



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS
AGROPECUARIA**

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

**"EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA
CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN DE OVINO"**

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICO
VETERINARIO**

AUTOR: VILMA JANNETH MOROCHO CARCHI

DIRECTOR: DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN

CUENCA - ECUADOR

2021

*Yo me gradué en los
50 años de La Cato!*



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA

Comunidad Educativa al Servicio del Pueblo

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

"EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA CRIOPRESERVACIÓN DEL
SEMEN DE OVINO"

**TRABAJO DE TITULACIÓN O PROYECTO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MEDICO
VETERINARIO**

AUTOR: VILMA JANNETH MOROCHO CARCHI

DIRECTOR: DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN

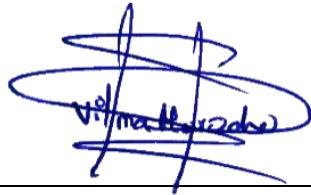
CUENCA - ECUADOR

2021

*Yo me gradúe en los
50 años de La Cato!*

I. DECLARACIÓN

Yo, **VILMA JANNETH MOROCHO CARCHI**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento; y eximo expresamente a la UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CUENCA y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.



Vilma Janneth Morocho Carchi

II. CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

De mis consideraciones:

El presente trabajo de titulación denominada “Efecto de la L-carnitina en la criopreservación del semen de ovino” fue desarrollado por **VILMA JANNETH MOROCHO CARCHI**, ha sido revisado y orientado durante su ejecución, por lo que certifico que el presente documento, fue desarrollado siguiendo los parámetros de método científico, se sujeta a las normas éticas de investigación, por lo que esta expedito para su presentación.



Daniel Ernesto Argudo Garzón

DIRECTOR

III. DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a Dios por haberme dado la vida y permitirme llegar a este momento tan especial para mí. Por los triunfos y los momentos difíciles que me ha enseñado a valorar cada día más, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos, más aspirados en mi vida.

De igual forma dedico esta tesis a mi madre que me acompañó durante todo mi trayecto estudiantil, que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado salir adelante en los momentos difíciles. A mi padre a pesar de su distancia física siempre me apoyo con su amor, trabajo y sacrificio en todo estos años, gracias a usted he logrado llegar hasta aquí y convertir en lo soy

IV. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por protegerme a lo largo de mi camino y por darme la fuerza para superar obstáculos y dificultades en mi vida.

Dicen que el mejor legado que los padres pueden dejarnos es la educación, pero no creo que este sea el único legado por el que estoy especialmente agradecido, mis padres me permitieron forjar mi camino y caminar con mis propios pies, créanme, su generosidad y su incansable ayuda en todo momento para dar un paso adelante en mi vida.

De igual forma agradezco a toda las autoridades y personal que forma a la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias Carrera de Medicina Veterinaria por confiar mí, abrirme las puertas y permitir realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento. Finalmente mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis Dr. Daniel Argudo principal colaborador durante todo este proceso, quien con su amplia experiencia, colaboración y conocimientos me oriento al correcto desarrollo y culminación con éxito este trabajo.

V. ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	DECLARACIÓN	3
II.	CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	4
IV.	AGRADECIMIENTOS.....	6
V.	ÍNDICE DE CONTENIDO	7
VI.	LISTA DE FIGURAS.....	9
VII.	LISTA DE CUADROS.....	10
VIII.	LISTA DE ANEXOS.....	11
IX.	RESUMEN	12
X.	ABSTRACT	13
	CAPÍTULO 1.....	14
	1.1. Introducción	14
	1.2. Planteamiento del problema.....	16
	1.3. Hipotesis.....	17
	1.4. Antecedentes.....	18
	1.5. Objetivos.....	20
	1.5.1 Objetivo general.	20
	1.5.2 Objetivos específicos.....	20
	1.6. Justificación.....	21
	CAPITULO 2.....	22
	2.1. Anatomía funcional reproductiva del ovino	22
	2.1.1. Órganos reproductivos del ovino.....	22
	2.1.2. Células espermáticas o espermatozoides.....	23
	2.2. Fisiología reproductiva del ovino	24
	2.2.1. Madurez reproductiva en el macho.	24
	2.2.2. Espermatogénesis.....	24
	2.2.3. Maduración de espermatozoides en el epidídimo.....	25
	2.2.4. Capacitación espermática	25
	2.2.5. Reacción acrosómica	25
	2.3. Semen ovino.....	26
	2.3.1. Definición de espermatozoides	26
	2.3.2. Erección.....	27
	2.3.3. Eyaculación	27
	2.4. Evaluación del semen	27
	2.4.1. Características macroscópicas	27
	2.4.2. Características microscópicas.....	28
	2.5. Colección del semen	29
	2.6. Diluyentes del semen	30
	2.6.1. Triladyl	30

2.6.2.	Andromed	30
2.6.3.	Yema de huevo	30
2.7.	Antioxidantes	31
2.7.1.	L- carnitina	31
2.8.	Conservación del semen	31
2.8.1.	Refrigeración, congelación y descongelación	32
CAPITULO 3.....		33
3.1	Metodología de la investigación	33
3.1.1	Materiales y métodos	33
3.1.2	Métodos	35
3.1.2.1	Área de estudio	35
3.1.2.2	Diseño experimental.....	35
3.1.2.3	Descripción de diseño experimental.	35
3.1.2.4	Caracterización de la unidad de análisis	36
3.1.2.5	Raza del semental.....	36
3.1.2.6	Criterios de selección de los ovinos	36
3.1.2.7	Preparación de semental para la colecta de semen	37
3.1.2.8	Criterios de inclusión	37
3.1.2.9	Preparación de diluyentes	37
3.1.2.10	Colección de semen	38
3.1.2.11	Evaluación de semen.....	38
3.1.2.12	Procesamiento de semen	39
3.1.2.13	Periodo de congelación del semen.....	40
3.1.2.14	Descongelación	41
3.1.2.15	Evaluación de semen post descongelación	41
3.1.2.16	Análisis estadístico	42
CAPÍTULO 4.....		43
4.1.	RESULTADOS	43
CAPÍTULO 5.....		47
5.1.	DISCUSIÓN.....	47
CAPITULO 6.....		50
6.1.	CONCLUSIÓN.....	50
CAPÍTULO 7.....		51
7.1.	RECOMENDACIONES	51
BIBLIOGRAFÍA.....		52
ANEXOS.....		57

VI. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aparato reproductor de macho	23
Figura 2. Espermatogénesis.....	24
Figura 3. Laboratorio de fitopatología – Universidad Católica de Cuenca.....	35
Figura 4. Preparación de diluyentes.....	40

VII. LISTA DE CUADROS

Tabla 1. Características de semen fresco de los ovinos utilizados en el estudio.....	43
Tabla 2. Motilidad individual progresiva de los espermatozoides congelados de ovino con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.....	43
Tabla 3. Vitalidad de los espermatozoides congelados de ovinos con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.....	44
Tabla 4. Anormalidades de los espermatozoides congelados con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.....	45
Tabla 5. Integridad de las membranas (Test de HOST) de los espermatozoides congelados con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.....	45

VIII. LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Estadísticos descriptivos de las variables analizadas en semen fresco obteniendo del programa estadístico SPSS.....	57
Anexo B. Anova de las variables de semen fresco.....	59
Anexo C. Estadísticos descriptivos de las variables analizadas en el semen post congelación.....	61
Anexo D. Procedimiento GLM de las variables post congelación en los tratamientos.....	71
Anexo E. Test de Tukey de comparaciones múltiples de los tratamientos para variables post congelación.....	76
Anexo F. Estadísticos descriptivos y Anova para comparaciones entre diluyentes.....	80
Anexo G. Estadísticos descriptivos y Anova para comparaciones entre las muestras congeladas con L-carnitina y sin L-carnitina.....	83
Anexo H. Fotografías.....	86

IX. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la adición de L-carnitina en la criopreservación de semen ovino, sobre parámetros seminales microscópicos tras la descongelación. Se utilizó 12 eyaculados de dos ovinos merinos mediante el método de vagina artificial, que presentaron un promedio de volumen de $1,3 \pm 0,40$ mL, color blanquecino, aspecto cremoso, pH de $6,6 \pm 0,46$, concentración inicial $3392,5 \pm 370,19 \times 10^6$ /ml motilidad individual progresiva $89,6 \pm 5,82\%$ y una motilidad masal alrededor del grado $4,7 \pm 0,45$. Posteriormente, cada eyaculado se diluyó con cuatro tratamientos: T1 (Triladyl + L-carnitina), T2 (Triladyl), T3 (Andromed + L-carnitina) y T4 (Andromed), el semen diluido fue lentamente enfriado a 5°C a su vez almacenado en pajillas de 0,25 mL y fue criopreservado en nitrógeno líquido. Las pajillas congeladas, se descongelaron individualmente a 37°C durante 60 segundos en baño maría, para la evaluación microscópica de los espermatozoides. Los resultados obtenidos post descongelación, para motilidad individual progresiva (MIP) fueron $76,3 \pm 8,56\%$, $76,3 \pm 12,99\%$, $5,2 \pm 4,37\%$ y $4,2 \pm 2,98\%$ respectivamente, en la que se determinó que las muestras congeladas con el tratamiento T1 y T2 independientemente de si se les agrego o no L-carnitina fueron superiores estadísticamente al T3 y T4. Para la vitalidad se obtuvo $35,57 \pm 11,60\%$ para T1, $40,92 \pm 13,55\%$ para T2, $5,47 \pm 5,74\%$ para T3 y $4,09 \pm 4,03\%$ para T4, en la misma se pueden observar que en los dos primeros tratamientos superan estadísticamente a muestras congeladas con T3 y T4. En cuanto a la cantidad de anomalías sigue la misma tendencia que los resultados anteriores donde $9,54 \pm 7,91\%$ T1 y $8,14 \pm 4,08\%$ T2 tienen un menor porcentaje de los espermatozoides anormales con respecto a los otros dos tratamientos. Al analizar las membranas espermáticas se estableció que la adición de la L-carnitina en los tratamientos no presentó incremento de la cantidad de espermatozoides con la membrana íntegra. Sin embargo, el tratamiento T1 con $32,31 \pm 7,60\%$ y T2 con $31,27 \pm 6,70\%$, tuvieron una mayor cantidad de espermatozoides con las membranas íntegras, con respecto a T3 con $5,46 \pm 3,52\%$ y T4 con $4,40 \pm 3,14\%$. En conclusión, la adición de L-carnitina como antioxidante en la crioconservación de semen ovino bajo nuestras condiciones de estudio no tuvo beneficios en los espermatozoides en ninguno de los parámetros estudiado.

Palabras clave: L-carnitina, Andromet, Triladyl, Criopreservación, espermatozoides, ovinos

X. ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of the addition of L carnitine in the cryopreservation of sheep semen, on microscopic seminal parameters after thawing. Twelve ejaculates from two merino sheep were used using the artificial vagina method, which presented an average volume of 1.3 ± 0.40 mL, whitish color, creamy appearance, pH of 6.6 ± 0.46 , initial concentration $3392, 5 \pm 370.19 \times 10^6$ / ml progressive individual motility $89.6 \pm 5.82\%$ and a mass motility around grade 4.7 ± 0.45 . Subsequently, each ejaculate was diluted with four treatments: T1 (Triladyl + L-carnitine), T2 (Triladyl), T3 (Andromed + L-carnitine) and T4 (Andromed), the diluted semen was slowly cooled to 5°C at its Once stored in 0.25mL straws and cryopreserved in liquid nitrogen. The frozen straws were individually thawed at 37°C for 60 seconds in a water bath, for the microscopic evaluation of the sperm. The results obtained after thawing, for progressive individual motility (MIP) were $76.3 \pm 8.56\%$, $76.3 \pm 12.99\%$, $5.2 \pm 4.37\%$ and $4.2 \pm 2.98\%$ respectively. , in which it was determined that the frozen samples with the T1 and T2 treatment regardless of whether or not L-carnitine was added to them were statistically superior to T3 and T4. For vitality, $35.57 \pm 11.60\%$ were obtained for T1, $40.92 \pm 13.55\%$ for T2, $5.47 \pm 5.74\%$ for T3 and $4.09 \pm 4.03\%$ for T4, in it can be seen that in the first two treatments they statistically exceed frozen samples with T3 and T4. Regarding the amount of abnormalities, it follows the same trend as the previous results, where $9.54 \pm 7.91\%$ T1 and $8.14 \pm 4.08\%$ T2 have a lower percentage of abnormal sperm with respect to the other two treatments. When analyzing the sperm membranes, it was established that the addition of L-carnitine in the treatments did not present an increase in the amount of sperm with the integral membrane. However, the treatment T1 with $32.31 \pm 7.60\%$ and T2 with $31.27 \pm 6.70\%$, had a greater quantity of sperm with the integral membranes, with respect to T3 with $5.46 \pm 3.52\%$ and T4 with $4.40 \pm 3.14\%$. In conclusion, the addition of L-carnitine as an antioxidant in the cryopreservation of sheep semen under our study conditions did not have benefits in the spermatozoa in any of the parameters studied.

Keywords: L-carnitine, Andromet, Triladyl, Cryopreservation, sperm, sheep.

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUCCIÓN

En nuestro país la industria ovina ha sido tradicional generado por pequeños productores, quienes han visto en esta actividad un medio de subsistencia, sin embargo con la implementación de buenas prácticas pecuarias la producción ovina en el país se presenta como una alternativa interesante del sector pecuario (Escudero, 2015). El ovino contribuye a satisfacer las demandas calóricas y proteicas en la alimentación de población humana, representando el 8% de la producción de la carne y mejora las condiciones del suelo agrícola del sector rural, logrando así un equilibrio duradero en el tiempo de esta manera combina aspectos económicos, sociales y ecológicos (Lema & Cacuango , 2012).

Una de las alternativas para incrementar los niveles de producción ovina, lo conforma el mejoramiento genético, donde la selección de carneros es fundamental dentro de programa de inseminación artificial. La técnica de criopreservación de espermatozoides también permite la multiplicación y diseminación de genes, así mismo su preservación por períodos de tiempo más prolongados (Aguilar, Amaro, & Hernández, 2013).

La finalidad de la preservación del semen a largo plazo es una técnica importante en el mejoramiento genético, ya que la técnica facilita el uso de alta genética y optimiza el uso de productores. Sin embargo, la criopreservación es un proceso extremadamente complejo que muchas veces puede dañar los espermatozoides (Mesa, 2011).

En la criopreservación de semen y la inseminación artificial son técnicas reproductivas utilizadas en la mayoría de especies domésticas para conseguir un rápido progreso genético; sin embargo, la inseminación artificial con semen congelado no está muy difundida en ovinos, debido principalmente a las lesiones que sufre el espermatozoide durante la congelación y descongelación, lo que baja la tasa de fertilidad y viabilidad (Ruiz, Sandoval, & Santiani, 2015). Los daños en las membranas espermáticas alteran su función metabólica, causando una capacitación espermática prematura; y consecuentemente, los espermatozoides no sobreviven mucho tiempo en el tracto reproductivo de la hembra, disminuyendo las posibilidades de fecundar el ovocito (Guerrero , Huanca, Huerta, & Ramos, 2009).

Los daños producidos en los espermatozoides durante el proceso de crio preservación podrían ser prevenidos parcialmente usando un diluyente adecuado y agente crio protectores apropiados que puedan mejorar la fecundación así mismo capacidad de preservación del semen congelado de ovino esto siendo uno de los principales temas de investigación (Apaza, 2017).

Como se mencionó anteriormente, la criopreservación de espermatozoides causa daños estructurales irreversibles sobre todo a nivel de las membranas celulares;

debido directamente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), este proceso se conoce como estrés oxidativo (Eisen , Quintana, Medina , Morello, & Venturino, 2005). En los últimos años, se han probado varias estrategias con la finalidad de prevenir o aminorar el estrés oxidativo durante la criopreservación seminal, una de ellas ha sido la inclusión de antioxidantes en los diluyentes. Actualmente, se han publicado trabajos demostrando el efecto antioxidante de la L-carnitina en la criopreservación de semen de varias especies como bovino, pollo, búfalo, gato (Bucak, y otros, 2010) , entre ellas del ovino.

La L-carnitina limita las vías de beta oxidación, actúa en el transporte de ácidos grasos a las mitocondrias, mantiene la homeostasis celular y contribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en niveles fisiológicos (de Souza, y otros, 2019). La L-carnitina es un compuesto endógeno que limita la vía de oxidación β , que actúa en el transporte de ácidos grasos a las mitocondrias, mantiene la homeostasis celular y contribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno en niveles fisiológicos (Banihani, Sharma, Bayachou , Sabanegh , & Agarwal, 2011).

El presente estudio tuvo como finalidad, probar la L-carnitina en la criopreservación de semen ovino con dos diluyentes comerciales Andromed y Triladyl.

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La inseminación artificial es la práctica de manejo más valiosa para los productores, ya que de la eficacia de esta depende el progreso genético del hato y así mismo la eficacia reproductiva. El primer requisito para que la inseminación artificial sea eficaz, la capacidad del semen utilizado deberá de ser alta, esto se logra mediante una adecuada conservación tomando como base la regulación térmica y el uso de un adecuado protector. Actualmente se ha empleado una gran cantidad de extensores para la crio conservación del semen del ovino, no existe un consenso acerca de cuál es el que proporciona mejores resultados al descongelar, pero los diluyentes a base de yema de huevo, glicerol y leche descremada son los que más se han experimentado.

En la actualidad se viene desarrollando protocolos para crio preservación de material seminal ovino, por lo cual es necesario indagar sobre la efectividad que se genera al adicionar L-carnitina como antioxidante de semen al diluyente comercial Triladil y Andromed, con el fin de buscar mejoras en la calidad espermática de los ovinos, ya que en la región se cuenta con poca investigación sobre los efectos que poseen estos coadyuvantes directamente sobre la calidad espermática por lo cual se evaluara, si este antioxidante adicionado al diluyente nos brindaran mejor resultado en la efectividad del material seminal, y a su vez no se vea afectado la funcionalidad de la membrana y la motilidad, viabilidad del semen en condiciones de congelamiento y que pueda generar mayor efectividad en la preñez lo cual representara mayores ingresos en la economía del productor.

1.3. HIPOTESIS

Ha: La adición de L-Carnitina en la criopreservación de semen ovino mejora las características espermáticas post congelación.

1.4. ANTECEDENTES

Desde hace algunas décadas el estudio de los protocolos de criopreservación espermática se desarrollaron notablemente, para la mayoría de especies domésticas, desde el descubrimiento del potencial del glicerol como el mejor agente crioprotector. A partir de la década de los 70, en que se obtuvieron las primeras camadas usando espermatozoides criopreservados cuando comienza a tener mayor relevancia el uso del semen congelado (Mercado , 2011).

Un primer trabajo corresponde a Banihani, Sharma, Bayachou , Sabanegh , & Agarwal (2011), quienes realizaron una investigación sobre la oxidación, motilidad y vitalidad del ácido desoxirribonucleico (ADN) de los espermatozoides humanos en presencia de la L-carnitina durante la incubación y centrifugación in vitro. Estos investigadores analizaron muestras de semen normozoospermico (n = 55) de acuerdo con las pautas de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Obteniendo como resultado sobre la motilidad que mejoró a una concentración 0,5mg/mL L-carnitina, después de la incubación y centrifugación con 5×10^6 espermatozoides/mL. En una concentración más alta de L-carnitina (50 mg/mL) su investigación disminuyó significativamente la movilidad y viabilidad de los espermatozoides. La L-carnitina no alteró la línea de base de la oxidación del ADN espermático, durante la incubación y la centrifugación. Obteniendo como conclusión, que la L-carnitina puede mejorar la motilidad de los espermatozoides después de la incubación y centrifugación, mientras que puede no afectar la viabilidad den los espermatozoides y la oxidación del ADN.

Un segundo trabajo realizado por Manee-in y otros (2014) denominado el diluyente suplementado de L-carnitina mejora la movilidad de los espermatozoides epididimales criopreservados de gatos. Donde dividieron las muestras al azar en 4 grupos: L-carnitina 0 milimolar (mM) control, L-carnitina 12mM 25mM y 50mM. La concentración de 25mM de L- carnitina mejoró significativamente la motilidad de los espermatozoides en comparación con un grupo de control ($p < 0.05$), aunque esto no fue significativamente diferente entre otras concentraciones. En conclusión, la suplementación de L-carnitina 25mM en el diluyente de congelación mejora la motilidad de los espermatozoides epididimarios.

Fattah, Sharafi, Masoudi, Shahverdi, & Esmaeili (2017) realizaron una investigación utilizando a la L-carnitina como un factor de supervivencia para el almacenamiento refrigerado de semen de gallo durante mucho tiempo. La muestra estudiada fue, en reproductores de pollos de engorde Ross representado por 12 machos adultos. Donde el semen agruparon en seis partes iguales y diluyeron con medios suplementados con diferentes concentraciones de L-carnitina (0, 0.5, 1, 2, 4 y 8 milimolar de L-carnitina). Con el estudio realizado vieron que la calidad de los espermatozoides no se vio afectada por la L-carnitina al comienzo del almacenamiento (0 horas), la suplementación del diluyente con 1 y 2 milimolar de L-carnitina mejoró significativamente el porcentaje de motilidad, viabilidad, integridad de la membrana y actividad mitocondrial de los espermatozoides (24-48 horas) en comparación a otros

grupos. La tasa de fertilidad en la inseminación artificial utilizando espermatozoides refrigerados durante 24 horas en presencia de L-carnitina 1 y 2 milimolar fueron más altas (78%) que en el grupo control (64%). Estos hallazgos sugieren que las dosis óptimas de L-carnitina podrían proteger el espermatozoide de gallo contra los daños funcionales y estructurales inducidos por la refrigeración.

Un cuarto trabajo de Partyka, Rodak, Bajzert, Kochan, & Nihański, (2017) que se denomina el efecto de la suplementación con L-carnitina (LC), hipotaurina (HT) y taurina (T) en la calidad del semen de pollo criopreservado. Donde las muestras de semen se dividieron en siete alícuotas (control, LC 1 milimolar (mM), LC 5 mM, HT 1 mM, HT 10 mM, T 1 mM y T 10 mM) y se sometieron a criopreservación. Obteniendo como resultado donde, la motilidad espermática y el porcentaje más alto de espermatozoides viables estaban en el grupo HT1mM ($P < 0.01$ y $P < 0.05$) después de la criopreservación. En los resultados observaron un mayor porcentaje de espermatozoides sin apoptosis y cambios en la reorganización de la membrana en el grupo LC 1mM y T 1mM en comparación con el control ($P < 0.05$). El porcentaje de espermatozoides con alto potencial mitocondrial aumentó significativamente con LC1mM, T1mM y T10mM ($P < 0.05$). Estos resultados indicaron que la adición de antioxidantes examinados mejora la calidad del semen de pollo criopreservado.

Avila, Ferrante, Miragaya, & Neild (2016) realizaron un estudio sobre efecto de L-carnitina y Piruvato en espermatozoides equinos conservados a 5°C y 15°C por 24 horas. Realizaron la experimentación en semen de 3 padrillos y a tiempo 0 y 24 horas se evaluaron movilidad espermática total y progresiva, viabilidad y estado acrosomal, funcionalidad de membrana y ADN. Se observó un mejor desempeño del diluyente con el agregado de Carnitina y Piruvato para preservar la mayoría de los parámetros en espermatozoides conservados 24 a 5°C y 15°C.

En un estudio realizado por Viera y otros (2019), sobre el efecto de diferentes concentraciones de L-carnitina (LC) suplementada en el diluyente para la criopreservación de semen en ovejas. Donde utilizaron dos diluyentes hidroximetil aminometano (TRIS) y medio comercial optiXcell™ (IMV), totalizando seis grupos: IMV- (LC de 0, 5 y 10 mM) y TRIS - (LC de 0, 5 y 10 mM). Después del proceso de congelación-descongelación y durante toda la incubación a 38 °C durante 3 h, se evaluaron varios parámetros: cinética espermática, prueba hipoosmótica, integridad de la membrana plasmática, estado de capacitación y nivel de peroxidación lipídica. La suplementación de LC de 5 o 10 mM al azar afectó algunos parámetros y en general, TRIS fue superior ($P < 0.05$) que el extensor IMV. En los grupos LC, el IMV tuvo mayor estrés oxidativo ($P < 0.05$) que el TRIS. En conclusión, aunque la L-carnitina afectó parámetros aislados, su suplementación en el extensor de semen no tuvo un efecto beneficioso consistente sobre el espermatozoide de carnero de congelación-descongelación.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general.

- Determinar el efecto de la adición de L-carnitina en la criopreservación de semen ovino.

1.5.2 Objetivos específicos.

- Establecer si la adición de L-carnitina en la criopreservación de semen ovino mejora las características cinéticas y cualitativas post descongelación.
- Determinar si existe relación entre el uso de la L-carnitina y el diluyente usado con respecto a las características cinéticas y cualitativas del semen ovino post descongelación.

1.6. JUSTIFICACIÓN.

En la actualidad, la inseminación artificial y la conservación de semen son prácticas confiables y ampliamente estudiadas e investigadas, en su mayoría para grandes especies como bovinos, porcinos y equinos para mantener el semen de animales con alta capacidad de transmisión genética (Tello, 2015). Mientras que los métodos comúnmente aplicados a la producción ovina en nuestro país son la monta directo y el uso de semen fresco como programas de inseminación artificial.

Por ello, parecía necesario ofrecer al productor nuevas alternativas reproductivas, que tengan como objetivo incrementar la producción ovina, de manera que se facilite considerablemente la aceleración del flujo de material genético superior, evitando así los costos que representa la transferencia de los reproductores de alto valor genético al mismo tiempo reduce los riesgos para la salud que presentan durante la movilización.

Por ello y dado que en nuestro país los estudios realizados son mínimos para el tratamiento del semen ovino. El presente estudio evaluó sobre el efecto de la L-carnitina diluida en diluyentes comerciales Triladyl y Andromed sobre la criopreservación de semen de ovino, lo que garantizaría un buen porcentaje de supervivencia, de viabilidad y motilidad de los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación. Dado que se ha observado que la L-carnitina es un antioxidante, que juega un papel importante en la preservación de la integridad de la membrana, mejorando la energía de las células mitocondriales e inhibiendo la apoptosis. Contribuyendo favorablemente a la calidad de los espermatozoides y teniendo una mayor motilidad de los espermatozoides después de la descongelación (Vieira, y otros, 2019).

CAPITULO 2

2.1. Anatomía funcional reproductiva del ovino

El estudio anatómico del sistema reproductor masculino comienza en los testículos, se encuentra dentro de la cavidad abdominal debajo del recto, dentro de un caso de piel llamado escroto (Rodríguez, Álvarez, & Boixo, Abril 2016). En el exterior están los genitales externos (testículos y pene). Su función principal es la producción de espermatozoides, para ser depositados posteriormente en el sistema reproductor femenino y la producción de hormonas (andrógenos) que regulan las características sexuales del macho y la producción del propio espermatozoide (Inatec, 2018).

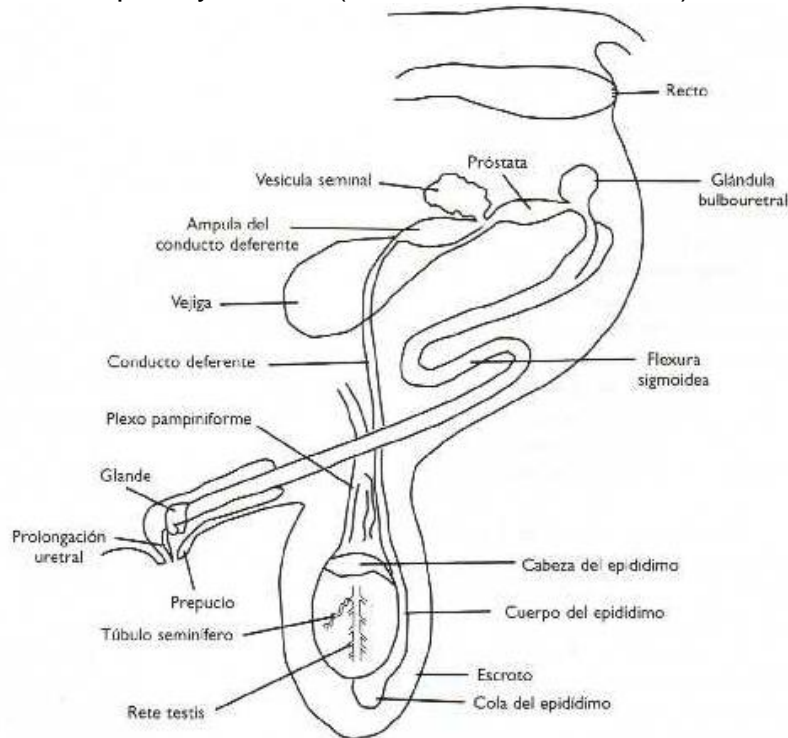
Los espermatozoides salen del testículo por los conductos eferentes y llegan a la parte craneal del epidídimo, luego de pasar por el cuerpo del epidídimo, llegan a la parte terminal (cola del epidídimo), donde se almacenan hasta lo que pasan en los conductos deferentes que ingresan a la uretra donde se incorporan a las secreciones producidas por las glándulas vesiculares, la próstata y las glándulas bulbo-uretrales. Estas secreciones actúan como un medio de transporte de semen y toman el nombre de semen (Echegaray, 2009).

2.1.1. Órganos reproductivos del ovino

Los órganos reproductivos de un ovino constan de las siguientes estructuras anatómicas: testículos, sistemas de conductos (conductos eferentes, epidídimo, conducto deferente, uretra) glándulas accesorias (glándulas bulbouretrales, próstata, vesícula seminal), pene, prepucio y escroto (Aisen, 2004).

- Testículos.- las gónadas masculinas se encuentran fuera del abdomen en el escroto que se deriva de la piel y la fascia abdominal. La función de los testículos es transportar el semen.
- Epidídimo.- esta estructura está formada por un único ducto muy contorneado y se localiza adyacente al testículo, en el epidídimo se lleva a cabo la maduración espermática y al mismo tiempo sirve de almacenamiento para los espermatozoides.
- Ámpula.- Es la última parte de cada conducto deferente y está formada por el engrosamiento de la mucosa y tiene muchos compartimentos. Carece de función específica (Porrás & Páramo, 2009).
- Glándulas accesorias.- Producen plasma seminal que constituye la fracción líquida del eyaculado y sirve, entre otras cosas, como vehículo para el transporte de espermatozoides, como coagulante después de la eyaculación y como nutrientes para limpiar la uretra.
- Glándulas vesiculares.- Son glándulas emparejadas ubicadas dorsalmente a la uretra pélvica en la posición distal de los conductos deferentes.

- Próstata.- se encuentra en la unión de la vejiga y la uretra pélvica. Tiene dos partes, un cuerno ubicado fuera del músculo uretral y una parte diseminada distribuida a lo largo de las paredes dorsal y lateral de la uretra pélvica.
- Glándulas de Cowper.- son glándulas emparejadas ubicadas a ambos lados de la uretra pélvica cerca del arco isquiático. Están formados por un alto porcentaje de tejido conectivo fibroso, por lo que son muy densos (Aisen, 2004).
- Pene.- Consta de tres partes: la base (la parte insertada en el arco isquiático), el cuerpo (constituye la mayor proporción del pene en la parte ventral, contiene la uretra peneana y dos partes llamadas cuerpos cavernosos) y el glande (la parte final y distal del pene es rica en terminaciones sensitivas).
- Prepucio.- es la parte del tejido epitelial y mucoso que redondea la parte libre del pene para protegerlo, tiene una parte interna y otra externa para la salida del pene y la orina (Porras & Páramo, 2009).



Fuente: (Gonzales, 2019)

Fig 1. Aparato reproductor de macho

2.1.2. Células espermáticas o espermatozoides

Se considera que los espermatozoides son la célula especializada para la fertilización del ovocito, se forman en los túbulos seminíferos de los testículos a través de una serie de células germinales en desarrollo. Tiene la peculiaridad de tener una cabeza que contiene información genómica, una pieza central con mitocondrias que

le da movilidad al flagelo, no todos los espermatozoides son iguales y no llevan todos los procesos de formación y reacción acrosómica en el mismo tiempo en el sistema reproductivo femenino (Ávalos, Vargas , Gonzáles, & Herrera, 2018).

2.2. Fisiología reproductiva del ovino

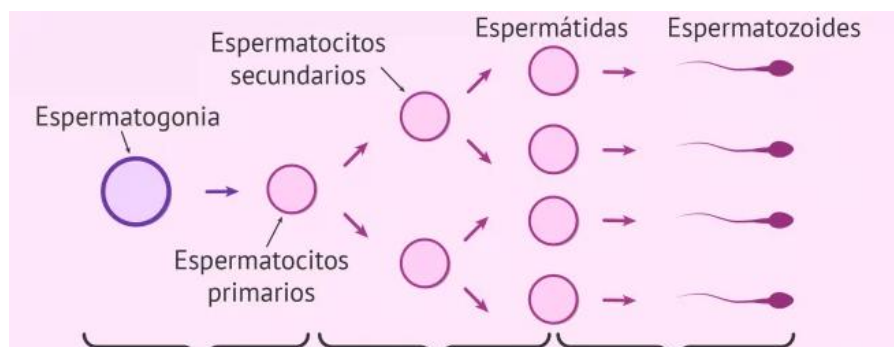
2.2.1. Madurez reproductiva en el macho.

La pubertad ocurre entre los cinco y siete meses en los ovinos. La pubertad en ovino está relacionada con un aumento significativo en la secreción de la hormona testosterona, la espermatogénesis (producción de espermatozoides) y el comportamiento de apareamiento (Delgado, 2013). El tamaño de los testículos aumenta cuando el carnero joven alcanza de ocho a diez semanas de edad y alrededor de 16 a 20 kg de peso corporal. La cópula, o erección con eyaculación de espermatozoides viables, ocurre entre los cuatro y seis meses de edad con un peso de 40 al 60% del peso adulto. Los machos se pueden usar de 7 a 8 meses, se acostumbra usarlos al año y medio; pero su mejor período productivo ocurre entre 2-3 años. Un carnero es bueno hasta por 6 años, sin embargo, lo ideal es usar los carneros durante dos temporadas para evitar problemas de consanguinidad (Orozco, 2017).

2.2.2. Espermatogénesis

“La espermatogénesis es un proceso largo y dirigido en el que las células madres diploides se dividen por mitosis para mantener su número y producir la progenie que de forma cíclica, sufre divisiones meióticas, diferenciándose en células germinales haploides” (Cunningham & Klein, 2009).

La espermatogénesis que se divide en dos fases meiosis (divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias para dar lugar a espermatocitos primarios) y espermatogénesis (división meiótica de los espermatocitos primarios que generan a los espermatocitos secundarios y posteriormente a las espermatidas) se inicia en la pubertad, incluye todos aquellos acontecimientos mediante los cuales los espermatogonios se transforman en espermatozoides (Sadler, 2012).



Fuente: (Aparicio & Reus, 2017)

Fig 2. Espermatogénesis

2.2.2.1. Espermiogenesis

La serie de cambios que transforman las espermatidas en espermatozoides constituyen la espermiogenesis. Estos cambios consisten en la formación del acrosoma que cubre la mitad de la superficie nuclear y contiene enzimas que ayudan durante a penetrar el ovulo y la capa que lo rodean durante la fecundación; la condensación del núcleo; la formación del cuello, la pieza intermedia y la cola; el desprendimiento de la mayor parte del citoplasma (Sadler, 2012).

2.2.3. Maduración de espermatozoides en el epidídimo

Los espermatozoides realizan dos eventos importantes en el epidídimo: maduración y almacenamiento. A medida que atraviesan los conductos eferentes y el epidídimo, obtienen la capacidad de fertilizar y de tener un movimiento lineal progresivo. Durante este proceso, se producen cambios funcionales, bioquímicos y morfológicos en los espermatozoides (Benítez, Chamba, Sánchez, Luzón, & Sánchez, 2018). En la cabeza del epidídimo, se produce reabsorción, intercambio de solutos, líquidos y se desarrolla la capacidad fertilizante. En el cuerpo, la maduración de los espermatozoides y el almacenamiento de la cola de los espermatozoides fértiles. La maduración de los espermatozoides depende de las secreciones epiteliales del transporte de sodio y potasio, los andrógenos y la temperatura escrotal (Barrios, Octubre 2002).

2.2.4. Capacitación espermática

La capacitación espermática se puede definir como el conjunto de cambios a nivel molecular que se producen en los espermatozoides, tras la maduración en el epidídimo, y que confieren la capacidad de fecundar el ovocito (Matás, y otros, 2007). Posterior a la eyaculación, los espermatozoides no pueden fertilizar inmediatamente a los ovocitos, estas deben entrar en contacto con el aparato reproductor femenino para adquirir su capacidad fecundante. Durante su recorrido, principalmente en el oviducto, los espermatozoides sufren cambios bioquímicos y estructurales. Los eventos moleculares involucrados en su aparición incluyen: reordenamiento, exteriorización de receptores, activación de canales iónicos, fusión y vesiculación de membranas plasmática y acrosómicas externas, patrones de motilidad de flagelos alterados y aumento fosforilación de proteínas (Vilca, 2019)

2.2.5. Reacción acrosómica

La reacción acrosómica se considera como una exocitosis en la que membrana plasmática externa y la membrana acrosómica se fenestran y fusionan progresivamente, lo que permite que los espermatozoides formen una unión secundaria con la zona pelúcida, iniciando así su paso a través de ella para más tarde fusionarse con la membrana plasmática del ovocito (Durairajanayagam, 2019). La

reacción acrosómica debe ocurrir para que los espermatozoides sean fértiles e involucra una serie de puntos de fusión entre la membrana plasmática y la membrana acrosómica externa, lo que resulta en la formación de pequeñas vesículas, dispersión de la matriz acrosómica y exposición de la membrana acrosomal interno, que se construye en este momento en la membrana superficial de la región ostral de la cabeza del espermatozoide (Aguilar, Amaro, & Hernández, 2013). La reacción acrosómica ocurre por encima de la región rostral del acrosoma y progresa caudalmente solo hasta el margen anterior del segmento ecuatorial, el cual exhibe una serie de características peculiares que impiden la participación de su membrana en dicha reacción, asegurando así la continuidad de la superficie del espermatozoide (Martínez, Ruiz, Roca, & Vázquez, 1987).

2.3. Semen ovino

“Suspensión celular líquida que contiene los gametos masculinos (espermatozoides) y las secreciones de los órganos accesorios sexuales del aparato reproductor masculino, y se mezclan en el momento de la eyaculación” (Carpio, 2015).

El semen está formado por dos componentes: plasma seminal y los espermatozoides. Plasma seminal: es una mezcla de fluidos secretados por las glándulas vesiculares, los conductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias (Trigoso, 2017). Tiene tres funciones principales:

- Actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación.
- Sirve de activador a los espermatozoides, previamente inmóviles.
- Proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado que colabora en la supervivencia de los espermatozoides después de depositar estos en el aparato genital de la hembra (Castillo, 2017).

2.3.1. Definición de espermatozoides

El espermatozoide es una célula alargada y móvil, muy compartimentada y de tipo terminal. Consiste en una cabeza aplanada que lleva el núcleo y una cola que contiene el aparato necesario para la movilidad celular. El espermatozoide está completamente cubierto por la membrana plasmática, y el extremo anterior del núcleo del espermatozoide está cubierto por el acrosoma un saco membranoso de dos capas que se adhiere firmemente al núcleo durante las últimas etapas de la formación de los espermatozoides en los testículos (Trigoso, 2017). Esta estructura en forma de capucha contiene varias enzimas hidrolíticas, entre las que se encuentran la proacrosina, hialuronidasa, esterasas y ácido-hidrolasa, que participan en el proceso de fertilización. La cabeza de los espermatozoides contiene cromatina muy compacta que está formada por un complejo formado por ADN y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas. El contenido de ADN nuclear es haploide, este núcleo

tiene la mitad de los cromosomas del núcleo de células somáticas de la misma especie (Catellòn, Cesari, & Fornes, 2018).

2.3.2. Erección

La erección comienza rápidamente en los cuerpos cavernosos, seguida del llenado con congestión venosa de los pequeños espacios del cuerpo esponjoso. La desaparición de la erección después de la eyaculación ocurre con la misma secuencia, es decir, primero los cuerpos cavernosos vacíos, luego los espacios de los cuerpos esponjosos. (Konig & Liebich, 2008).

2.3.3. Eyaculación

La eyaculación comienza con la aparición de la libido o deseo sexual en la oveja, de la cual es responsable la testosterona. En condiciones de apareamiento natural, el carnero busca ovejas en celo, percibe su vulva e inmediatamente empuja contra su grupa (Escudero, 2015). Antes de montar, se observa que el macho derrama líquidos a través de la vaina, el pene se mantiene dentro de la vaina hasta que el animal realiza el montaje, luego se extiende, propulsando el movimiento o más conocida como patada de riñón, seguida de eyaculación y desmontó. El esperma eyaculado por el productor consiste en la mezcla del esperma con las secreciones de las glándulas adheridas, el volumen medio por eyaculado es de 1mL, fluctuando entre 0,2 y 1,5 y depende mucho de la edad del animal (Valdez, 2013).

2.4. Evaluación del semen

2.4.1. Características macroscópicas

2.4.1.1 Volumen

Cuando la recolección se realiza con vagina artificial, normalmente se obtiene eyaculados con un promedio de 1mL fluctuando de 0,5 a 2mL con una media de 0.8mL, dependiendo del estado general del ovino, edad, raza y destreza del operario. Generalmente para los trabajos de rutina se descartan aquellos eyaculados con volumen menor de 0,4mL (Aisen, 2004).

2.4.1.2 Color

La cantidad de esperma presente en el eyaculado hace que la muestra se vuelva blanca cremosa cuando la muestra es de buena calidad. Cuando es de mala calidad, parece leche aguada. En este sentido, se puede admitir una relación directa entre la intensidad del color y la riqueza del esperma. El color rojizo indica la presencia de sangre probablemente una causa de lesión de pene durante la recolección, mientras que los colores grises o marrones indican contaminación o infección, en estos casos, se debe desechar el eyaculado y proceder a revisar al ovino (Carrillo & Hernández, 2016).

2.4.1.3 PH

El valor del pH es el resultado de la concentración iónica del material de las ampollas de Henle y el epidídimo y de la neutralización entre las reacciones glandulares de acción tampón. En el ovino, el pH tiende a la acidosis, un fenómeno importante ya que en él reside su capacidad fertilizante. La reacción alcalina es característica de mala fertilidad, a menudo se acompaña de necropermia, disminución de la concentración y motilidad de los espermatozoides. En ovinos, los valores de pH varía entre 6.2 y 7.3, incluso un pH de 7.5 se considera normal (Tapia, 2014).

2.4.2. Características microscópicas

2.4.2.1. Motilidad

La motilidad espermática es uno de los parámetros más estudiados y utilizados para la evaluación de la calidad del esperma; describir el estado energético de los espermatozoides. Es uno de los aspectos más importantes para que los espermatozoides logren la fecundación; sin embargo, su evaluación sigue siendo muy subjetiva en las pruebas de rutina. La evaluación de los parámetros de calidad según la cinemática de los espermatozoides ha sido poco estudiada en las razas de ovino lanudo, y su conocimiento permitirá encontrar patrones de adaptación de producción a las condiciones climáticas en especial en el trópico (Carvajal, Cortés, Manrique, & Grajales, 2018).

2.4.2.2. Concentración espermática

En cuanto a la concentración (Escudero, 2015), sostiene que para evaluar la concentración se debe preparar con anticipación una solución salina al 2%. En 2mL de solución salina formulada se colocan 10 microlitros de esperma puro (1/200) y se homogeneizan girando el tubo varias veces. Una vez homogeneizado se toman aproximadamente 14 microlitros y se carga la cámara de Neubauer por capilaridad, en las dos redes, teniendo en cuenta la carga de 14 microlitros adicionales para la segunda red, se vuelve a homogeneizar entre una carga y otra.

2.4.2.3. Morfología

El análisis morfológico es uno de los componentes importantes dentro de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología espermática tiene una relación directa con la fertilidad en la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado y el tipo de defecto morfológico (Hidalgo, Tamargo, & Diez, 2005). Considerando una clasificación estrictamente morfológica a las anomalías que pueden generarse se clasifican en la cabeza, en el tracto y en la cola del espermatozoide (Rodríguez, Toledo, Gómez, Santana, & Domínguez, 2013).

Esta evaluación de la morfología se puede utilizar para descartar ovinos con muy mala calidad de semen, esto refleja la función de los testículos, epidídimo y glándulas accesorias (Ibañez, Lisarrague, Callejas, & Cabodevila, 2016). El eyaculado de ovino se considera dentro de los parámetros normales cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15%. Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés ambiental, factor individual, temperatura, estación del año, etc (Delgado, 2013).

2.4.2.4. La prueba hipoosmótica (HOST).

Esta prueba fue diseñada por Jeyendran para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática. Su principio se basa en la observación del aumento del tamaño de los espermatozoides expuestos a condiciones hipoosmóticas (Castro, Chirinos, & Orellana, 2017). En la prueba HOST, los espermatozoides bioquímicamente activos permitirán la entrada de agua como resultado de la dinámica de equilibrio entre los fluidos del ambiente extracelular y el compartimento interno de los espermatozoides, lo que hará que estos se hinchen, lo que es un signo de integridad de la membrana y su actividad funcional (transporte normal de agua a través de la membrana del esperma) (Bedoya, Vásquez, Rivera, Correa, & Trujillo, 2003).

2.5. Colección del semen

La colección del semen se realiza en un lugar limpio y libre de polvo. Se esquila la panza de macho, limpiar el prepucio y en caso fuera necesario se recortara los pelos prepuciales y limpiar externamente con un paño húmedo de esta manera se evitara la contaminación del semen en momento de su colección. La monta se realiza un señuelo puede ser una oveja o un maniquí. Se comienza asegurando a la oveja para inmovilizar, posterior a eso el recolector se ubicara del lado derecho del macho de modo que su mano diestra sujete la vagina con el extremo abierto frente al prepucio en un ángulo de 45°C con respecto al piso. Debiendo estar preparado para la monta y eyaculación veloz. El pene del ovino se extiende hacia los lados para enfrentar hacia la vagina artificial a medida que el macho se eleva. Un golpe hacia arriba y hacia adelante del animal indica que se ha producido la eyaculación (Cueto, Gibbons, Bruno, & Fernandez, 2016).

2.5.1. Método de colección

2.5.1.1. Vagina artificial

Es una imitación de la vagina de la hembra, que mediante un estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) desencadena la eyaculación. Dentro de los modelos existentes para ovinos es IMV, Walmur, etc, se puede utilizar una vagina artificial de bovinos adaptada (Aisen, 2004). A continuación se describe las características de esta, consiste en una parte externa caño de polipropileno térmico (17 cm x 5.5cm), y una camisa interna de látex. La misma se repliega y asegura sobre los extremos del tubo externo con unas bandas elásticas formando, entre la cubierta

y la camisa, un compartimento hermético para el agua. A uno de los extremo de la vagina se adosa un tubo colector (Cueto, Gibbons, Bruno, & Fernandez, 2016).

2.5.1.2. Electro eyaculador

Este sistema consta de una fuente de energía conectada a una varilla que tiene 3 electores, la varilla se introduce en el recto del animal con sus electrodos orientados hacia la región ventral, los pulsos de voltaje crecientes estimulan los nervios sensoriales y las glándulas vesiculares. Lo que provoca la eyaculación. La desventaja es que cuanto menor es la eficiencia de la recolección de semen. Consecuencia de su contaminación por orina, ya que el estímulo eléctrico puede provocar un reflejo miccional. Así mismo puede afectar de manera irreversible al reflejo de eyaculación por el mal empleo del electro eyaculador, por la agresividades técnica o por una estimulación insuficiente de la mucosa (Ledesma, 2012).

2.6. Diluyentes del semen

2.6.1. Triladyl

Fabricado en Alemania por la empresa Minitube, el Triladyl es un concentrado estéril para la preparación de un diluyente con yema de huevo para la criopreservación de semen en diferentes rumiantes por ejemplo ovino, bovino, caprino, ciervo, etc, este diluyente está listo para el uso de un solo paso. “Su contenido en antibióticos corresponde al estándar de la UE: EC norma 88/407. Composición: TRIS, Ácido cítrico, Azúcar, tampones glicerina antibióticos, agua de extrema pureza. 100 ml del diluyente preparado contiene (unidades activas) Tilosina 5,7mg. Gentamicina 28,6mg, espectinomicina 34,3mg, Lincomicina 17,2mg. Para su preparación se debe adicionar tres partes de agua destilada, una parte de yema de huevo y 1 parte del concentrado comercial triladyl” (MINITUBE, 2021).

2.6.2. Andromed

Andromed es un diluyente comercial sin yema de huevo para semen bovino y también utilizado exitosamente con semen de especies no bovinas, su presentación es de frasco de 20ml. Sus beneficios son: sin ingredientes de origen animal, sin riesgo de contaminación microbiológica, protocolos de producción eficiente, altas tasas de fertilidad, amplio rango de aplicación, estándar GMP de producción MINITUBE. Contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos, de acuerdo a la Directiva de la UE 88/407 (Tilosina, Gentamicina, Espectinomicina, Lincomicina) (MINITUBE, 2021).

2.6.3. Yema de huevo

Es un componente básico presente en muchos diluyentes preparados para refrigeración y congelación de semen, cuyas características de protección contra el frío se conocen por el trabajo de Phillips y Lardy (1940). Debido a la naturaleza

compleja de la yema, los investigadores han tenido dificultades para determinar los factores específicos responsables de los efectos beneficiosos y su modo de acción; Aclararon que la yema hizo un aporte beneficioso de dos formas distintas: por resistencia, protección frente al choque térmico y por conservación, obteniendo la supervivencia de los espermatozoides. Por tanto, la parte lipídica que consiste en fosfolípidos, lecitina y cefalina, es eficaz para proteger contra el choque térmico (Cabrera, Ayulo, & Pantoja, 2011).

2.7. Antioxidantes

La suplementación de antioxidante en el diluyente de congelación se ha utilizado para defenderse de los radicales libres que potencialmente reducen la capacidad de fertilización de los espermatozoides. Los antioxidantes en la eyaculación protegen a los espermatozoides de los radicales libres producidos por los leucocitos, evitan la fragmentación del ADN, mejoran la calidad del semen, reducen el daño criogénico a los espermatozoides, bloquean la maduración prematura de los espermatozoides y proporcionan una estimulación general a las células de los espermatozoides (Bucak, y otros, 2010)

2.7.1. L- carnitina

Es un compuesto endógeno que limita la vía de oxidación β , que actúa en el transporte de ácidos grasos a las mitocondrias, mantiene la homeostasis celular y contribuye a la producción de especies reactivas de oxígeno en niveles fisiológicos (de Souza, y otros, 2019). El uso de L-carnitina en el extensor para la criopreservación mejoró la calidad del semen y tuvo una mayor motilidad espermática después de la congelación en especies de cabras, conejos y búfalos, pero no tuvo efecto sobre el semen de jabalí (Longobardi, y otros, 2017). Por lo tanto, el papel de LC puede ser contradictorio dependiendo de la especie; y la literatura aún es incipiente con respecto a su uso para la criopreservación de semen de oveja (Duru, Morshedi, Schuffner, & Oehninger, 2000)

2.8. Conservación del semen

La conservación de espermatozoides en nitrógeno líquido es una técnica para cubrir necesidades básicas, cuyo objetivo principal es prolongar indefinidamente la viabilidad de los gametos masculinos, ya que a temperatura ambiente o en refrigeración los espermatozoides se degeneran con cierta rapidez, principalmente debido al agotamiento de las reservas de energía (Santiani, y otros, 2007). Para conseguir este objetivo, en cualquier protocolo de congelación seminal, se deben controlar rigurosamente las sucesivas etapas que constituyen el proceso de criopreservación y, en particular, aquellas que influyen más directamente en la estructura y función de las membranas espermáticas y en el metabolismo celular. Cualquier protocolo de congelación seminal tiene cinco pasos principales: dilución y adición de crioprotector, enfriamiento y envasado, congelación, almacenamiento y finalmente descongelación. (Muñoz, 2010).

2.8.1. Refrigeración, congelación y descongelación

2.8.1.1. Refrigeración y congelación

El proceso de congelación se realiza en dos etapas, la de enfriamiento y la de congelación propiamente dicha. Un factor importante a considerar antes de iniciar el proceso de congelación es el método de adición del crioprotector penetrante, ya que puede realizarse en uno o dos pasos. La refrigeración y congelación de los espermatozoides reduce la actividad metabólica de los espermatozoides y, por lo tanto, preserva la viabilidad de los espermatozoides (Batista, y otros, 2013). Sin embargo, ambos procedimientos muestran ventajas y limitaciones. La etapa de enfriamiento es un periodo de adaptación para los espermatozoides a un metabolismo reducido. El semen ya diluido se enfría hasta los 5°C a una velocidad de unos -0.2 a 0.4 °C/minuto. Una vez que el semen diluido alcanza los 5°C, es recomendable mantenerlo a esta temperatura durante 1.5 a 2 horas, este proceso es conocido como equilibrio (Medina, Velasco, & Cruz, 2005). La congelación se realiza en vapores de nitrógeno líquido, de forma manual o automática. En la congelación manual, la velocidad de congelación está regulada por la distancia entre las pajillas o tubos a nivel de nitrógeno líquido (10 a 100°C minuto). Las pajuelas se colocan horizontalmente sobre las gradillas a distancia de 3-4cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno o de cualquier material aislante. Las pajuelas se exponen a los vapores de nitrógeno líquido (-80 a 100°C) durante 10 a 20 minutos y posteriormente son depositadas en nitrógeno líquido para luego ser colocado en un termo (Tabarez, 2014).

2.8.1.2. Descongelado

La fase de descongelación es tan importante para la supervivencia de los espermatozoides como la fase de congelación porque deben pasar por la zona de temperatura crítica. Se producen cambios osmóticos inversos que fueron descritos para la congelación durante la descongelación. La concentración de solutos en el medio extracelular se reduce gradualmente y la célula se rehidrata para compensar esta diferencia de concentraciones entre el exterior y el interior de la célula. Las velocidades de recalentamiento rápidas generalmente se consideran necesarias para la recuperación celular. En el primer caso, es necesaria una descongelación rápida para evitar la cristalización del hielo intracelular presente en los espermatozoides. (Fernandez, y otros, 2009).

CAPITULO 3

3.1 Metodología de la investigación

3.1.1 Materiales y métodos

3.1.1.1 Físicos

- 1 Vagina artificial.
- 1 Microscopio.
- 1 platina térmica.
- 200 tubos falcón capacidad 15mL
- 500 tubos eppendorf 1,5mL.
- Cámara de Neubauer.
- 1 Pipeta de 1ml de capacidad.
- 1 Pipeta de 10ml de capacidad.
- 1 Baño maría de 5 litros de capacidad.
- 5 cajas de porta objetos.
- 1 caja de guantes.
- 1 caja de mascarillas.
- Marcador.
- Termómetro.
- Alcohol desinfectante.
- 2 cajas de cubre objetos.
- 1 paquete de 700 pajuelas de 0.25mL.
- 1 Caja térmica de poliuretano 70 cm x 36 cm x 46 cm.
- 1 tanque de nitrógeno capacidad para 20kg.
- 1 Computador portátil para procesamiento de datos.
- 1 Refrigerador
- 1 sellador de fundas.
- 25 canutos
- 50 goblets
- 1 Gradilla de plástico

- 1 rampa
- Punta azul graduada 1000UL x 500 foyomed
- Punta blanca/amarilla grad.200UL x 1000 foyomed
- 1 Papel aluminio
- Balanza
- Tijera
- Piza anatómica

3.1.1.2 Químicos

- 1 frasco de 100ml de Triladyl.
- 1 frasco de 100ml de Andromed.
- 1 frasco de 1000ml de agua purificada.
- 1 frasco de 50ml de tinción de Eosina.
- 1 frasco de 50ml de tinción de Nigrosina.
- 60kg de nitrógeno líquido.
- Papel higiénico.

3.1.1.3 Biológicos

- 12 eyaculados provenientes de dos ovino de raza merino.
- 2 ovejas peli buey, empleada como maniquí.
- 6 yemas huevos frescos.

3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Área de estudio

El presente trabajo se realizó en la Universidad Católica de Cuenca en la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias Carrera de Medicina Veterinaria en el laboratorio de fitopatología, este centro se localiza en la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay. Geográficamente la ciudad de Cuenca se encuentra ubicado a una altitud de 2.538 m.s.n.m. Su superficie es de 15.730 hectáreas y presenta un clima con temperaturas que oscilan entre los 7 a 15°C en invierno y 12 a 25°C (Cuenca Alcaldía, 2021).



Fuente: (Google earth, 2021)

Fig 3 Laboratorio de fitopatología – Universidad católica de Cuenca.

3.1.2.2 Diseño experimental.

Se evaluaron 12 eyaculados de dos sementales, cada eyaculado se diluyo con los 4 tratamiento, Triladyl + L-carnitina, Triladyl, Andromed + L-carnitina y Andromed. Utilizando 24 pajillas por cada eyaculado, 6 pajillas por cada tratamiento.

3.1.2.3 Descripción de diseño experimental.

- Tipo de diseño. - Diseño de bloques al azar (DBA)
- Tratamientos:
 - ✓ Tratamiento 1. Diluyente Triladyl + 5mM L-carnitina

- ✓ Tratamiento 2. Diluyente Triladyl
- ✓ Tratamiento 3. Andromed + 5mM L-carnitina
- ✓ Tratamiento 4. Diluyente Andromed
- Repeticiones 6
- Número de unidades experimentales 4
- Muestras de semen por unidades experimentales: 24
- Total de muestras para DBA: 288

3.1.2.4 Caracterización de la unidad de análisis

Las unidades de análisis estuvieron compuestas por pajuelas de 0,25mL de capacidad cargadas de semen ovino procesado en los 4 tratamientos a una concentración de 400 millones de espermatozoides/mL en un total de 288 pajillas para el experimento.

3.1.2.4.1 Variables a analizar

Se evaluó y comparo la calidad espermática en el proceso de criopreservación mediante la determinación de:

- a) Variables independientes.
 - Tratamientos
- b) Variables dependientes.
 - Motilidad individual progresiva: porcentaje.
 - Vitalidad: porcentaje.
 - Morfología: porcentaje.
 - Test de HOS: porcentaje.

3.1.2.5 Raza del semental

La raza empleada en este estudio fue merino, que se caracteriza por tener un pelaje de color blanco uniforme, con gran desarrollo muscular, perfil recto o subconvexo, mesomorfos y tamaño grande

3.1.2.6 Criterios de selección de los ovinos

Para la selección de los ovinos se tomó en cuenta los siguientes parámetros establecidos para la investigación:

- De 2 a 5 años de edad
- Una condición corporal de 3 a 4 en una escala de 1 a 5
- Sin patologías reproductivas
- Sin anomalías físicas
- Un buen estado de salud

3.1.2.7 Preparación de semental para la colecta de semen

La preparación de los reproductores se empezó 17 días antes de la primera colecta junto con la aplicación de reconstituyentes vitamínicos y su respectiva desparasitación. Posteriormente se tomó el eyaculado una vez por semana durante un mes y medio. La alimentación de los reproductores consistió en pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), rye-grass (*Lolium perenne*), pasto azul (*Poa pratensis*) y trébol (*Trifolium*), durante todo el experimento, es primordial señalar que los animales estuvieron separados del resto de los animales, para evitar montas no dirigidas o peleas con otros ovinos.

3.1.2.8 Criterios de inclusión

Se incluyeron en la investigación, eyaculados de coloración blanco-lechoso, consistencia cremosa, con motilidad masal de 4 y 5 (en escala de 0 a 5), volumen mayor a menor 1mL, concentración >800 millones/mL, motilidad individual progresiva de 50% y libre de partículas extrañas.

3.1.2.9 Preparación de diluyentes

Para el proceso de congelación del semen, se emplearon dos diluyentes que fueron diferentes en su composición, cada uno fue subdividido en dos fracciones para posteriormente adicionar un antioxidante a una fracción, que se identificaron como T1, T2, T3 y T4

a) Preparación de Andromed

El diluyente se mezcló en relación 1(3mL):4(12mL) con agua destilada estéril previamente temperada en baño maría a 37°C durante 5 minutos. Para lograr las propiedades optimas de conservación de Andromed, la cantidad requerida de agua debía agregarse al concentrado y no viceversa. Al diluyente previamente preparado se subdividió en dos fracciones a 7.5ml, en una de las fracciones se añadió 5mM de L-carnitina y fue trasladada a una placa térmica para mantener la temperatura.

b) Preparación de Triladyl

La solución se preparó una parte concentrado de Triladyl con tres partes de agua destilada previamente temperada en baño maría a 37°C durante 5 minutos. Para completar la preparación del diluyente, se agregó una parte de yema de huevo fresca en la solución (solución final = 1:3:1 Triladyl, agua destilada y yema de huevo). Para obtener la yema que debía ser fresca procedimos a romper la cascara luego se separó la clara, situando la yema sobre el papel absorbente, cuidando que no se rompa la membrana. El resto de la clara se terminaba de separar haciendo rodar a la yema suavemente sobre el papel. Atravesando la membrana de esta última con una jeringa, se extrajo la yema de huevo desde el interior y se enraso la cantidad necesaria. Una vez agregada la yema de huevo la solución se homogenizaba varias veces posterior trasladada a una placa térmica para mantener la temperatura adecuada.

3.1.2.10 Colección de semen

Para la colección de semen utilizó dos sementales adultos en la obtención de 6 eyaculados de cada ovino en un total de 12 eyaculados.

Antes de recolectar el semen a los carneros, se cortó la lana alrededor de prepucio y se limpió toda el área adyacente de mismo para evitar la contaminación de la muestra. La colección de semen se realizó por el método de vagina artificial atemperada a unos 42°C – 44°C y en uno de sus extremos se colocó un tubo colector falcón. Además de la vagina artificial se empleó una hembra para simular la monta. Luego de la colecta el semen fue colocado en la placa térmica a 37°C para igual su temperatura con la de sus diluyentes previamente ubicados en la placa térmica.

3.1.2.11 Evaluación de semen

Una vez extraído el semen de los ovinos se procedió a su evaluación antes de la criopreservación bajo los siguientes aspectos.

a) Evaluación macroscópica

La evaluación de las características macroscópicas y microscópicas para cada eyaculado se realizó en las muestras inmediatamente después de la colección, esto gracias a la cercanía del laboratorio y las instalaciones en dónde se mantuvieron y colectaron a los animales.

- Volumen

Se realizó en la medida del tubo colector de capacidad de 15mL

- Color

Para evaluar el color se realizó mediante método de observación directa en el tubo colector.

- PH

Medida utilizando tiras reactivas de rango 6,5 a 10,0. Tras depositar una gota en dicha tira esperamos 30s y comparamos el color de la tira con la escala.

b) Evaluación microscópica

- Concentración

Para su determinación se utilizó la cámara de Neubauer, en un tubo eppendorf se mezcló 600 micro litros de agua y se añadió 3 micro litros de semen empleando una pipeta. Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer seguidamente se colocó 10 micro litros de la muestra, por capilaridad se distribuyó entre el espacio existente entre la cámara de Neubauer y el cubreobjetos. En el microscopio a un objetivo de 400x de aumento se realizó el conteo de los espermatozoides de cinco

cuadros grande de las cuatro esquinas y el del centro, luego se procedió a calcular la concentración con la siguiente formula:

$$\text{Concentración} = X \times 5 \times 10 \times 400 \times 100 \times$$

X = número de espermatozoides contados

5 = valor para obtener el número de espermatozoides en 400 cuadros pequeños

10 = para obtener la cantidad en 1mm³ ya que la profundidad de la cámara es de 0,10mm

400 = según la dilución realizada para el contaje

1000 = para obtener la concentración en mililitros.

- Motilidad espermática

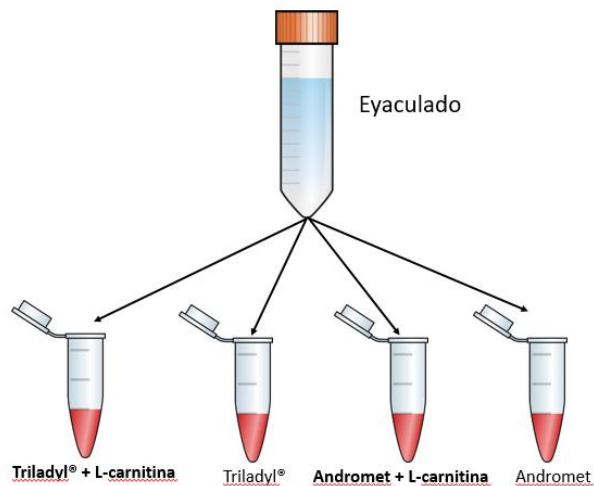
La motilidad masal de los espermatozoides se evaluó, inmediatamente después de la colección, para proceder al congelamiento de un eyaculado, la motilidad masal debe ser de 3 o mayor. Se colocó una muestra de semen de 10 a 20 microlitros sobre una lámina portaobjetos previamente temperado a 37 ° C, la misma fue observada al microscopio directamente con el objetivo 4x y se determinó la motilidad en masa de manera subjetiva en la escala del 0 a 5. Para determinar la Motilidad Individual Progresiva se colocó 10 microlitros en porta y cubre objetos, fue observado con un objetivo 10X de un microscopio y se determinó de manera subjetiva la motilidad individual progresiva en porcentaje.

3.1.2.12 Procesamiento de semen

Una vez obtenido el semen, se hizo la evaluación macroscópica y microscópica, para luego continuar con el proceso que culminó con la evaluación de semen descongelado.

- Preparación de diluyentes

Obtenido el eyaculado se tomó una alícuota para las evaluaciones respectivas en semen puro e inmediatamente se procedió a una predilución agregando 400 microlitros de semen en 1ml del de cada diluyente y se procedió a agitar para que se incorpore la muestra. El diluyente como el semen se colocó en la platina térmica a 37 ° C para que al momento de la dilución final se tenga una temperatura similar.



Fuente: (Morocho, 2021)

Fig 4. Preparación de diluyentes

3.1.2.13 Periodo de congelación del semen

Los periodos en la congelación de semen del ovino están dados por periodos de enfriamiento, equilibrio y empajillado

- Fraccionamiento de semen en pajillas.

Se homogenizo el semen diluido antes de proceder al llenado en las pajillas. Las pajillas de 0,25mL identificadas anteriormente con el número del reproductor, numero de repetición y su respectivo tratamiento, se cargó mediante la aspiración con una jeringuilla estéril. El exceso de la muestra en la pajilla se extrajo con una jeringa de insulina. Para proceder el sellado de las pajillas, se las tomaron del extremo sin tapón y se colocó en el sellador de fundas uno a uno durante 8 segundos y se acomodó en las rejillas de una rampa de acuerdo a los tratamiento para su posterior equilibrado.

- Equilibrado

Una vez terminado el proceso de colocar el semen en pajillas se procedió a seguir el siguiente esquema de equilibrado. Se trasladó las pajillas colocadas anteriormente en una rampa, hacia el refrigerador a 4°C de temperatura en la que se mantuvo por un periodo de 2 horas para su equilibrio antes de la congelación.

- Congelación

Transcurrido el tiempo de equilibrio se procedió con la congelación la cual se realizó en una caja térmica de poliuretano 70 cm x 36 cm x 46 cm.

Procedimiento

- a) Se preparó una caja térmica de poliuretano, agregando nitrógeno líquido hasta una altura de 5 cm en la caja.

- b) Se extrajo la rampa de refrigerador y se colocaron de forma horizontal sobre el nitrógeno líquido, donde recibieron el vapor estático nitrógeno líquido por un tiempo de 10 minutos.
- c) Una vez cumplido el tiempo de 10 min las pajillas fueron sumergidas rápidamente en el nitrógeno líquido lo cual permitió que el vapor del nitrógeno envolviera por completo las pajillas obteniéndose una congelación uniforme.
- d) Las pajillas congelados fueron ubicadas en los globlets luego en los canutos previamente identificadas y posteriormente fue inducidas y colocadas en las canastillas dentro del tanque de nitrógeno, para ser almacenado a -196°C hasta su posteriores evaluaciones.

3.1.2.14 Descongelación

El semen congelado almacenado en el tanque de nitrógeno a -196°C fue retirado individualmente para su descongelación y posterior evaluación.

Procedimiento

- a) Utilizando una pinza se procedió a sacar la pajilla fue sumergida en baño maría (descongelado de semen) a 37°C por un tiempo de 60 segundos.
- b) Posteriormente se secó con papel toalla, corto uno de los extremo de la pajueta y se vertió en un tubo eppendorf, estando lista para el proceso de evaluación microscópica.

3.1.2.15 Evaluación de semen post descongelación

Las pruebas a evaluar son las siguientes.

3.1.2.15.1 Motilidad individual progresiva

Se valoró la motilidad individual progresiva expresada en porcentajes y se determinó por observación en el microscopio óptico adaptada una cámara para visualizar en un monitor a un aumento de 20X y 40X, colocándose 10 μl de semen post congelado sobre la lámina de porta objetos y cubierto con porta objetos previamente calentados a 37°C .

3.1.2.15.2 Relación de espermatozoides vivos/muertos.

Se evaluó la morfología y la vitalidad de los espermatozoides después de la descongelación, como se describe para los espermatozoides. Se mezcló una gota de 5 μl de esperma descongelado con una gota de Eosina-Nigrosina, luego se hizo un frotis en un portaobjetos y luego se colocó en una placa térmica a 37°C . Después de unos segundos, se observó al microscopio óptico, que una cámara era adecuada para ver la imagen en una pantalla. Se contaron 100 espermatozoides y se determinaron los porcentajes de espermatozoides vivos (cabeza blanca) y muertos (con cabeza rosada).

3.1.2.15.3 Morfología

Posteriormente, también se realizó un conteo de 100 espermatozoides, utilizando la misma placa en la que se evaluó la vitalidad de los espermatozoides, se evaluó el porcentaje de células anormales y la cola curva de los espermatozoides.

3.1.2.15.4 Test hipo-osmotico HOST

La prueba HOST se realizó como se describe a continuación: Se incubó una alícuota de 20 μ l de semen descongelado de cada ovino en un baño de agua a 37 ° C durante 45 minutos, utilizando tubos Ependorf, diluidos con 100 μ l de solución hipoosmótica, que contenía 0,090 g / l de D fructosa y 0,049 g / l de citrato de sodio, agua bidestilada, peso osmolar 55 mOsm / l (miliosmoles / litro). Transcurrido el tiempo indicado, se colocó 10 μ l en el portaobjetos, para posteriormente ser visualizada mediante un microscopio óptico (100X), el cual contaba con una cámara adaptada para su observación. La evaluación se expresó en porcentajes, teniendo en cuenta una respuesta positiva a los diferentes grados de curvatura de las colas espermáticas, haciendo un recuento de 100 espermatozoides por muestra y los de cola recta resultaron negativos.

3.1.2.16 Análisis estadístico

Para la comparación de las características seminales de semen fresco de los ovinos del estudio se utilizó un análisis de varianza (ADEVA) a un nivel de significancia 5%. Asimismo, para la comparación de tratamientos luego de la congelación de semen se utilizó el procedimiento GLM (Modelo Lineal General) seguido de un Test de Tukey a un nivel de significancia 5%. Para presentar los resultados se utilizaron la Media, Desviación Estándar y el Intervalo de Confianza para la Media al 95%. Todas las pruebas estadísticas fueron desarrolladas en el SPSS versión 23.

CAPÍTULO 4

4.1. RESULTADOS

En la Tabla 1 se encuentran los promedios \pm la desviación estándar de las características seminales previo a la congelación en los ovinos utilizados en el experimento. El pH fue la única variable en la que existió diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) entre los ovinos del ensayo; todas las demás mostraron un comportamiento similar y no hubo diferencia entre ovinos.

Tabla 1 Características de semen fresco de los ovinos utilizados en el estudio

Ovino	N	Volumen (mL)	pH	Concentración ($\times 10^9/\text{mL}$)	Motilidad Masal (1-5)	MIP (%)
1	6	$1,4 \pm 0,46$	$6,8 \pm 0,40^a$	$3346,7 + 379,51$	$4,8 \pm 0,26$	$91,7 \pm 6,05$
2	6	$1,1 \pm 0,32$	$6,3 \pm 0,41^b$	$3438,3 + 390,41$	$4,6 \pm 0,58$	$87,5 \pm 5,24$
Total	12	$1,3 \pm 0,40$	$6,6 \pm 0,46$	$3392,5 + 370,19$	$4,7 \pm 0,45$	$89,6 \pm 5,82$

MIP: Motilidad Individual Progresiva. Los datos mostrados son la media \pm desviación estándar. Letras diferentes (a, b) en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$), según ADEVA.

La primera variable analizada en el estudio luego de la congelación fue la Motilidad Individual Progresiva (Tabla 2). En la que se determinó que las muestras congeladas con Triladyl independientemente de si se les agregó o no L-Carnitina, fueron superiores estadísticamente ($p < 0,01$) a las congeladas con Andromed. Sin embargo, no se evidenció diferencias estadísticas significativas con el uso o no de L-Carnitina cuando se comparó los resultados de cada diluyente.

Tabla 2 Motilidad Individual Progresiva de los espermatozoides congelados de ovinos con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.

Tratamiento	N	Media (%)	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95%	
				Inferior	Superior
Triladyl + LC	12	$76,3^a$	8,56	67,99	84,50
Triladyl	12	$76,3^a$	12,99	67,99	84,50
Andromed + LC	12	$5,2^b$	4,37	2,39	7,94
Andromed	12	$4,2^b$	2,98	2,27	6,06
Triladyl	24	$76,3^a$	10,76	71,71	80,79

Andromed	24	4,7 ^b	3,69	3,11	6,23
Con LC	24	40,7	36,91	25,13	56,30
Sin LC	24	40,2	37,95	24,18	56,24

LC: L-Carnitina. Letras diferentes (a, b) en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas ($p < 0,01$) entre tratamientos.

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de Vitalidad de las muestras seminales congeladas con Andromed y Triladyl, con y sin L-Carnitina. En la misma se puede observar que las muestras congeladas con Triladyl y Triladyl + L-Carnitina superaron estadísticamente ($p < 0,01$) a las congeladas con Andromed y Andromed + L-Carnitina en cuanto a cantidad de espermatozoides vivos.

Tabla 3 Vitalidad de los espermatozoides congelados de ovinos con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.

Tratamiento	N	Media (%)	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95%	
				Inferior	Superior
Triladyl + LC	12	35,57 ^a	11,60	28,20	42,95
Triladyl	12	40,92 ^a	13,55	32,30	49,53
Andromed + LC	12	5,47 ^b	5,74	1,82	9,11
Andromed	12	4,09 ^b	4,03	1,54	6,65
Triladyl	24	38,24 ^a	12,64	32,91	43,58
Andromed	24	4,78 ^b	4,9	2,71	6,85
Con LC	24	20,52	17,79	13,01	28,03
Sin LC	24	22,50	21,20	13,55	31,45

LC: L-Carnitina. Letras diferentes (a, b) en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas ($p < 0,01$) entre tratamientos.

En cuanto a la cantidad de Anormalidades sigue la misma tendencia de las pruebas anteriores de Motilidad Individual Progresiva y Vitalidad. Se puede observar en la Tabla 4 que en los tratamientos Triladyl y Triladyl +L-Carnitina tienen un menor porcentaje de espermatozoides anormales ($p < 0,01$) con respecto a los otros dos tratamientos con Andromed y Andromed + L-Carnitina. No obstante, se observa que la adición de L-Carnitina no presentó mejoría en la cantidad de espermatozoides anormales en ninguno de los diluyentes utilizados.

Tabla 4 Anormalidades de los espermatozoides congelados con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.

Tratamiento	N	Media (%)	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95%	
				Inferior	Superior
Triladyl + LC	12	9,54 ^a	7,91	4,51	14,57
Triladyl	12	8,14 ^a	4,08	5,54	10,73
Andromed + LC	12	18,57 ^b	8,91	12,90	24,23
Andromed	12	19,28 ^b	10,51	12,60	25,95
Triladyl	24	8,83 ^a	6,20	6,22	11,46
Andromed	24	18,92 ^b	9,54	14,89	22,95
Con LC	24	14,05	9,44	10,07	18,04
Sin LC	24	13,70	9,65	9,63	17,78

LC: L-Carnitina. Letras diferentes (a, b) en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas ($p < 0,01$) entre tratamientos.

Al analizar la Integridad de las membranas espermáticas evaluado a través del test de HOS (Tabla 5), se estableció que la adición de la L-Carnitina en los diluyentes Triladyl y Andromed no presenta un incremento de la cantidad de espermatozoides con la membrana íntegra. Sin embargo, aquellos espermatozoides congelados con Triladyl y Triladyl + L-Carnitina tuvieron una mayor cantidad de espermatozoides con las membranas íntegras ($p < 0,01$) con respecto a los criopreservados con Andromed y Andromed + L-Carnitina.

Tabla 5 Integridad de las membranas (Test de HOS) de los espermatozoides congelados con L-carnitina usando Triladyl y Andromed como diluyentes.

Tratamiento	N	Media (%)	Desviación Estándar	Intervalo de Confianza 95%	
				Inferior	Superior
Triladyl + LC	12	32,31 ^a	7,60	27,48	37,14
Triladyl	12	31,27 ^a	6,70	27,02	35,52
Andromed + LC	12	5,46 ^b	3,52	3,23	7,70
Andromed	12	4,40 ^b	3,14	2,40	6,39
Triladyl	24	31,78 ^a	7,02	28,82	34,75
Andromed	24	4,92 ^b	3,30	3,53	6,32

Con LC	24	18,89	14,89	12,60	25,17
Sin LC	24	17,83	14,64	11,65	24,01

LC: L-carnitina. Letras diferentes (a, b) en la misma columna muestra diferencias estadísticas significativas ($p < 0,01$) entre tratamientos. En esta tabla 5 se establece que al adicionar la L-carnitina en los diluyentes Triladyl y Andromed no presenta un incremento de la cantidad de espermatozoides con la membrana integra.

CAPÍTULO 5

5.1. DISCUSIÓN

En esta investigación se estudió el efecto de la L-carnitina añadida en la criopreservación de semen ovino, en los siguientes diluyentes: Triladyl + L-carnitina, Triladyl, Andromed + L-carnitina y Andromed medida a través de la motilidad espermática progresiva, vitalidad, morfología y test HOST de los espermatozoides. En general nuestra hipótesis no pudo ser apoyada ya que el efecto de la L-carnitina fue aleatorio, es decir, no mejoró las características espermáticas post descongelación en ningún tratamiento utilizado.

Para el análisis de semen congelado se utilizaron 12 eyaculados de 2 ovinos las cuales fueron divididas en 4 fracciones para cada grupo de estudio obteniendo un promedio de volumen $1,3 \pm 0,40$, color blanco, aspecto lechoso, PH $6,6 \pm 0,46$, concentración espermática $3392,5 \pm 370,19$ millones/mL, motilidad masal $4,7 \pm 0,45$ y motilidad individual progresiva $89,6 \pm 5,82$, cumpliendo con las características propias de eyaculado para la especie ovina descrita por (Delgado, 2013), (Carrillo & Hernández, 2016) y (Eisen, Quintana, Medina, Morello, & Venturino, 2005), siendo aptas para criopreservación.

La motilidad espermática se valoró por observación directa al microscopio a 400 aumentos, en donde los mejores resultados se vieron en los dos primeros tratamientos $76,3 \pm 8,56\%$ para T1, $76,3 \pm 12,99\%$ para T2 versus $5,2 \pm 4,37\%$ para T3 y $4,2 \pm 2,98\%$ para T4 manifestando que no hay diferencia estadística significativa post descongelación sobre este parámetro, cuando se agrega la L-carnitina solo se diferencia entre diluyentes. El porcentaje para T1 es similar con el estudio realizado por (de Souza, y otros, 2019), quien reporta $30,4 \pm 1,0\%$ de motilidad utilizando como agente crio protector a la L-carnitina en diferentes concentraciones y tres diferentes tiempos de incubación en donde no afectó de manera consistente en ningún grupo y ninguna concentración.

Por el contrario en humanos (Banihani, Sharma, Bayachou, Sabanegh, & Agarwal, 2011) y en gatos (Manee-in, y otros, 2014) la motilidad de los espermatozoides mejoró después de la suplementación con L-carnitina quizá esto podría estar relacionado con un efecto de especie o con la concentración utilizada en cada estudio.

Nuestra hipótesis fue que durante la criopreservación, la suplementación de la L-carnitina promovería las características cinéticas de los espermatozoides post congelación, debido a su función como proveedor de energía y al ser un facilitador para el transporte de ácidos grasos activado en la matriz mitocondrial para la oxidación β . Quizá las concentraciones utilizadas en esta investigación no fueron suficientes para mejorar el esperma de ovino. La suplementación de la L-carnitina en la criopreservación de semen se ha probado previamente en búfalo (Longobardi, y otros, 2017), pollo (Partyka, Rodak, Bajzert, Kochan, & Nihański, 2017), gato (Manee-in, y otros, 2014), humanos (Banihani, Sharma, Bayachou, Sabanegh, & Agarwal, 2011) y gallos (Fattah, Sharafi, Masoudi, Shahverdi, & Esmaeili, 2017) entre otros obteniendo resultados satisfactorios.

El porcentaje de T2 después de la descongelación fue superior a lo reportado por Apaza (2017) quien logro 56.08% de motilidad a su vez en esta investigación obtuvieron porcentajes superiores de lo que reporto (Santiani, y otros, 2007) quienes lograron un 42.36%(sin antioxidante) y 47.92% (con el antioxidante Tempo), estas diferencias probablemente se debe al tipo de antioxidante usado y sumado a esto que el mencionado autor realizo la congelación exponiendo pajillas a 15cm, sobre el nitrógeno líquido durante 15 minutos; por lo que a mayor tiempo de exposición de las pajillas a los vapores de nitrógeno líquido causa una mayor deshidratación de los espermatozoides, por lo tanto un mayor shock osmótico

El porcentaje de vitalidad espermática evaluada por la integridad y calidad de la membrana de espermatozoides, mediante la técnica de tinción con Eosina-Nigrosina presento un promedio $35,57 \pm 11,60\%$ para T1, $40,92 \pm 13,55\%$ para T2, $5,47 \pm 5,74\%$ para T3 y $4,09 \pm 4,03\%$ para T4. En el presente trabajo se muestra una superioridad de T1 y T2 frente a T3 y T4, es probable que sea el efecto de la composición química de la yema de huevo ayudando a mantener mejor la vitalidad (factor de conservación) esta protección se debe a su adhesión a la membrana plasmática especialmente por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se asocian con la membrana del espermatozoide y proveen protección para estabilizar en la membrana (Santiani, y otros, 2007).

El resultado obtenido para T1 es ligeramente inferior a lo reportado por (Partyka, Rodak, Bajzert, Kochan, & NihaNski, 2017) quienes obtuvieron $44,82 \pm 5,2$ de espermatozoides vivos con acrosoma intacto en pollos, pudiendo deberse que en concentraciones bajas la L-carnitina protege el esperma de pollo con la muerte celular, pero en dosis alta se podría provocar la muerte celular. Sin embargo, son escasos los estudios en los que se evaluó la vitalidad espermática después de la suplementación de L-carnitina. Mientras que el porcentaje de promedio de vitalidad del T2 es similar a las que han obtenido (Castillo, 2017) las cuales reportan 56.58 por ciento para T1, 60.70 para T2 y de 66.23 para T3 para las muestras tratadas al igual que (Cabrera, Ayulo, & Pantoja, 2011) obtuvieron resultados benéficos ya que al adicionar la yema de huevo en conservación tiene un efecto sobre el porcentaje de motilidad ya que las lipoproteínas de baja intensidad efectúan como crioprotectores contribuyendo contra el shock del frio y manteniendo a viabilidad y vitalidad del espermatozoide.

En las anomalías observadas microscópicamente a los espermatozoides de ovinos raza merino, analizando en las diferentes recolecciones presento un promedio de $9,54 \pm 7,91\%$ para T1 y $8,14 \pm 4,08\%$ para T2 lo que señala que los espermatozoides en general son de estructura normal, mientras que en el T3 con $18,57 \pm 8,91\%$ y T4 con $19,28 \pm 10,51\%$ mostrando que los espermatozoides en estos dos últimos tratamientos superan la cantidad permitida de anomalías (Delgado, 2013), determinado que se encontró espermatozoides, cola en látigo y cola en ovillo, mientras que en el porcentaje del tratamiento anterior indica que es bajo. En la investigación la adición de L-carnitina no afecto de forma benéfica en las anomalías mientras que el estudio realizado por (Bucak, y otros, 2010), donde al adicionar dicho antioxidante obtuvieron los porcentajes más bajos de anomalías así proporcionando un efecto crioprotector sobre el acrosoma espermática y la morfología total.

El tratamiento T2 es superior a la que presento (Escudero, 2015) quien obtuvo un promedio de $1,83 \pm 0,72$ % de anormalidad sin embargo esta dentro de los parámetros necesarios señalando que los espermatozoides en general son de estructura normal. Según Rodríguez, Toledo, Gómez, Santana, & Domínguez (2013), manifiestan que las anormalidades morfológicas espermáticas están relacionadas con la fertilidad o infertilidad del macho y también se asocia con las condiciones medioambientales que ocasionan estados de estrés.

Por su parte Escudero (2015) indica que las formas anormales se clasifican en anormalidades de cabeza de pieza intermedia y la cola. Gotas citoplasmáticas proximales o distales y cabezas sueltas normales muchas de las cuales no fueron identificados en el semen de carnero

La integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides congelados fue evaluada mediante el test de endosmosis positiva o HOST en todos los diluyentes empleados siendo T1 con $32,31 \pm 7,60\%$ y T2 $31,27 \pm 6,70\%$ y mucho menor en los grupos de T3 y T4 ($5,46 \pm 3,52\%$ y $4,40 \pm 3,14\%$, respectivamente). En cuanto a la prueba hipoosmótica, no encontramos ningún efecto protector de la L-carnitina. La suplementación con L-carnitina en el diluyente de semen en cabras (Bucak, y otros, 2010) y bovino mejoró la integridad acrosómica de los espermatozoides en el semen de congelación-descongelación. Esta variación puede estar relacionada con factores tales como especies, componentes de extensores, procedimientos de congelación y las diferentes concentraciones de antioxidantes utilizados.

CAPITULO 6

6.1. CONCLUSIÓN

Después de realizar los análisis correspondientes a las muestras concluimos que no se pudo evidenciar un efecto positivo de la adición de la L-carnitina en la criopreservación de semen ovino. De acuerdo a los resultados obtenidos no existe diferencia estadística significativa cuando se adiciona L-carnitina independientemente del diluyente utilizado. El tratamiento T1 y T2 fueron superiores en cuanto a la motilidad individual progresiva con relación al T3 y T4 en la cual no se evidencio diferencias cuando se comparó los resultados de cada diluyente. De la misma manera en cuanto a la vitalidad espermática el tratamiento T1 y T2 superan significativamente al tratamiento T3 y T4. En cuanto a las anormalidades sigue la misma tendencia de las pruebas anteriores observando que el T1 y T2 tienen menores porcentajes de espermatozoides anormales con respecto a los otros dos tratamientos T3 y T4. Al analizar la integridad de las membranas espermáticas evaluadas a través de test de HOTS los espermatozoides congelados con T1 y T2 tuvieron una mayor cantidad de espermatozoides con la membrana integras, con respecto a T3 y T4 quienes no presentan un incremento de las cantidades de espermatozoides con la membrana integra. No obstante, se concluye que la adición de L-carnitina como antioxidante en la crio conservación de espermatozoides en la especie ovina bajo nuestras condiciones de investigación no tuvo efectos beneficiosos en ninguno de los parámetros estudiados.

CAPÍTULO 7

7.1. RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos, se recomienda utilizar concentrado de Triladyl + yema de huevo ya que mantiene los mejores porcentajes de motilidad individual y esperma vivo.
- Se recomienda realizar más investigaciones en la congelación de semen ovino utilizando diferentes concentraciones de L-carnitina.
- Realizar pruebas más objetivas para tratar de determinar otros efectos específicos de la L-carnitina sobre los espermatozoides, tales como la evaluación de la cinética con el Sistema CASA y tinciones fluorescentes que determinen la integridad de cada parte del espermatozoide (membranas, acrosoma mitocondrias, etc.)
- Realizar ensayos y entrenamientos previos antes de congelación de semen para evitar cometer errores.
- Para la recolección de semen, se debe utilizar un maniquí o una oveja e buen estado de salud.
- Revisar que los equipos estén en buen funcionamiento.
- Que las herramientas y el equipo estén lo más limpios posible para evitar la contaminación del semen.
- Ser muy estricto acerca de mantener el semen a una temperatura adecuada

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, G., Amaro, K., & Hernández, G. (2013). *Evaluación de dos diluyentes para la conservación de semen ovino: yema de huevo vs Lecitina de soya*. Tesis de grado, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco.
- Aisen, E. (2004). *Reproducción ovina y caprina*. Buenos Aires, Republica Argentina: Inter-Médoca S.A.I.C.I.
- Aparicio, M., & Reus, R. (2017). *Fase de la espermatogenesis [Figura]*. Obtenido de <https://www.reproduccionasistida.org/espermatogenesis/>
- Apaza, L. (2017). *Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero*. Tesis de grado, Universidad Nacional del Antiplano, Puno.
- Ávalos, A., Vargas, A., Gonzáles, J., & Herrera, J. (2018). *Recolección manipulación seminal in vitro*. Xochimilco, Mexico: Calzada del hueso 1100.
- Avila, G., Ferrante, A., Miragaya, M., & Neild, D. (2016). Efecto de L carnitina y pirubato en espermatozoides equinos conservados a 5°C y 15°C por 24 horas: resultados preliminares. *Spermova*, 6(2), 123 - 127. doi:10.18548/aspe/0004.07
- Banihani, S., Sharma, R., Bayachou, M., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2011). Human sperm DNA oxidation, motility and viability in the presence of L-carnitine during in vitro incubation and centrifugation. *Andrologia*, 44(1), 505-512. doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01216.x
- Barrios, D. (Octubre 2002). Fisiología y reproducción. En L. Ramírez (presidencia), Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem en la Universidad Central de Venezuela. *Simposio llevado a cabo en el XI Congreso Venezolano de producción e Industria animal*. Velera, Venezuela.
- Batista, M., Santana, M., Álamo, D., Cabrera, F., González, F., & Gracia, A. (2013). Refrigeración y congelación seminal en la especie canina: ¿métodos independientes o adicionales? *Revista canaria de las ciencias veterinarias*, 1(8), 29 - 34. Obtenido de accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/12468/1/0280574_00008_0006.pdf
- Bedoya, N., Vásquez, N., Rivera, M., Correa, G., & Trujillo, L. (2003). Evaluación de la integridad funcional de la membrana plasmática de espermatozoides bovinos mediante el test hipoosmótico (HOTS). *Revistas.unal.edu.co*, 56(2), 1983 - 1997. doi:10.15446/rfnam
- Benítez, E., Chamba, H., Sánchez, E., Luzón, F., & Sánchez, J. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico Veterinario*, 1, 59 -74. doi:10.21929/abavet2018.81.
- Bucak, M., Sariözkan, S., Barbaros, P., Ahmet, F., Kulaksız, R., & Çevik, M. (2010). The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. *Elsevier*, 89, 24-30. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.11.015
- Bucak, M., Tuncer, P., Sariözkan, S., Baspınar, N., Taspınar, M., Çoyan, K., . . . Öztuna, D. (2010). Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61, 248-253. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.09.001

- Cabrera, P., Ayulo, A., & Pantoja, C. (2011). Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Rev. investig. vet. Perú*, 22(2), 1-8. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000200004
- Carpio, S. (2015). *Evaluación de dos diluyentes para la crioconservación de semen bovino: yema de huevo vs leche descremada*. Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca.
- Carrillo, D., & Hernández, D. (2016). Caracterización seminal de individuos ovinos criollos colombianos de pelo en el departamento de sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 8(2), 197 - 203. Obtenido de <https://revistas.unisucra.edu.co/index.php/recia/article/view/187/228>
- Carvajal, M., Cortés, H., Manrique, C., & Grajales, H. (2018). Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto Colombiano. *Rev. Med. vet.*, 18(36), 49 - 61. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.19052/mv.5171>
- Castillo, L. (2017). *Adición de metil-β-ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero*. Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.
- Castro, J., Chirinos, D., & Orellana, J. (2017). Calidad de semen refrigerado de carneros assaf y blackbelly. *Revista de investigaciones veterinarias del Perú*, 28(3), 764 - 770. doi:10.153813/rivep.v28i3.12581
- Catellón, E., Cesari, A., & Fornes, M. (2018). *Biología de la gema masculina*. Buenos Aires, Argentina: Mar del Plata.
- Cuenca Alcaldía. (2021). *Fundación turismo Cuenca*. Obtenido de <http://cuenca.com.ec/es/conoce-cuenca>
- Cueto, M., Gibbons, A., Bruno, M., & Fernandez, J. (2016). *Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino*. Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA.
- Cunningham, J. G., & Klein, B. G. (2009). *Fisiología Veterinaria*. España: Elsevier.
- de Souza, C., Brandão, F., Rodrigues, J., Pereira, V., Barbosa, V., de la Cruz Morais, M., . . . Gonçalves, J. (2019). Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*, 89, 104-108. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.05.009
- Delgado, B. (2013). *Evaluación espermática de semen de ovino tratada por la técnica de gradiente de densidad*. Tesis de grado, Universidad Ricardo Palma, Lima.
- Durairajanayagam, D. (2019). Physiological Role of Reactive Oxygen Species in Male Reproduction. *ScienceDirect*, 1, 65 - 78. doi:10.1016/B978-0-12-812501-4.00008-0
- Duru, N., Morshedi, M., Schuffner, A., & Oehninger, S. (2000). Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertility and sterility*, 74(4), 715-720. doi:S0015-0282(00)01494-1
- Echegaray, J. (2009). *Anatomía funcional reproductiva del carnero*. Tesis de grado, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco.
- Eisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., & Venturino, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50(3), 239 - 249. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.02.002

- Escudero, J. (2015). *Preservación de semen ovino mediante vitrificación y congelamiento lento, utilizando diferentes diluyentes comerciales*. Tesis de grado , Riobamba.
- Fattah, A., Sharafi, M., Masoudi, R., Shahverdi, A., & Esmaeili, V. (2017). L-carnitine is a survival factor for chilled storage of rooster semen for a long time. *Cryobiology*, 74, 13 - 18. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.12.011.
- Fernandez, A., Gonzalvo, M., Clavero, A., Assín, R., Zamora, S., Roldán , M., . . . Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *Asebir*, 14(1), 17 - 25. Obtenido de revista.asebir.com/assets/asebir-junio-2009.pdf
- Gonzales, K. (2019). *Características anatómicas del sistema reproductor del macho [Figura]*. Obtenido de <https://zoovetespasion.com/libros-zootecnia-veterinaria/libro-reproduccion-ovina-y-caprina/>
- Google earth. (2021). *Imagen de Ubicación de la Universidad catolica de Cuenca [Imagen]*. Obtenido de <https://earth.google.com/web/@-2.88160384,-78.95869284,2469.0690865a,688.24750232d,35y,0h,0t,0r>
- Guerrero , H., Huanca, W., Huerta, S., & Ramos, D. (2009). Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 20(1), 41 - 46.
- Hidalgo, C., Tamargo, C., & Diez, C. (2005). Análisis del semen ovino. *Tecnología agroalimentaria. ResearchGate*(2), 39 - 43. Obtenido de <https://ria.asturias.es/RIA/handle/123456789/192>
- Ibañez, F., Lisarrague, C., Callejas, S., & Cabodevila, J. (2016). *Inseminación Artificial a Tiempo Fijo: ¿Conviene utilizar semen "fresco" en lugar de congelado?* Tesis de grado, Facultad de Ciencias Veterinarias -UNCPBA-, Tandil.
- Inatec. (2018). *Manejo productivo y reproductivo en bovinos, ovinos, caprinos y equinos*. Recuperado de: https://www.tecnacional.edu.ni/media/Manual_Bovino_y_Caprino_opt.pdf.
- Konig, H., & Liebich, H. (2008). *Anatomía de los animales domesticos*. Madrid: Medica Panamericana S.A.
- Ledesma, A. (2012). *Efecto del método de colecta de semen y de plasmaseminal sobre la supervivencia posdescongelación de espermatozoides ovinos*. Tesis de grado , Facultad de Ciencias Agrarias-Universidad Nacional de Mar Del Plata, Balcarce, Argentina.
- Lema, E., & Cacuangó , G. (2012). *Crecimiento y desarrollo de ovinos corriedale estabulados utilizando tres mezclas forregeras al corte, en el sector de peguche del cantón Otavalo*. Ibarra: Universidad Técnica de Norte.
- Longobardi, V., Salzano, A., Campanile, G., Marrone, R., Palumbo, F., Vitiello, M., . . . Gasparrini, B. (2017). Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology*, 88, 236-243. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.09.031.
- Manee-in, S., Parmornsupornvichit, S., Kraiprayoon, S., Tharasanit, T., Chanapiwat, P., & Kaeoket , K. (2014). L-carnitine supplemented extender improves cryopreserved-thawed cat epididymal sperm motility. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(6), 791 - 796. doi:10.5713/ajas.2013.13565
- Martinez, E., Ruiz, S., Roca, J., & Vazquez, J. (1987). *Fecundación "in vitro " en los animales de granja*. Murcia: ISBN: 84-7687-189-2.

- Matás, C., García-Vázquez, F., Sansegundo, M., Gadea, J., Coy, P., & Ruiz, S. (2007). Estudio de la capacitación espermática in vitro en espermatozoides eyaculados y epididimales. *Itea*, 1(28), 30 -32. Obtenido de https://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2007/comunicaciones/2007_Rep_10.pdf
- Medina, R., Velasco, Y., & Cruz, P. (2005). Aspectos generales de la criopreservación espermática en peces teleosteos. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*, 18(1), 34 - 48. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v18n1/v18n1a05.pdf>
- Mercado, E. (2011). *Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de criopreservación espermática en porcino ibérico*. Tesis de maestría, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- Mesa, E. (2011). *Criopreservación de semen ovino utilizando aloe vera como coadyuvantes del producto comercial trilanyl en concentraciones del 10% y 30%*. Tesis de grado, Fundación Universitaria Juan de Castellanos, Tunja.
- MINITUBE. (2021). *Diluyente sin yema de huevo para semen bovino*. Recuperado el 11 de 01 de 2021, de <https://www.minitube.es/productos/camelidos/diluyentes-de-semen/andromed-200-ml>
- MINITUBE. (2021). *Extender concentrates for preparation of egg yolk containing media for bull semen freezing*. Recuperado el 10 de 01 de 2021, de <https://www.minitube.com/products/bovine/semen-extenders/triladyl-250-g>
- Morocho, V. (2021). *Predilución y dilución de los diluyentes [Figura]*.
- Muñoz, R. (2010). *Evaluación de la motilidad y viabilidad del semen ovino mediante el uso de sistemas casa y citometría de flujo: identificación de subpoblaciones espermáticas*. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Galicia.
- Orozco, J. (2017). *Características de la pubertad en ovinos machos de pelo Colombiano y sus cruces con Katahdin y Santa*. Trabajo de grado, Universidad de la Salle.
- Partyka, A., Rodak, O., Bajzert, J., Kochan, J., & Nihański, W. (2017). The Effect of L-Carnitine, Hypotaurine, and Taurine Supplementation on the Quality of Cryopreserved Chicken Semen. *BioMed Research International*, 2017, 1 - 8. doi:10.1155/2017/7279341
- Porras, A., & Páramo, R. (2009). *Manual de prácticas de reproducción animal*. Coyoacán, México: UNAM. doi:10.1016/j.cryobiol.2019.05.009
- Rodríguez, B., Toledo, C., Gómez, M., Santana, P., & Domínguez, E. (2013). Alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos por microscopía electrónica de barrido. *Revista Cubana de Endocrinología*, 28(2), 1-4. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532013000200005
- Rodríguez, L., Álvarez, M., & Boixo, J. (Abril 2016). Bases fisiológicas y características reproductivas de las especies ovina y caprina. *Trabajo presentado en el X curso teórico-práctico de reproducción e inseminación artificial en ganado ovino y caprino en la universidad de León*. Zamora.
- Ruiz, G. L., Sandoval, M. R., & Santiani, A. A. (2015). Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdescongelación al emplear dos fuentes energéticas y dos crioprotectores. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 26(1), 49 - 56. doi:10.15381/rivep.v26i1.10942
- Sadler, T. w. (2012). *Embriología Médica*, 12ª ed. Barcelona, España: Lippincott/Williams & Wilkins.

- Santiani, A., Ruiz, F., Sandoval, R., Evangelista, S., Urviola, M., Catacora, N., . . . Delgado, A. (2007). Incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1-4. Obtenido de http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/19-Santiani.pdf
- Tabarez, A. (2014). *Optimización del protocolo de criopreservación de semen caprino de la raza autóctona en peligro de extinción blanca de rasquera*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona.
- Tapia, L. (2014). *Valoración seminal en ovinos de raza corriedale y mestizos en le porroquia Cochapamba del Cantón Saquisilí*. Tesis de grado, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga.
- Tello, E. (2015). *Efecto del diluyente sobre la viabilidad espermática para la conservación de semen a diferentes temperaturas en caninos*. Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato, Ceballos.
- Trigoso, M. (2017). *Efecto del uso de dos dilutores (agua de coco y leche descremada) para la viabilidad espermática en semen fresco de bovinos*. Tesis de grado, Chachapoyas.
- Valdez, D. (2013). *Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado*. Tesis de grado, Cuenca.
- Vieira, C., Zandonadi, F., Rodrigues, J., Pereira, V., Barbosa, V., Cruz, M., . . . Goncalvez, J. (2019). Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. *Cryobiology*, 89, 104 - 108. doi:10.1016 / j.criobiol.2019.05.009
- Vilca, M. (2019). *La importancia de la capacitación espermática en la alpaca*. Tesis de grado, Universidad Científica del Sur, Lima.

ANEXOS

Anexo A. Estadísticos descriptivos de las variables analizadas en semen fresco obtenidos del programa estadístico SPSS.

		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
Repetición	1,00	6	3,5000	1,87083	,76376	1,5367	5,4633	1,00	6,00
	2,00	6	3,5000	1,87083	,76376	1,5367	5,4633	1,00	6,00
	Tota	12	3,5000	1,78377	,51493	2,3666	4,6334	1,00	6,00
Volumen	1,00	6	1,3750	,45580	,18608	,8967	1,8533	,60	2,00
	2,00	6	1,1000	,32249	,13166	,7616	1,4384	,80	1,50
	Tota	12	1,2375	,40290	,11631	,9815	1,4935	,60	2,00
Color	1,00	6	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
	2,00	6	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00

	Tota	12	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Ph	1,00	6	6,8167	,40208	,16415	6,3947	7,2386	6,00	7,00
	2,00	6	6,3333	,40825	,16667	5,9049	6,7618	6,00	7,00
	Tota	12	6,5750	,46147	,13321	6,2818	6,8682	6,00	7,00
Concentración (x106)	1,00	6	3346,6667	379,50845	154,93368	2948,3970	3744,9364	2890,00	3900,00
	2,00	6	3438,3333	390,40577	159,38249	3028,6276	3848,0391	3000,00	3900,00
	Tota	12	3392,5000	370,18730	106,86387	3157,2942	3627,7058	2890,00	3900,00
Motilidad Masal (1-5)	1,00	6	4,8333	,25820	,10541	4,5624	5,1043	4,50	5,00
	2,00	6	4,5833	,58452	,23863	3,9699	5,1968	3,50	5,00
	Tota	12	4,7083	,45017	,12995	4,4223	4,9944	3,50	5,00
Motilidad Individual Progresiva (%)	1,00	6	91,6667	6,05530	2,47207	85,3120	98,0213	80,00	95,00
	2,00	6	87,5000	5,24404	2,14087	81,9967	93,0033	80,00	95,00

Tota	12	89,5833	5,82250	1,68081	85,8839	93,2828	80,00	95,00
------	----	---------	---------	---------	---------	---------	-------	-------

Anexo B. ANOVA de las variables de semen fresco

ANOVA

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Repetición	Entre grupos	,000	1	,000	,000	1,000
	Dentro de grupos	35,000	10	3,500		
	Total	35,000	11			
Volumen	Entre grupos	,227	1	,227	1,455	,255
	Dentro de grupos	1,559	10	,156		
	Total	1,786	11			
Color	Entre grupos	,000	1	,000		
	Dentro de grupos	,000	10	,000		
	Total	,000	11			

Ph	Entre grupos	,701	1	,701	4,269	,066
	Dentro de grupos	1,642	10	,164		
	Total	2,342	11			
Concentración (x106)	Entre grupos	25208,333	1	25208,333	,170	,689
	Dentro de grupos	1482216,667	10	148221,667		
	Total	1507425,000	11			
Motilidad Masal (1-5)	Entre grupos	,188	1	,188	,918	,360
	Dentro de grupos	2,042	10	,204		
	Total	2,229	11			
Motilidad Individual Progresiva (%)	Entre grupos	52,083	1	52,083	1,623	,231
	Dentro de grupos	320,833	10	32,083		
	Total	372,917	11			

Anexo C. Estadísticos descriptivos de las variables analizadas en el semen pos congelación

Descriptivos

	Tratamiento		Estadístico	Error estándar	
MIP	1,00	Media	76,2500	2,47143	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	70,8104	
			Límite superior	81,6896	
		Media recortada al 5%	76,6667		
		Mediana	80,0000		
		Varianza	73,295		
		Desviación estándar	8,56128		
		Mínimo	60,00		
		Máximo	85,00		
		Rango	25,00		
		Rango intercuartil	8,75		
		Asimetría	-1,247	,637	
		Curtosis	,481	1,232	
	2,00	Media	76,2500	3,75000	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	67,9963	
			Límite superior	84,5037	
		Media recortada al 5%	77,2222		
		Mediana	80,0000		
Varianza	168,750				

	Desviación estándar	12,99038	
	Mínimo	50,00	
	Máximo	85,00	
	Rango	35,00	
	Rango intercuartil	12,50	
	Asimetría	-1,635	,637
	Curtosis	1,396	1,232
3,00	Media	5,1667	1,26031
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	
		2,3927 7,9406	
	Media recortada al 5%	4,8519	
	Mediana	4,0000	
	Varianza	19,061	
	Desviación estándar	4,36585	
	Mínimo	1,00	
	Máximo	15,00	
	Rango	14,00	
	Rango intercuartil	7,25	
	Asimetría	1,218	,637
	Curtosis	,916	1,232
4,00	Media	4,1667	,86017
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	
		2,2734 6,0599	

	Media recortada al 5%	4,0185	
	Mediana	3,0000	
	Varianza	8,879	
	Desviación estándar	2,97973	
	Mínimo	1,00	
	Máximo	10,00	
	Rango	9,00	
	Rango intercuartil	5,75	
	Asimetría	,648	,637
	Curtosis	-,673	1,232
Vitalidad 1,00	Media	35,5717	3,35051
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior 28,1973 Límite superior 42,9461	
	Media recortada al 5%	35,1685	
	Mediana	35,4850	
	Varianza	134,711	
	Desviación estándar	11,60649	
	Mínimo	20,00	
	Máximo	58,40	
	Rango	38,40	
	Rango intercuartil	17,89	
	Asimetría	,454	,637
	Curtosis	-,531	1,232

2,00	Media	40,9150	3,91204
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior 32,3046	
		Límite superior 49,5254	
	Media recortada al 5%	40,8400	
	Mediana	43,6950	
	Varianza	183,649	
	Desviación estándar	13,55172	
	Mínimo	16,83	
	Máximo	66,35	
	Rango	49,52	
	Rango intercuartil	15,23	
	Asimetría	-,306	,637
	Curtosis	,550	1,232
3,00	Media	5,4708	1,65784
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior 1,8219	
		Límite superior 9,1197	
	Media recortada al 5%	5,0987	
	Mediana	2,3250	
	Varianza	32,981	
	Desviación estándar	5,74294	
	Mínimo	,83	
	Máximo	16,81	
	Rango	15,98	
	Rango intercuartil	10,32	

		Asimetría	1,027	,637
		Curtosis	-,592	1,232
4,00		Media	4,0942	1,16227
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	1,5360 6,6523
		Media recortada al 5%	3,7396	
		Mediana	2,4400	
		Varianza	16,210	
		Desviación estándar	4,02622	
		Mínimo	,90	
		Máximo	13,67	
		Rango	12,77	
		Rango intercuartil	4,00	
		Asimetría	1,667	,637
		Curtosis	2,144	1,232
Morfología	1,00	Media	9,5425	2,28381
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	4,5159 14,5691
		Media recortada al 5%	8,7250	
		Mediana	7,5950	
		Varianza	62,589	
		Desviación estándar	7,91135	
		Mínimo	2,30	
		Máximo	31,50	

	Rango	29,20	
	Rango intercuartil	6,50	
	Asimetría	2,179	,637
	Curtosis	5,630	1,232
2,00	Media	8,1367	1,17869
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	
		5,5424	
		10,7310	
	Media recortada al 5%	8,0685	
	Mediana	9,2250	
	Varianza	16,672	
	Desviación estándar	4,08311	
	Mínimo	2,65	
	Máximo	14,85	
	Rango	12,20	
	Rango intercuartil	7,83	
	Asimetría	,015	,637
	Curtosis	-1,376	1,232
3,00	Media	18,5650	2,57212
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	
		12,9038	
		24,2262	
	Media recortada al 5%	18,4594	
	Mediana	19,2900	
	Varianza	79,390	
	Desviación estándar	8,91009	

		Mínimo	6,03	
		Máximo	33,00	
		Rango	26,97	
		Rango intercuartil	17,53	
		Asimetría	-,029	,637
		Curtosis	-1,239	1,232
4,00		Media	19,2750	3,03376
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	12,5977 25,9523
		Media recortada al 5%	19,4461	
		Mediana	23,9600	
		Varianza	110,444	
		Desviación estándar	10,50924	
		Mínimo	3,44	
		Máximo	32,03	
		Rango	28,59	
		Rango intercuartil	19,52	
		Asimetría	-,377	,637
		Curtosis	-1,712	1,232
HOST	1,00	Media	32,3083	2,19489
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	27,4774 37,1393
		Media recortada al 5%	31,7954	

	Mediana	29,9750	
	Varianza	57,811	
	Desviación estándar	7,60334	
	Mínimo	24,34	
	Máximo	49,51	
	Rango	25,17	
	Rango intercuartil	12,63	
	Asimetría	1,180	,637
	Curtosis	,883	1,232
2,00	Media	31,2667	1,93133
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior Límite superior	27,0158 35,5175
	Media recortada al 5%	31,5707	
	Mediana	31,6550	
	Varianza	44,761	
	Desviación estándar	6,69034	
	Mínimo	16,50	
	Máximo	40,56	
	Rango	24,06	
	Rango intercuartil	9,74	
	Asimetría	-,778	,637
	Curtosis	,838	1,232
	Media	5,4625	1,01547

3,0 0	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	3,2275	
		Límite superior	7,6975	
	Media recortada al 5%		5,5039	
	Mediana		5,4500	
	Varianza		12,374	
	Desviación estándar		3,51770	
	Mínimo		,18	
	Máximo		10,00	
	Rango		9,82	
	Rango intercuartil		7,11	
	Asimetría		-,092	,637
	Curtosis		-1,410	1,232
	4,0 0	Media		4,3933
95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	2,4004	
		Límite superior	6,3862	
Media recortada al 5%		4,1837		
Mediana		3,7150		
Varianza		9,838		
Desviación estándar		3,13660		
Mínimo		,91		
Máximo		11,65		
Rango		10,74		

Rango intercuartil	4,69	
Asimetría	1,166	,637
Curtosis	1,320	1,232

Anexo D. Procedimiento GLM de las variables post congelación en los tratamientos.

Pruebas de efectos inter-sujetos

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	MIP	62192,333 ^a	9	6910,259	115,496	,000
	Vitalidad	14994,362 ^b	9	1666,040	23,739	,000
	Morfología	2650,648 ^c	9	294,516	7,250	,000
	HOST	8943,134 ^d	9	993,682	34,324	,000
Intersección	MIP	78570,083	1	78570,083	1313,197	,000
	Vitalidad	22214,668	1	22214,668	316,530	,000
	Morfología	9247,134	1	9247,134	227,635	,000
	HOST	16176,262	1	16176,262	558,764	,000
Tratamiento	MIP	61496,083	3	20498,694	342,609	,000
	Vitalidad	13618,207	3	4539,402	64,681	,000
	Morfología	1234,260	3	411,420	10,128	,000

	HOST	8670,616	3	2890,205	99,834	,000
Repeticion	MIP	252,167	5	50,433	,843	,528
	Vitalidad	1086,563	5	217,313	3,096	,019
	Morfologia	1197,122	5	239,424	5,894	,000
	HOST	264,343	5	52,869	1,826	,131
Ovino	MIP	444,083	1	444,083	7,422	,010
	Vitalidad	289,592	1	289,592	4,126	,049
	Morfologia	219,265	1	219,265	5,398	,026
	HOST	8,176	1	8,176	,282	,598
Error	MIP	2273,583	38	59,831		
	Vitalidad	2666,911	38	70,182		
	Morfologia	1543,660	38	40,623		
	HOST	1100,103	38	28,950		
Total	MIP	143036,000	48			
	Vitalidad	39875,941	48			

	Morfología	13441,441	48		
	HOST	26219,499	48		
Total corregido	MIP	64465,917	47		
	Vitalidad	17661,273	47		
	Morfología	4194,308	47		
	HOST	10043,237	47		

a. R al cuadrado = ,965 (R al cuadrado ajustada = ,956)

b. R al cuadrado = ,849 (R al cuadrado ajustada = ,813)

c. R al cuadrado = ,632 (R al cuadrado ajustada = ,545)

d. R al cuadrado = ,890 (R al cuadrado ajustada = ,865)

Pruebas multivariante^a

Efecto		Valor	F	Gl de hipótesis	gl de error	Sig.
Intersección	Traza de Pillai	,986	607,900 ^b	4,000	35,000	,000
	Lambda de Wilks	,014	607,900 ^b	4,000	35,000	,000
	Traza de Hotelling	69,474	607,900 ^b	4,000	35,000	,000
	Raíz mayor de Roy	69,474	607,900 ^b	4,000	35,000	,000
Tratamiento	Traza de Pillai	1,091	5,285	12,000	111,000	,000
	Lambda de Wilks	,024	24,116	12,000	92,893	,000
	Traza de Hotelling	36,413	102,158	12,000	101,000	,000
	Raíz mayor de Roy	36,281	335,596 ^c	4,000	37,000	,000
Repetición	Traza de Pillai	1,094	2,861	20,000	152,000	,000
	Lambda de Wilks	,222	3,354	20,000	117,032	,000
	Traza de Hotelling	2,185	3,659	20,000	134,000	,000
	Raíz mayor de Roy	1,361	10,342 ^c	5,000	38,000	,000
Ovino	Traza de Pillai	,195	2,114 ^b	4,000	35,000	,100

Medias marginales estimadas

Lambda de Wilks	,805	2,114 ^b	4,000	35,000	,100
Traza de Hotelling	,242	2,114 ^b	4,000	35,000	,100
Raíz mayor de Roy	,242	2,114 ^b	4,000	35,000	,100

- a. Diseño : Intersección + Tratamiento + Repetición + Ovino
- b. Estadístico exacto
- c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.

Gran media

Variable dependiente	Media	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
MIP	40,458	1,116	38,198	42,718
Vitalidad	21,513	1,209	19,065	23,961
Morfología	13,880	,920	12,017	15,742
HOST	18,358	,777	16,786	19,930

Anexo E. Test de Tukey de comparaciones múltiples de los tratamientos para variables post congelación

Comparaciones múltiples

HSD Tukey

Variable dependiente	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
MIP	1,00	2,00	,0000	3,15782	1,000	-8,4834	8,4834
		3,00	71,0833 [*]	3,15782	,000	62,5999	79,5668
		4,00	72,0833 [*]	3,15782	,000	63,5999	80,5668
	2,00	1,00	,0000	3,15782	1,000	-8,4834	8,4834
		3,00	71,0833 [*]	3,15782	,000	62,5999	79,5668
		4,00	72,0833 [*]	3,15782	,000	63,5999	80,5668
	3,00	1,00	-71,0833 [*]	3,15782	,000	-79,5668	-62,5999
		2,00	-71,0833 [*]	3,15782	,000	-79,5668	-62,5999
		4,00	1,0000	3,15782	,989	-7,4834	9,4834

	4,00	1,00	-72,0833*	3,15782	,000	-80,5668	-63,5999
		2,00	-72,0833*	3,15782	,000	-80,5668	-63,5999
		3,00	-1,0000	3,15782	,989	-9,4834	7,4834
Vitalidad	1,00	2,00	-5,3433	3,42008	,412	-14,5313	3,8446
		3,00	30,1008*	3,42008	,000	20,9129	39,2888
		4,00	31,4775*	3,42008	,000	22,2895	40,6655
	2,00	1,00	5,3433	3,42008	,412	-3,8446	14,5313
		3,00	35,4442*	3,42008	,000	26,2562	44,6321
		4,00	36,8208*	3,42008	,000	27,6329	46,0088
	3,00	1,00	-30,1008*	3,42008	,000	-39,2888	-20,9129
		2,00	-35,4442*	3,42008	,000	-44,6321	-26,2562
		4,00	1,3767	3,42008	,978	-7,8113	10,5646
	4,00	1,00	-31,4775*	3,42008	,000	-40,6655	-22,2895
		2,00	-36,8208*	3,42008	,000	-46,0088	-27,6329
		3,00	-1,3767	3,42008	,978	-10,5646	7,8113

Morfología	1,00	2,00	1,4058	2,60201	,949	-5,5844	8,3961
		3,00	-9,0225*	2,60201	,007	-16,0127	-2,0323
		4,00	-9,7325*	2,60201	,003	-16,7227	-2,7423
	2,00	1,00	-1,4058	2,60201	,949	-8,3961	5,5844
		3,00	-10,4283*	2,60201	,002	-17,4186	-3,4381
		4,00	-11,1383*	2,60201	,001	-18,1286	-4,1481
	3,00	1,00	9,0225*	2,60201	,007	2,0323	16,0127
		2,00	10,4283*	2,60201	,002	3,4381	17,4186
		4,00	-,7100	2,60201	,993	-7,7002	6,2802
	4,00	1,00	9,7325*	2,60201	,003	2,7423	16,7227
		2,00	11,1383*	2,60201	,001	4,1481	18,1286
		3,00	,7100	2,60201	,993	-6,2802	7,7002
HOST	1,00	2,00	1,0417	2,19659	,964	-4,8594	6,9428
		3,00	26,8458*	2,19659	,000	20,9447	32,7469
		4,00	27,9150*	2,19659	,000	22,0139	33,8161

2,00	1,00	-1,0417	2,19659	,964	-6,9428	4,8594
	3,00	25,8042*	2,19659	,000	19,9031	31,7053
	4,00	26,8733*	2,19659	,000	20,9722	32,7744
3,00	1,00	-26,8458*	2,19659	,000	-32,7469	-20,9447
	2,00	-25,8042*	2,19659	,000	-31,7053	-19,9031
	4,00	1,0692	2,19659	,962	-4,8319	6,9703
4,00	1,00	-27,9150*	2,19659	,000	-33,8161	-22,0139
	2,00	-26,8733*	2,19659	,000	-32,7744	-20,9722
	3,00	-1,0692	2,19659	,962	-6,9703	4,8319

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = 28,950.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

Anexo F. Estadísticos descriptivos y ANOVA para comparaciones entre diluyentes

Descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
MIP_Dil Triladyl	24	76,2500	10,75922	2,19622	71,7068	80,7932	50,00	85,00
Andromed	24	4,6667	3,69096	,75341	3,1081	6,2252	1,00	15,00
Total	48	40,4583	37,03532	5,34559	29,7044	51,2123	1,00	85,00
Vit_Dil Triladyl	24	38,2433	12,63753	2,57962	32,9070	43,5797	16,83	66,35
Andromed	24	4,7825	4,90111	1,00044	2,7129	6,8521	,83	16,81
Total	48	21,5129	19,38483	2,79796	15,8841	27,1417	,83	66,35
Morf_Dil Triladyl	24	8,8396	6,19864	1,26529	6,2221	11,4570	2,30	31,50
Andromed	24	18,9200	9,53528	1,94638	14,8936	22,9464	3,44	33,00
Total	48	13,8798	9,44672	1,36352	11,1367	16,6228	2,30	33,00

HOST_Dil	Triladyl	24	31,7875	7,02417	1,43380	28,8215	34,7535	16,50	49,51
	Andromed	24	4,9279	3,30478	,67458	3,5324	6,3234	,18	11,65
	Total	48	18,3577	14,61800	2,10993	14,1131	22,6023	,18	49,51

ANOVA

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
MIP_Dil	Entre grupos	61490,083	1	61490,083	950,505	,000
	Dentro de grupos	2975,833	46	64,692		
	Total	64465,917	47			
Vit_Dil	Entre grupos	13435,528	1	13435,528	146,255	,000
	Dentro de grupos	4225,745	46	91,864		
	Total	17661,273	47			

Morf_Dil	Entre grupos	1219,378	1	1219,378	18,855	,000
	Dentro de grupos	2974,930	46	64,672		
	Total	4194,308	47			
HOST_Di	Entre grupos	8657,247	1	8657,247	287,328	,000
	Dentro de grupos	1385,990	46	30,130		
	Total	10043,237	47			

Anexo G. Estadísticos descriptivos y ANOVA para comparaciones entre las muestras congeladas con L-Carnitina y sin L-Carnitina

Descriptivos

		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
MIP_LC	LC	24	40,7083	36,90938	7,53410	25,1229	56,2938	1,00	85,00
	Contro	24	40,2083	37,95304	7,74713	24,1822	56,2345	1,00	85,00
	Total	48	40,4583	37,03532	5,34559	29,7044	51,2123	1,00	85,00
Vit_LC	LC	24	20,5213	17,79225	3,63183	13,0082	28,0343	,83	58,40
	Contro	24	22,5046	21,19587	4,32659	13,5544	31,4548	,90	66,35
	Total	48	21,5129	19,38483	2,79796	15,8841	27,1417	,83	66,35
Morf_LC	LC	24	14,0538	9,44136	1,92721	10,0670	18,0405	2,30	33,00
	Contro	24	13,7058	9,65188	1,97018	9,6302	17,7815	2,65	32,03

	Total	48	13,8798	9,44672	1,36352	11,1367	16,6228	2,30	33,00
C	HOST_L LC	24	18,8854	14,88540	3,03847	12,5999	25,1710	,18	49,51
	Contro I	24	17,8300	14,64603	2,98961	11,6455	24,0145	,91	40,56
	Total	48	18,3577	14,61800	2,10993	14,1131	22,6023	,18	49,51

ANOVA

		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
MIP_LC	Entre grupos	3,000	1	3,000	,002	,963
	Dentro de grupos	64462,917	46	1401,368		
	Total	64465,917	47			
Vit_LC	Entre grupos	47,203	1	47,203	,123	,727
	Dentro de grupos	17614,070	46	382,915		
	Total	17661,273	47			

Morf_LC	Entre grupos	1,453	1	1,453	,016	,900
	Dentro de grupos	4192,855	46	91,149		
	Total	4194,308	47			
C HOST_L	Entre grupos	13,367	1	13,367	,061	,806
	Dentro de grupos	10029,870	46	218,041		
	Total	10043,237	47			

Anexo H. Fotografías.

Foto N° 1. Diluyentes seminales y aditivos utilizados.



Foto N° 2. L-carnitina y agua destilada utilizado en la criopreservación.

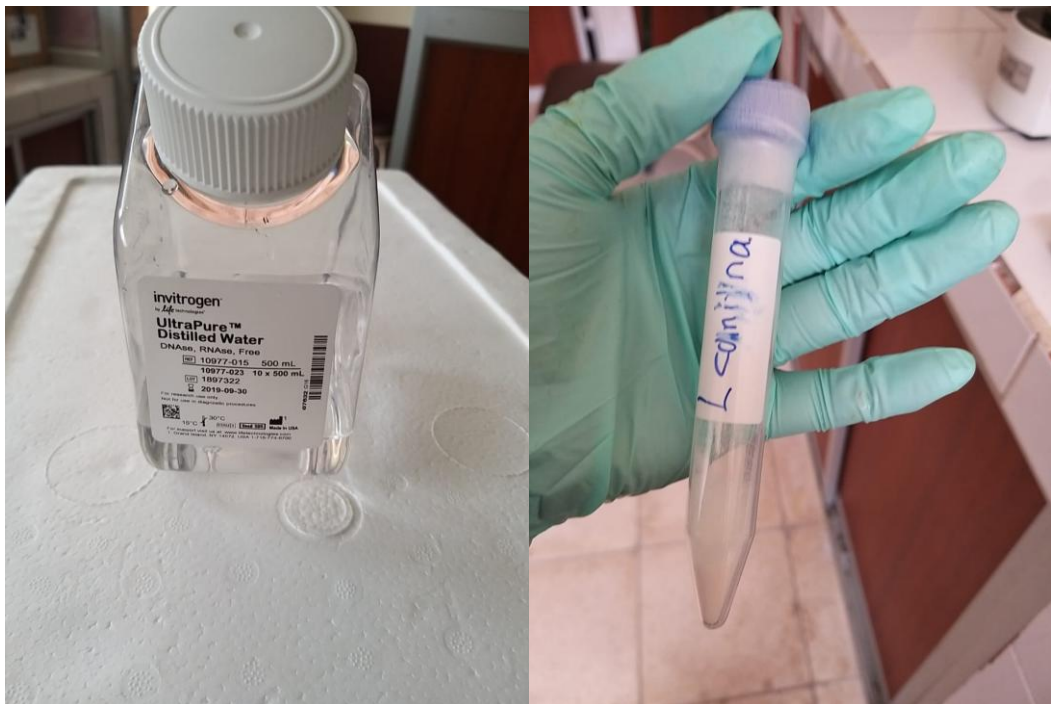


Foto N° 3. Primer ovino empleado.



Foto N° 4. Segundo ovino empleado en el estudio.



Foto N° 5. Vagina artificial.



Foto N° 6. Recolecta de semen.



Foto N° 7. Preparación de los diluyentes.



Foto N° 8. Adición de semen en el diluyente.

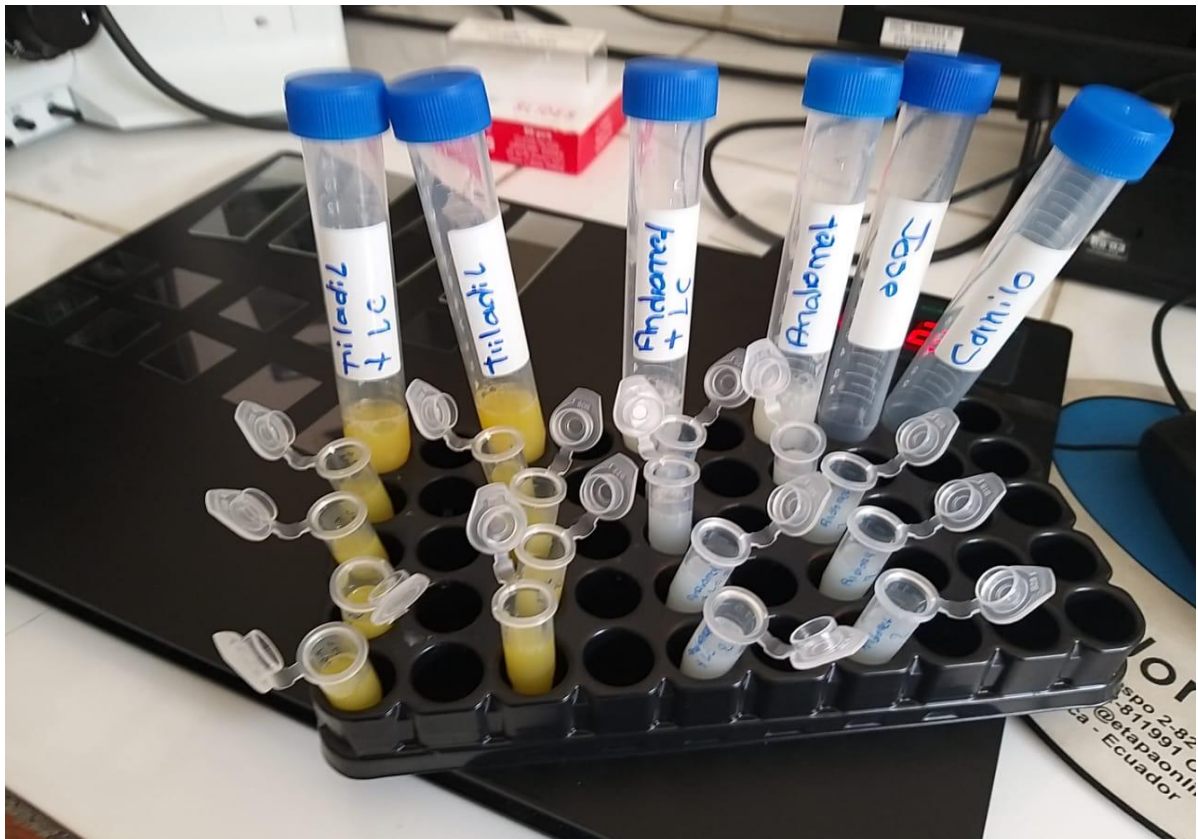


Foto N° 9. Adición de pajuelas en vapores de nitrógeno líquido.



Foto N° 10. Adición de pajuelas directo en nitrógeno líquido.



Foto N° 11. Frotis seminal para vitalidad y morfología.



Foto N° 12. Secado de la muestra en la placa.



Foto N° 13. Rotulado y almacenado en las canastillas.



Foto N° 14. Almacena en tanque de nitrógeno.



Foto N° 15. Materiales utilizados en la investigación.



Foto N° 16. Espermatozoides vivos y muertos (cabeza blanca y roja, respectivamente).

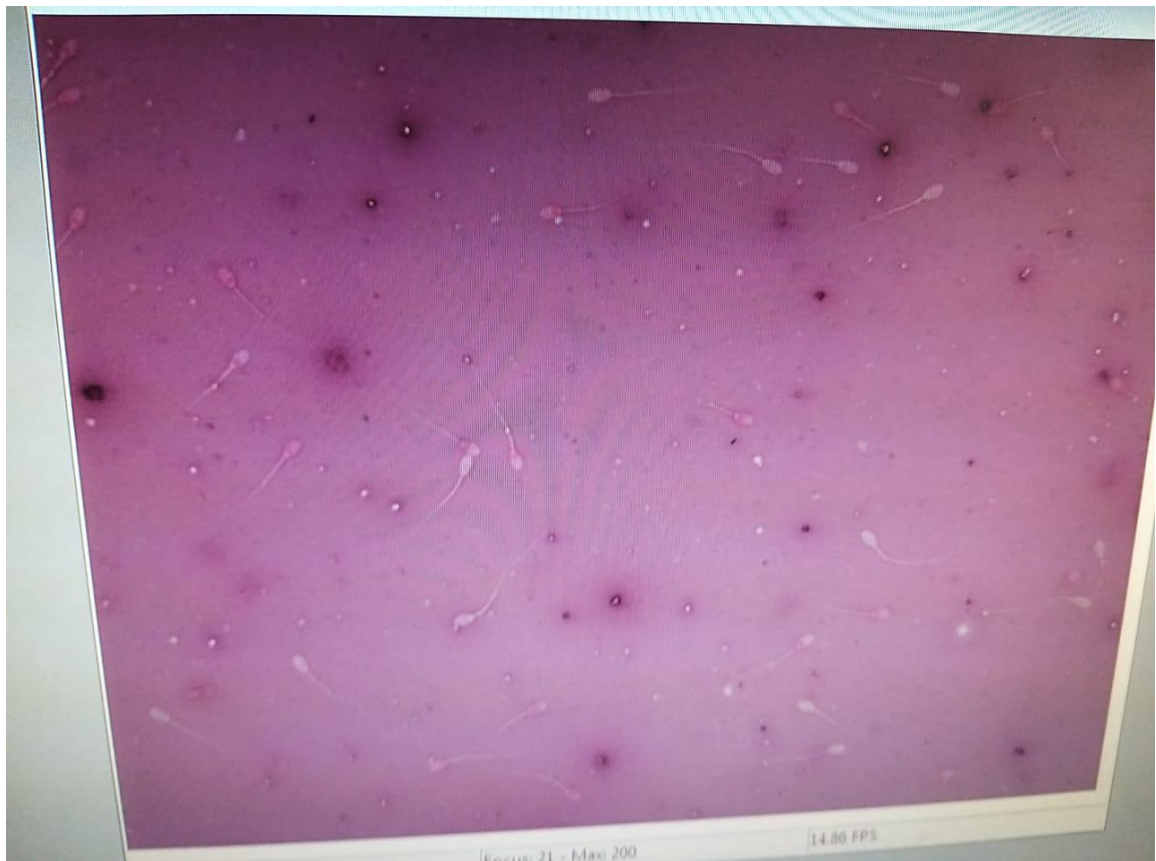


Foto N° 17. Espermatozoides anormales.

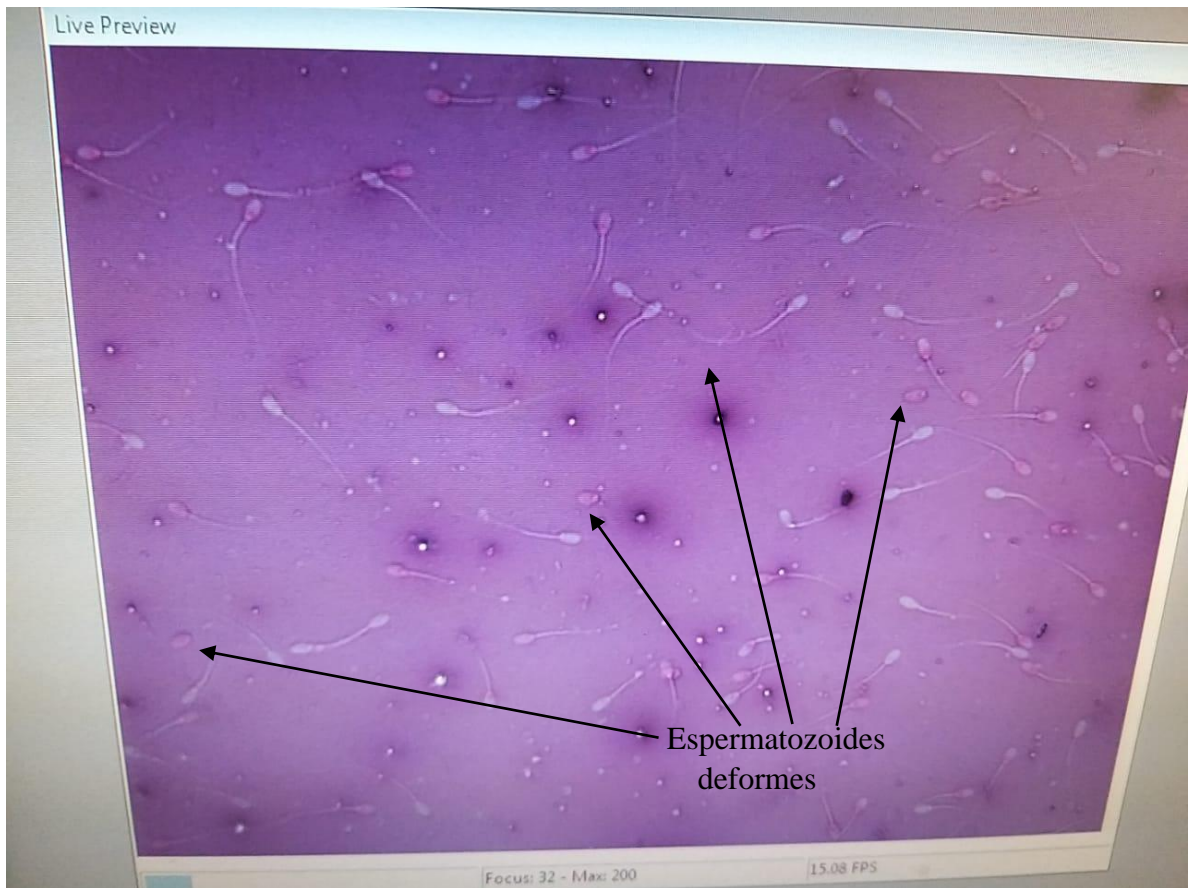


Foto N° 18. Espermatozoides anormales.



Foto N° 19. Positivos a test de host.

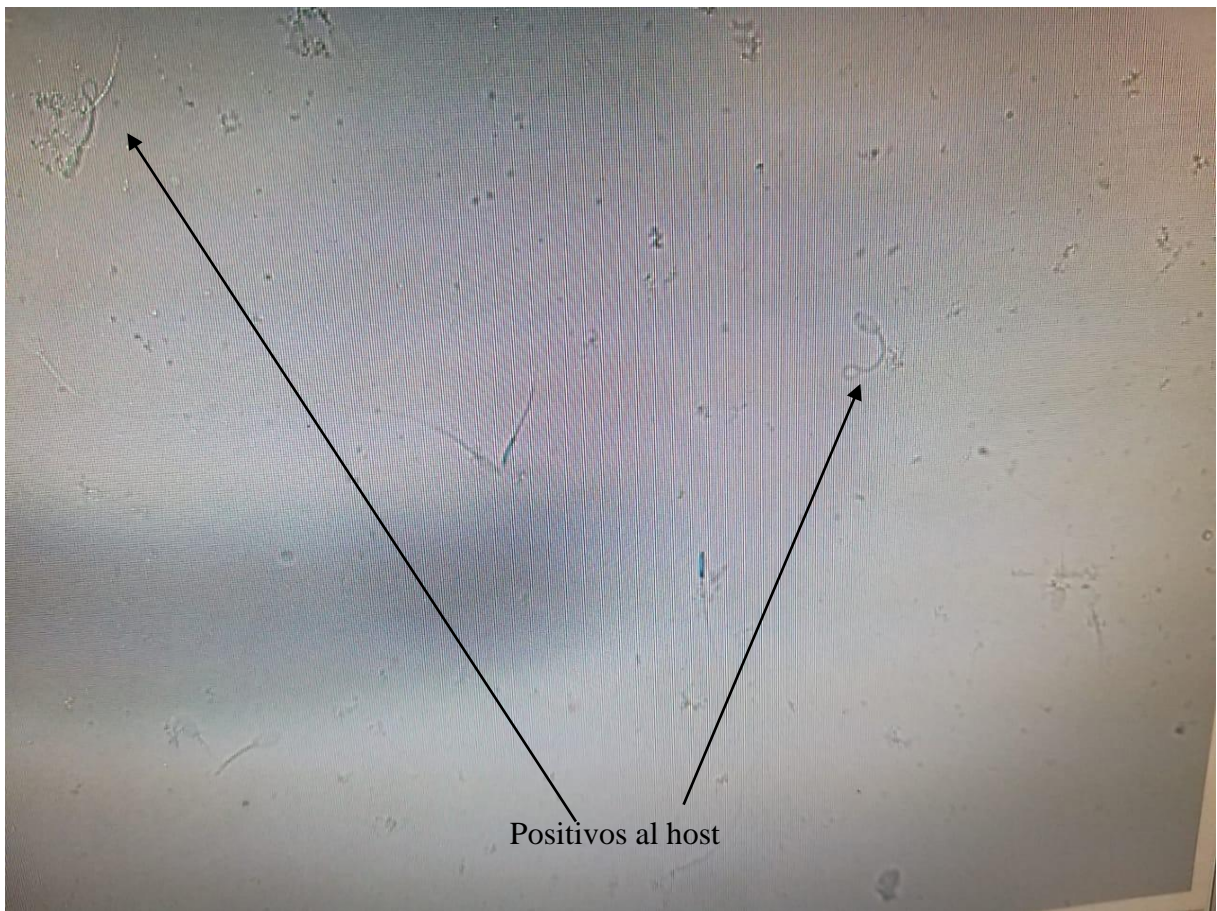
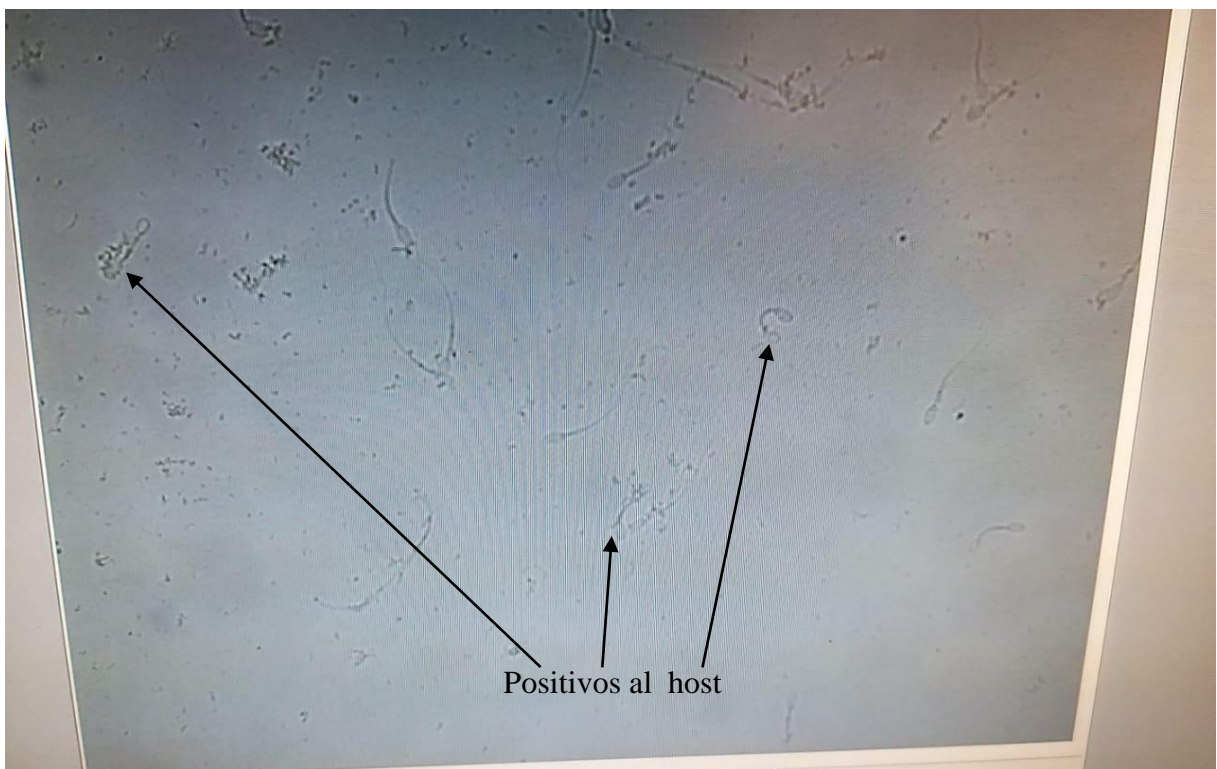


Foto N° 20. Positivos a test de host.



PERMISO DE AUTOR DE TESIS PARA SUBIR AL REPOSITORIO
INSTITUCIONAL

Yo, Vilma Janneth Morocho Carchi; en calidad de autora y titular de los derechos patrimoniales del trabajo de titulación “EFECTO DE LA L-CARNITINA EN LA CRIOCONSERVACIÓN DEL SEMEN OVINO”, de conformidad a lo establecido en el artículo 114 del Código Orgánico de la Economía Social de los conocimientos, Creatividad e Innovación, reconozco a favor de la Universidad Católica de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos, así mismo; autorizo a la Universidad para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el artículo 114 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 18 de febrero del 2021



Vilma Janneth Morocho Carchi

CI 0106213218