64	0.60	10.31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	288.10	2	144.05	16.23	0.0001
Tt	288.10	2	144.05	16.23	0.0001
Error	159.71	18	8.87		
Total	447.81	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
T0 VS T1,T2		7.86 2.76	72.02	1	72.02	8.12	0.0107
T1 VS T2		7.86 1.59	216.07	1	216.07	24.35	0.0001
Total			288.10	2	144.05	16.23	0.0001

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=4.06359

Error: 8.8730 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.	
T2	34.14	7	1.13	A
T1	26.29	7	1.13	B
T0	26.29	7	1.13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

INTEGRIDAD DEL ACROSOMA 0 HORAS

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
OIA	21	0.12	0.03	10.26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	82.67	2	41.33	1.27	0.3041
Tt	82.67	2	41.33	1.27	0.3041
Error	584.57	18	32.48		
Total	667.24	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
T0 VS T1,T2		7.14	5.28	59.52	1	59.52	1.83	0.1925
T1 VS T2		-2.57	3.05	23.14	1	23.14	0.71	0.4097
Total			82.67	2	41.33	1.27	0.3041	

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=7.77422

Error: 32.4762 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.
T1	58.00	7	2.15 A
T2	55.43	7	2.15 A
T0	53.14	7	2.15 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

INTEGRIDAD DEL ACROSOMA 2 HORAS

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
2IA	21	0.28	0.20	12.12

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	216.00	2	108.00	3.43	0.0546
Tt	216.00	2	108.00	3.43	0.0546
Error	566.29	18	31.46		
Total	782.29	20			

Contrastes

Tt	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor	
T0 VS T1,T2		12.86	5.19	192.86	1	192.86	6.13	0.0235
T1 VS T2		-2.57	3.00	23.14	1	23.14	0.74	0.4023
Total				216.00	2	108.00	3.43	0.0546

Coefficientes de los contrastes

Tt	Ct.1	Ct.2
T0	-2.00	0.00
T1	1.00	-1.00
T2	1.00	1.00

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=7.65167

Error: 31.4603 gl: 18

Tt	Medias	n	E.E.	
T1	49.71	7	2.12	A
T2	47.14	7	2.12	A B
T0	42.00	7	2.12	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

FORMATO TABULACIÓN DE DATOS DE SEMEN FRESCO

SEMEN FRESCO			
MORFOLOGÍA			VITALIDAD
Defecto primario		Vivos	100
CABEZA		Muertos	
Microcefalia			
Cabeza suelta			VOLUMEN
Cabeza partida			
Piriformes			
Macrocefalia			CONCENTRACIÓN
Defecto secundario			
CUELLO Y COLA			
Cola látigo			TRASLUCIDEZ
Defecto DAG		1 Opaco	
Cola enrollada		2 Poco traslucido	
Aplasias		3 Transparente	
Cola corta			COLOR
Cola suelta		1 Blanco lechoso	
Doble corta		2 Blanco cremoso	
Total	0	3 Amarillento	
Normales	100	4 Rojizo chocolate	
			MOVILIDAD MASAL

FORMATO TABULACIÓN DE DATOS DE SEMEN POST DESCONGELADO

SEMEN POST DESCONGELADO			
MORFOLOGÍA			VITALIDAD
Defecto primario		Vivos	
CABEZA		Muertos	
Microcefalia			
Cabeza suelta			
Cabeza partida			
Piriformes			
Macrocefalia			CONCENTRACIÓN
Defecto secundario			
CUELLO Y COLA			
Cola látigo			HOST
Defecto DAG			
Cola enrollada			
Aplasias			
Cola corta			INT. DEL ACROSOMA
Cola suelta			
Doble corta			
Total	0		MOVILIDAD INDIVIDUAL
Normales	100		



Adquisición de animales

1 Hembra

3 Machos



Adquisición de la vagina artificial

	<p>Ubicación de los ejemplares dentro de las instalaciones</p>
	<p>Se trasquiló a todos los ejemplares</p>
	<p>Pajuelas por colores para los diferentes tratamientos</p>

	<p>Toma de muestra</p>
	<p>Obtención de eyaculado con ayuda de vagina artificial</p>
	<p>Muestras seminales</p>



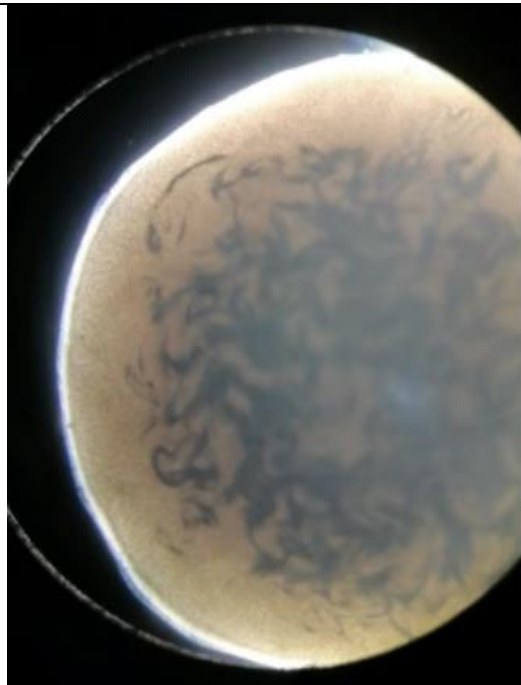
Obtención de plasma seminal



Análisis microscópico de calidad seminal



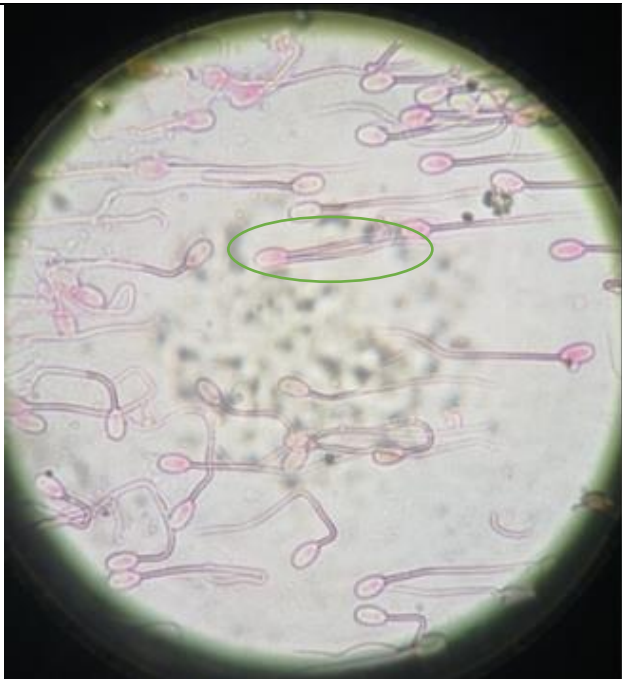
Envase de pajuelas



Movilidad Espermática



Evaluación de concentración
espermática



Análisis morfológico
Se observa una doble cola



Integridad del acrosoma



Prueba de HOST