



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA DE ZOOTECNIA**

**“COMPARACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA CRIO-  
CONSERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN  
CAPRINO EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI”**

**Trabajo de titulación**

**Tipo: Trabajo Experimental**

Presentado para obtener el grado académico de:

**INGENIERA ZOOTECNISTA**

**AUTORA: VALERIA MICHEL RAMOS FLORES**

**DIRECTOR: Dr. ALEX ARTURO VILLAFUERTE GAVILÁNEZ**

RIOBAMBA – ECUADOR

2019

## **DERECHO DE AUTOR**

**©2019, VALERIA MICHEL RAMOS FLORES**

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

.....

**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**  
**CARRERA DE ZOOTECNIA**

**CERTIFICACIÓN**

El tribunal del trabajo de titulación certifica que: El trabajo de investigación (Trabajo experimental) “**COMPARACIÓN DE TRES DILUTORES EN LA CRIO-CONSERVACIÓN Y VIABILIDAD ESPERMÁTICA DE SEMEN CAPRINO EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI.**”, de responsabilidad de la señorita **Valeria Michel Ramos Flores**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

**FIRMA**

**FECHA**

Dr. PhD. Nelson Antonio Duchi Duchi.

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Dr. Alex Arturo Villafuerte Gavilánez.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE**

**TITULACIÓN**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Ing. MsC. Edgar Washington

Hernández Cevallos.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD COMPARTIDA**

Yo **VALERIA MICHEL RAMOS FLORES**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Valeria Michel Ramos Flores.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo dedico principalmente a Dios, por darme fortaleza, sabiduría, salud, valor para poder enfrentar obstáculos y dificultades que se han presentado en mi vida especialmente en el reto de obtener uno de mis anhelos más deseados.

A mis padres, María del Carmen Flores y José Ramos por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, al ser el pilar fundamental en mi formación profesional brindándome su apoyo incondicional, confianza, y sus sabios consejos, para hacer de mí una mejor persona, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que hoy soy, es un orgullo y privilegio ser su hija, gracias por su ejemplo de humildad, sencillez, honradez, son los mejores padres.

A mis hermanos Verónica, Darwin, Ericka, Lenin y Nicole, por su compañía, sus palabras por todo el cariño y el apoyo moral brindado a lo largo de este camino, a mi sobrina Naomi Ramos, quien ha sido mi luz y alegría.

A Gabriel Villamarín por brindarme su tiempo y apoyo incondicional en mis mejores y peores momentos por ser esa persona especial en mi vida.

*Valeria Michel Ramos Flores.*

## AGRADECIMIENTOS

A agradezco a Dios, a mi familia y la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Carrera de Zootecnia, por abrirme sus puertas e incluirme como su estudiante, a mis maestros, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de mi formación académica, y no solo ser maestros sino también amigos y consejeros.

Al director de este trabajo de titulación Dr. Alex Villafuerte G., quien me ha guiado con sus conocimientos ha sabido brindarme su apoyo incondicional, dedicación y paciencia en cada paso que di al realizar esta investigación, a mi asesor Ing., MsC. Edgar Hernández por su apoyo desinteresado, su gran aporte a través de su experiencia y gran dominio del tema.

A mis amigos, docentes y gran consejeros Ing. MsC. Paula Toalombo, Ing. MsC. Ruth Solorzano Ing. MsC. Vicente Trujillo, Ing. MsC. Julio Benavides por brindarme su apoyo incondicional, sus sabios consejos, por demostrarme que en la vida hay buenos y malos momentos de los cuales se disfruta y aprende, por su ejemplo de profesionalismo, humildad y sencillez.

Finalmente quiero agradecer a mis amigos, por apoyarme cuando más los necesito, por extender sus manos en momentos difíciles y acompañarme en esta trayectoria siempre las llevare en mi corazón.

*Valeria Michel Ramos Flores.*

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>PORTADA</b>	<b>i</b>
<b>DERECHO DE AUTOR</b>	<b>ii</b>
<b>CERTIFICACIÓN</b>	<b>iii</b>
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD COMPARTIDA</b>	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>vi</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b>	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b>	
<b>1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL</b>	<b>3</b>
1.1. Generalidades de los caprinos	3
1.2. Antecedentes de la producción caprina	3
1.3. Producción caprina en el Ecuador	4
1.3.1. Producción caprina en los últimos años	5
1.3.1.1. Proyecto de producción de leche caprina en el Ecuador	5
1.3.1.2. Caprinocultura puede ser una actividad rentable en el país	6
1.3.2. Reintroducción de ganado caprino en el Ecuador	7
1.3.2.1. MAGAP presenta Proyecto Nacional del Manejo y Comercialización de Ovinos, Caprinos y Camélidos.	7

1.4.	Características del semen de caprino	8
1.4.1.	Estructura del espermatozoide	9
1.4.2.	Plasma seminal	9
1.5.	Conservación de espermatozoides de caprino	10
1.6.	Medios de conservación espermática	10
1.6.1.	Características que debe de tener un diluyente o dilutor	11
1.6.2.	Sustancias tampón	11
1.6.3.	Sustancias crio protectoras	13
1.6.3.1.	Crio protectores penetrantes	13
1.6.3.2.	Crio protectores no penetrantes	15
1.6.4.	Utilización de la Yema de Huevo	16
1.7.	Evaluación Seminal	16
1.7.1.	Características macroscópicas	16
1.7.2.	Características microscópicas	17
1.7.2.1.	Concentración espermática	18
1.7.2.2.	Motilidad Espermática	18
1.7.2.3.	Motilidad individual progresiva	19
1.7.2.4.	Morfología Espermática	20
1.8.	Método de recolección de semen para caprinos	21
1.9.	Congelación de semen de caprino	22
1.10.	Proceso de descongelación	24

## **CAPITULO II**

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>25</b>
2.1.	Localización y Duración del Experimento	25
2.2.	Unidades Experimentales	26
2.3.	Materiales, Equipos e Instalaciones	26
2.3.1.	Materiales	26
2.3.2.	Equipos	27
2.3.3.	Instalaciones	27
2.4.	Tratamiento y Diseño Experimental	28
2.4.1.	Esquema del Experimento	28
2.5.	Mediciones Experimentales	29
2.5.1.	Macroscópicas	29
2.5.2.	Microscópicas	29



2.5.3.	Evaluación de dosis seminales en la crio-conservación	29
2.5.4.	Evaluación Económica	29
2.6.	Análisis estadístico y Pruebas de Significancia	29
2.7.	Procedimiento Experimental	30
2.7.1.	De campo	30
2.7.1.1.	Selección de machos cabríos	30
2.7.1.2.	Método de extracción seminal	31
2.7.1.3.	Preparación de la vagina artificial	31
2.7.1.4.	Extracción y manejo del semen	32
2.7.2.	De laboratorio	32
2.7.2.1.	Preparación de diluyentes	32
2.7.2.2.	Dilución	36
2.7.2.3.	Crio- Conservación	37
2.7.2.4.	Descongelamiento de las pajuelas	37
2.7.3.	Metodología de Evaluación	38
2.7.3.1.	Mediciones Macroscópicas	38
2.7.3.2.	Mediciones Microscópicas	39
2.7.4.	Examinación del semen en el post descongelamiento	42

### **CAPITULO III**

<b>3.</b>	<b>MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>43</b>
3.1.	Evaluación de las características macroscópica del semen del macho cabrío de la raza Saanen.	43
3.1.1.	Volumen del eyaculado	43
3.1.2.	Color	44
3.1.3.	Olor	45
3.1.4.	Aspecto	45
3.1.5.	Potencial Hidrógeno (pH) del eyaculado	46
3.2.	Evaluación de las características microscópica del semen del macho cabrío de la raza Saanen antes de ser sometido a la dilución para su posterior crio-conservación.	46
3.2.1.	Concentración espermática, Spz/ml	46
3.2.2.	Motilidad masal, %	47
3.2.3.	Motilidad individual, pts.	47

3.2.4.	Determinación de células vivas y muertas, %	48
3.2.5.	Morfología espermática, % y anormalidades del espermatozoide, %	49
3.3.	Evaluación de las características seminales en la crio-conservación, frente a la utilización de tres diluyentes seminales.	50
3.3.1.	Motilidad masal, %	50
3.3.2.	Motilidad Individual, pts.	51
3.3.3.	Determinación de células vivas y muertas, %	52
3.4.	Correlación de las variables que mostraron significancia en el estudio.	53
3.5.	Evaluación Económica	58
<b>CONCLUSIONES</b>		<b>60</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>		<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		<b>62</b>
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1-1:</b>	Razas comerciales de caprinos en el Ecuador. 4
<b>Tabla 2-1:</b>	Distribución de ganado caprino a nivel nacional, regional y provincial. 5
<b>Tabla 3-1:</b>	Características del eyaculado de un semental caprino obtenido mediante la vagina artificial 17
<b>Tabla 4-2:</b>	Condiciones Meteorológicas de la Estación Experimental Tunshi. 25
<b>Tabla 5-2:</b>	Esquema del Experimento. 28
<b>Tabla 6-2:</b>	Esquema del ADEVA 30
<b>Tabla 7-2:</b>	Calificación de movimiento en masa. 39
<b>Tabla 8-2:</b>	Escala para la evaluación microscópica de la motilidad individual progresiva aplicada para el semen caprino 40
<b>Tabla 9-3:</b>	Evaluación macroscópica seminal de eyaculados del macho cabrío de la raza Saanen. 43
<b>Tabla 10-3:</b>	Evaluación microscópica seminal del eyaculado del macho cabrío de la raza Saneen, antes de ser sometido a la dilución para su posterior crio-conservación. 50
<b>Tabla 11-3:</b>	Coefficiente de correlación de Pearson, para las variables motilidad masal, %, y motilidad Individual, pts. 53
<b>Tabla 12-3:</b>	Evaluación de las características microscópicas del semen caprino en la estación experimental Tunshi, sometido a tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática. 56
<b>Tabla 13-3:</b>	Evaluación seminal del eyaculado del macho cabrío de la raza Saneen, al ser sometidos a los tres dilutores previo a la crio-conservación. 57
<b>Tabla 14-3:</b>	Análisis económico de la evaluación del semen caprino en la estación experimental Tunshi, sometido a tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática. 59

## ÌNDICE DE GRÀFICOS

	<b>Pág.</b>
<b>Gráfico 1-3</b> Motilidad masal (%), en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.	54
<b>Gráfico 2-3</b> Motilidad individual (pts.), en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1:** Soluciones para el análisis microscópico del semen caprino.
- Anexo 2:** Motilidad masal %, en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.
- Anexo 3:** Motilidad individual pts., en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.
- Anexo 4:** Determinación de células vivas y muertas %, en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.

## RESUMEN

Se comparó tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino, evaluando las características microscópicas de los espermatozoides al post descongelamiento y determinando el costo de producción de cada tratamiento; esta investigación se realizó en la Unidad Académica de Investigación Ovino Caprina y Camélida perteneciente a la Estación Experimental Tunshi ubicada en la Parroquia Licto, cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, con una metodología experimental, bajo un Diseño Completamente al Azar para lo cual se emplearon tres tratamientos con diez repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por 1 dosis seminal de 0,5 ml congelada en nitrógeno líquido, proveniente del macho cabrío Saanen de 4 años, obteniendo una totalidad de 30 dosis en estudio, con una duración de 120 días de investigación. Los análisis microscópicos al post descongelamiento de las pajuelas se realizaron en el Laboratorio de Reproducción e Inseminación Artificial de la Facultad de Ciencias Pecuarias ESPOCH. Se determinaron diferencias altamente significativas a las medias de los tratamientos aplicados ( $P < 0,01$ ), para las características motilidad masal e individual en el proceso de crio-conservación seminal, en cuanto a la viabilidad espermática no se registró diferencias significativas ( $P > 0,05$ ). Obteniendo los mejores resultados al post descongelamiento al utilizar el tratamiento TrisYema+Glicerol, registrando motilidad masal (77%), motilidad individual (2,82 pts.) y viabilidad espermática de (83%), sin embargo el tratamiento Triladyl, registró vlos siguientes resultados motilidad masal (76%), motilidad individual (2,81pts.) y viabilidad espermática de (88%), existiendo entre los dos tratamientos solo diferencias numéricas. Se estableció un costo de producción de 1,36USD, por dosis seminal en los tres tratamientos. Concluyendo que en cuanto a las características microscópicas, los mejores tratamientos fueron D1T1L (TrisYema+Glicerol) y D2T2T (Triladyl), recomendando utilizar en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino los diluyentes TrisYema+Glicerol o Triladyl, por presentar resultados satisfactorios en los parámetros estudiados en la presente investigación.

### **PALABRAS CLAVES:**

<CRIO-CONSERVACIÓN (PROCEDIMIENTO)> <SAANEN (RAZA)> <DILUYENTE>  
<DOSIS SEMINAL (PAJUELA)> <ESTACIÓN EXPERIMENTAL (TUNSHI)> <LICTO (PARROQUIA)> <RIOBAMBA (CANTÓN)> <CHIMBORAZO (PROVINCIA)>

## ABSTRACT

Three diluents were compared in the cryopreservation and sperm viability of goat semen, evaluating the microscopic characteristics of the sperm after the thawing and determining the cost of production of each treatment; this investigation was conducted in the Ovine Caprina and Camelidae Academic Research Unit in Tunshi Experimental Station located in Licto Parish, Riobamba canton, Chimborazo province, with an experimental methodology, under a Completely Random Design for which three treatments with ten repetitions were used, The experimental unit consisted of 1 seminal dose of 0,5 ml frozen in liquid nitrogen, from the 4 year old Saanen goat, obtaining a total of 30 doses under study, with a duration of 120 days of research. Microscopic analysis to post thaw straws were performed at the Laboratory of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Animal Science ESPOCH. We determined highly significant differences to the means of the treatments applied ( $P < 0,01$ ), for the characteristics of mass and individual motility in the process of seminal cryopreservation, in terms of sperm viability, no significant differences were recorded ( $P > 0,05$ ). Obtaining the best results for post thawing when using the TrisYema + Glycerol treatment, registering mass motility (77%), individual motility (2,82 pts.) And sperm viability (83%), however Triladyl treatment, record the following mass motility results (76%), individual motility (2,81 pts.) and sperm viability (88%), there being only numerical differences between the two treatments. A cost of production of 1,36 USD was established, per seminal dose in the three treatments. Concluding that in terms of microscopic characteristics, the best treatments were D1T1L (TrisYema + Glycerol) and D2T2T (Triladyl), recommending the use in the cryopreservation and sperm viability of goat semen TrisYema + Glycerol or Triladyl diluents, for presenting satisfactory results in the parameters studied in the present investigation.

### KEYWORDS:

<CRIOPRESERVATION (PROCEDURE) > <SAANEN (RACE)> <DILUENT> <SEMINAL DOSAGE (STRAW)> <EXPERIMENTAL STATION (TUNSHI)> <LICTO (PARISH)> <RIOBAMBA (CANTON)> <CHIMBORAZO (PROVINCE)>

## INTRODUCCIÓN

La producción caprina es una actividad que en el Ecuador ha servido como una alternativa de ingreso para campesinos y pequeños productores, la cual sufrió un desarrollo significativo en los últimos años pues se está valorando a esta especie por sus características productivas, reproductivas, ya que la calidad de sus productos, como la leche y la carne poseen un valor nutricional importante, además de brindar innumerables beneficios para la salud del consumidor.

Es así que en la actualidad se han formado asociaciones de caprinocultores y productores independientes de esta especie con miras a incrementar, potencializar la producción caprina. Pero existen pocos estudios a nivel nacional que evalúen la calidad de los animales existentes para ser incluidos en programas de reproducción y mejoramiento genético.

La poca o nula introducción de técnicas como la Inseminación Artificial (I.A.), para esta especie estando lejos de ser una tecnología accesible para los productores convirtiéndose en un obstáculo debido a diversos factores como el costo del material seminal importado de otros países donde se ha logrado aplicar programas de mejoramiento animal, donde de alguna manera se ha implementado técnicas de Inseminación Artificial (I.A.) y se ha logrado realizar análisis reproductivos de vital importancia como la evaluación andrológica tradicional que incluye en general el análisis de concentraciones espermáticas, motilidad, viabilidad, anomalías morfológicas de los espermatozoides.

Siendo así necesario el desarrollo de estudios reproductivos, además de la búsqueda e inclusión de técnicas de crio-conservación seminal, con la utilización de diluidores que provean las condiciones necesarias de viabilidad a los espermatozoides, igualmente conservar variabilidad genética que permitir almacenar el material seminal fértil sin limitaciones de tiempo, y poder de esta manera aprovechar las características de los caprinos existentes en nuestro país.

La crio-conservación de semen de caprino en nuestro medio todavía es un reto, debido a que no se han desarrollado investigaciones que indiquen un protocolo de conservación del mismo y garantice su uso a través de biotecnologías como la Inseminación Artificial (I.A.).

Por esta razón la presente investigación comparo tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen Caprino, Dilutores Tris Yema + Glicerol, Comercial 1 Triladyl, y Comercial 2 Andromed, buscando determinar cuál de estos brinda las condiciones adecuadas de calidad espermática, siendo evaluados tras el post descongelamiento.



Para este estudio se planteó el siguiente objetivo general:

- Comparar tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.

Del objetivo general se derivaron los siguientes objetivos específicos:

- Valorar macroscópicamente y microscópicamente el semen Caprino con tres dilutores.
- Evaluar las características microscópicas de los espermatozoides en el post -descongelado.
- Determinar el costo de producción de los tres tratamientos.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

#### 1.1. Generalidades de los caprinos

Los caprinos constituyen la ganadería típica de las zonas áridas y semiáridas, consideradas marginales para otro tipo de ganado. Su capacidad de adaptación le permite sobrevivir en regiones de baja productividad forrajera (De la Vega, 2014,p.1).

Considerados como menores o pequeños rumiantes dentro del área zootécnica de género y especie *CapraHircus* son animales de talla pequeña, con cuernos arqueados, muy ágiles, adaptados a saltar, escalar. Su distribución es amplia encontrándose en todo el mundo, principalmente en las zonas montañosas adaptándose a diversas alturas y climas (De la Vega, 2014,p.1).

De fácil manejo puesto que presentan muy amplia rusticidad, explotada bajo modelos extensivos, semiextensivos, determinando que esta especie sea más idónea que las especies ovina y bovina, logrando productividades aceptables en medios ecológicos difíciles (Taípe, 2017,p.1).

No obstante, se practican sistemas intensivos aprovechando los subproductos derivados de cultivos agrícolas, denominados como animales ecológicos por evitan la polución restaurando el equilibrio ecológico al consumir aproximadamente el 60% de materia orgánica en descomposición. Bajo un correcto manejo técnico son animales de alto poder reproductivo, eficiencia productiva, sustentabilidad y calidad de sus productos (Taípe, 2017,p.1).

#### 1.2. Antecedentes de la producción caprina

Los caprinos probablemente fueron de los primeros rumiantes en ser domesticados, hace más de 10,000 años en la antigua Mesopotamia. Es una especie animal que gozó de una enorme popularidad durante siglos pasados (Reed, 1995, citado en Aréchiga et al., 2008,p.3).

Varias religiones tuvieron como deidad a las cabras o en ocasiones a las ovejas. La cabra es considerada en la Biblia como un símbolo de riqueza o de sacrificio. Sido una de las especies más útiles al hombre, sobre todo como proveedoras de leche. Los caprinos fueron introducidos al Caribe en el siglo XVI por los españoles y posteriormente al Continente Americano llevados por

portugueses también pudieron contribuir estableciendo la caprinocultura en América, posiblemente algunos de sus ejemplares venían de África durante en el periodo del comercio de esclavos. En las grandes guerras y los periodos de posguerra, la crianza de caprinos se incrementó para aminorar la escasez de leche (Aréchiga et al., 2008,p.3).

Sin embargo, durante los últimos años, su importancia como especie doméstica con un gran potencial productivo y reproductivo ha sido olvidada, pero ofrece enormes perspectivas de desarrollo principalmente por su alto potencial productivo de leche y por las características organolépticas de su carne, además de la prolificidad que posee esta especie. (Aréchiga et al., 2008,p.3).

### 1.3. Producción caprina en el Ecuador

La crianza de caprinos en nuestro país se da a nivel de pequeños productores en sistema extensivos, son pocos los productores que utilizan paquetes tecnológicos aceptables y rebaños de mayor tamaño que les permite tener mejores ingresos. Las principales razas caprinas comercializadas son las que se indican en la siguiente tabla: (Taípe, 2017,p.1)

**Tabla 1-1:** Razas comerciales de caprinos en el Ecuador.

<b>Razas</b>	<b>Predominación por Provincia</b>	<b>Aptitud de la raza</b>
<b>Criollo</b>	Santa Elena y Zapotillo	Se las considera como doble propósito, pero su producción es tanto cárnica como lechera es baja.
<b>Nubia</b>	Santa Elena y Zapotillo	Lechera
<b>Saanen</b>	Pichincha	Lechera
<b>Alpina</b>	Imbabura	Carne
<b>Boer</b>	Zapotillo	

Fuente: (INEC, 2012; citado en Taípe, 2017, p.1)

La población caprina en el Ecuador según el último censo agropecuario (INEC, 2012), es de 108,713 cabezas (tabla 2-1), de las cuales el 82% se encuentran en la región Sierra, el 17,79 % en la región Costa, y 0,21% en el resto del país. Por su parte, Loja es la provincia con mayor población caprina (80431 cabezas), seguida de Azuay (3372 cabezas). Mientras que para la Costa sobresale Santa Elena con (9292 cabezas), seguida por Manabí y la provincia del Guayas con (5561 y 3425 cabezas), en su orden. Además, podemos manifestar que estos animales son

explotados en un 90% en forma extensiva, y apenas el 10% en forma semi-intensiva (Vargas, et al, 2016,p.152).

**Tabla 2-1:** Distribución de ganado caprino a nivel nacional, regional y provincial.

<b>Censo Agropecuario Año 2012 Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC).</b>					
Región Sierra	Cantidad	Región Costa	Cantidad	Región Oriental	Cantidad
<b>Azuay</b>	3,372	Santo Domingo de los Tsáchilas	7	Morona Santiago	104
<b>Bolívar</b>	94	El Oro	340	Napo	46
<b>Cañar</b>	504	Esmeraldas	203	Pastaza	22
<b>Carchi</b>	554	Guayas	3,425	Zamora Chinchipe	58
<b>Cotopaxi</b>	1,142	Los Ríos	518		
<b>Chimborazo</b>	1,214	Manabí	5,561		
<b>Imbabura</b>	476	Santa Elena	9,292		
<b>Loja</b>	80,431				
<b>Pichincha</b>	1,192				
<b>Tungurahua</b>	158				
<b>Total</b>	<b>89,137</b>	<b>Total</b>	<b>19,346</b>	<b>Total</b>	<b>230</b>
<b>TOTAL/ NACIONAL</b>					<b>108,713</b>

Fuente: (INEC, 2012; citado en Vargas, et al, 2016, p.152).

### **1.3.1. Producción caprina en los últimos años**

#### **1.3.1.1. Proyecto de producción de leche caprina en el Ecuador**

La Asociación Mira “La Portada” es una de las seis que participan en el proyecto Implementación Producción de leche caprina en el sector cuencas de los ríos Chota y Mira. Esta iniciativa cuenta con apoyo de la Agencia Belga de Cooperación al Desarrollo, Fundación PRODECI y el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Ecuador (Perulactea, 2012) <http://www.perulactea.com/2012/08/20/proyecto-de-produccion-de-leche-caprina-paga-1-dolar-el-litro-en-ecuador/>

Técnico encargado del proyecto, manifiesta que se trabaja con tres razas caprinas: Saanen, Alpina Francesa y Anglo Nubian, que se han adaptado bien a esta zona cálida – seca de nuestro país. Pero Valverde, J. (2012), comento que también hay la variedad criolla que es la que más se ha desarrollado gracias a su característica de adaptabilidad y rusticidad en el medio. (Perulactea, 2012). <http://www.perulactea.com/2012/08/20/proyecto-de-produccion-de-leche-caprina-paga-1-dolar-el-litro-en-ecuador/>

Erazo técnico de la industria de lácteos Mondel aseguro que la mayoría de los caprinos que se crían en el país está destinada a la producción de carne. Mientras que la producción de leche se ha concentrado en Imbabura, Carchi y Pichincha, principalmente (Perulactea, 2012) <http://www.perulactea.com/2012/08/20/proyecto-de-produccion-de-leche-caprina-paga-1-dolar-el-litro-en-ecuador/>

### 1.3.1.2. *Caprinocultura puede ser una actividad rentable en el país*

Aunque en Ecuador es desconocida la valiosa propiedad de los subproductos que se obtienen de los caprinos, la empresa “La Pampilla”, ubicada en Yaruquí, a una hora de Quito, decidió emprender el reto e iniciar esta actividad con tecnología de punta para garantizar calidad e higiene a los consumidores (ELUNIVERSO, 2010). <https://www.eluniverso.com/2010/06/12/1/1416/caprinocultura-puede-ser-actividad-rentable-pais.html>

Marta Verástegui, de 28 años y propietaria del aprisco, indica que lo que inició como un hobby se convirtió en un negocio. Emprendió la actividad con 60 animales importados de Chile de la raza Saanen, algunas cruzadas con Nubian que no producían más allá de dos litros de leche por día (ELUNIVERSO,2010). <https://www.eluniverso.com/2010/06/12/1/1416/caprinocultura-puede-ser-actividad-rentable-pais.html>

En este momento, con ayuda de inseminación artificial, tiene 170 animales. Investigando se pudo dar cuenta de que estos animales con buen manejo, mejoramiento genético podrían darle mucho más, y en estos momentos tiene cabras que dan tres litros, algunas han llegado a los seis litros, siendo su producción actual diaria de 140 litros (ELUNIVERSO, 2010) <https://www.eluniverso.com/2010/06/12/1/1416/caprinocultura-puede-ser-actividad-rentable-pais.html>

Para Verástegui es un mito decir que los caprinos son destructores de la tierra que habita. “Eso es falso”, enfatiza. “Estos animales posee un gran instinto de supervivencia, que si no se le da de comer consumen lo que encuentre. Pero cuando el animal es tratado con los cuidados necesarios, alimentación balanceada y en su momento, la bondad de los caprinos puede hacer de esto una actividad muy rentable”, explica la microempresaria (ELUNIVERSO, 2010) <https://www.eluniverso.com/2010/06/12/1/1416/caprinocultura-puede-ser-actividad-rentable-pais.html>

En la actualidad ya produce quesos, algunos con especias, leche y manjar. “Un inconveniente explica Verástegui es que en Ecuador aún no se logra entrar de lleno al mercado por falta de conocimiento de lo que representa el producto para la salud, pero pronto emprenderemos una campaña de consumo y estamos buscando distribuidores en las diferentes ciudades”, acota Verástegui (ELUNIVERSO, 2010) <https://www.eluniverso.com/2010/06/12/1/1416/caprinocultura-puede-ser-actividad-rentable-pais.html>

### **1.3.2. Reintroducción de ganado caprino en el Ecuador**

#### **1.3.2.1. MAGAP presenta Proyecto Nacional del Manejo y Comercialización de Ovinos, Caprinos y Camélidos.**

El Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), a través de la Subsecretaría de Ganadería presentó el viernes 14 de agosto del 2016, el Proyecto Nacional del Manejo Comercialización de Ovinos, Caprinos y Camélidos. Este evento se realizó conjuntamente con la Deutsche Gessellschaft Fur Internacionales Zusammenarbeit (GIZ) contando con la participación de alpaqueros, caprinocultores, ovinocultores (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

El propósito de este proyecto es incrementar las capacidades, potencializar la producción de fibra, lana, carne y leche de rumiantes menores (ovejas, cabras, llamas, alpacas) (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

Margot Hernández, subsecretaria de Ganadería, destacó que “con este proyecto el MAGAP apoyará a pequeños y medianos productores mediante procesos de capacitación y transferencia de tecnología, fortalecimiento del trabajo asociativo, creación de plataformas de comercialización y generación de políticas que apoyen al mejoramiento genético de especies menores” (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

Diego Toledo, director de Sistemas de Producción y Nutrición del MAGAP, indicó que “es un programa anhelado por los sectores más empobrecidos del país, el 95% de la producción de estos ganados carecen de tecnología. Por ello, uno de los propósitos es establecer el centro nacional de mejoramiento genético”. Este proyecto se ejecutará para ovinos en las provincias de Chimborazo, Cotopaxi, Cañar, Tungurahua y Azuay. Para ganado caprino en Santa Elena, Loja, Carchi, Imbabura, Manabí y Guayas. En el caso de los camélidos (alpacas y llamas) en Chimborazo, Cotopaxi, Bolívar, Tungurahua, Azuay, Cañar, Pichincha e Imbabura (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

Durante el verano, seco, el color gris de la vegetación donde sobreviven especies como el algarrobo y el ganado menor (cabras o chivos), las altas temperaturas del sol canicular, durante el

día y la frescura de las noches, hacen difícil la producción agropecuaria en sectores carentes de sistema de riego; dando un giro la explotación agropecuaria y activándose la agricultura de subsistencia, con la principal actividad que es la cría del chivo (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

En la explotación caprina que se hace en el Ecuador, actividad todavía por desarrollar con gran oportunidad agroeconómica para los sectores de bosque seco, hemos visto gran oportunidad de negocio con alto retorno financiero por todo lo que genera esta actividad (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

Para el zootecnista Dr. Carlos Ron miembro del equipo técnico de ASESORAP, la clave del éxito de esta actividad es el manejo técnico, que va desde la selección de los ejemplares, registros, controles, sanidad, genética, hasta el adecuado manejo del ordeño de madres, y el faenamiento (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

Los caprinos son una especie que permite ser manejados de manera extensiva y semi estabulada; teniendo buena conversión de los alimentos, ganando peso rápidamente. Los partos se dan cada cinco meses, generando partos de un individuo en hembras primerizas, hasta dos o tres ejemplares en hembras a partir del segundo parto. Es por ello que se hace necesario, de esta manera un adecuado manejo genético para refrescar sangre mejorando las razas del país. También introducir ejemplares de mejor calidad para renovar los chatos existentes (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

En esta actividad se puede realizar una verdadera APP (Alianza Público Privada) y desarrollar grandes centros de producción que distribuyan sementales a las fincas de la Península de Santa Elena, volviéndose así una verdadera agroindustria local que genera subproductos, agroturismo, transportación y plazas de trabajo para el habitante del sector (MAGAP, 2016) <https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>

#### **1.4. Características del semen de caprino**

El semen de macho cabrío es de color blanco grisáceo o amarillento, pudiendo variar de un eyaculado a otro, aún en el mismo semental. Teniendo eyaculado con un volumen promedio de 1.2 ml, pero éste depende de la edad, condición del animal, frecuencia y método de recogida. La

concentración espermática va desde 3.5 hasta 6 mil millones de espermatozoides por mililitro y su consistencia varía desde clara-acuosa hasta cremosa espesa, dependiendo de la relación entre sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal (Evans y Maxwell 1990; Arrebola 2012; citado en Rojas, 2014, pp.16-17)

#### **1.4.1. Estructura del espermatozoide**

El espermatozoide es la célula germinal masculina, altamente especializada, que ha evolucionado para cumplir una función biológica compleja, fecundar al ovocito. Se trata de una célula haploide, producto final del proceso de la gametogénesis en el macho, portadora de información genética paterna. En el espermatozoide se distinguen tres partes: la cabeza que contiene los cromosomas responsables de portar la información genética, seguida del cuello (o pieza de conexión) y la cola que es el órgano locomotor del espermatozoide (Rojas, 2014,p.17).

#### **1.4.2. Plasma seminal**

El plasma seminal de los mamíferos es una secreción fisiológica de múltiples glándulas del tracto reproductor del macho que juega un papel importante en la maduración final de los espermatozoides (Rojas, 2014, pp.17-18).

Es un líquido isotónico y neutro, compuesto principalmente por agua (75%), sustancias orgánicas (fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas, proteínas) e inorgánicas (sodio, potasio, cloro) que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides (Rojas, 2014, pp.17-18).

Curiosamente, los componentes orgánicos tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la presión osmótica del semen, más que los iones inorgánicos, aunque se encuentren cantidades considerables de estos últimos en el plasma seminal (Rojas, 2014, pp.17-18).

Los componentes orgánicos también son esenciales para mantener el metabolismo espermático y el pH, siendo las proteínas los contribuyentes más importantes de la función de los espermatozoides en los mamíferos (Evans y Maxwell 1990; Arrebola 2012; citado en Rojas, 2014, pp.17-18)

El plasma seminal normalmente es de color blanco, pero en el macho cabrío puede ser de color amarillo por su contenido en riboflavina procedente de las glándulas vesiculares. El pH del plasma seminal se mantiene muy próximo a 7.0 por un complejo sistema amortiguador, protegiendo a los



espermatozoides de los cambios bruscos de pH que deteriorarían la supervivencia de las células espermáticas. (Rojas, 2014,p.19).

Además, el plasma seminal del macho cabrío tiene como peculiaridad un contenido enzimático proveniente de las glándulas bulbouretrales, formado por la denominada enzima coaguladora de la yema de huevo (EYCE). Esta enzima es una fosfolipasa A, que hidroliza la lecitina de la yema de huevo contenida en el diluyente en ácidos grasos y lisolecitina, afectando ésta última a la viabilidad espermática (Rojas, 2014,p.19).

### **1.5. Conservación de espermatozoides de caprino**

El fundamento de conservar semen es prolongar la capacidad fecundante de los espermatozoides, al reducir o detener su movilidad y reacciones metabólicas (Rojas, 2014, p.35).

El semen de macho cabrío al igual que de otras especies como los porcinos y bovinos, se puede conservar en estado líquido o congelado. Para su uso a corto plazo, conservándose en estado líquido, a temperatura ambiente (33°C, semen fresco) o a bajas temperaturas (5 y 15 °C, semen refrigerado) (Rojas, 2014, p.35).

Para largos periodos de conservación, se recurre a la congelación de las dosis seminales y su mantenimiento en nitrógeno líquido (-196°C, semen congelado). En cualquier caso, es necesario utilizar un medio/diluyente que proteja a los espermatozoides durante este proceso de conservación (Rojas, 2014, p.35).

Cuando el semen se congela y conserva a muy baja temperatura, esto es en nitrógeno en líquido a -196°C, las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. Esto hace que el semen pueda conservar genes para futuro uso asegurando la disponibilidad de un semental en particular (Evans y Maxwell, 1990; Gorch, 1999; citado en Rojas, 2014, p.35).

También de esta forma el semen se puede conservar en épocas distintas a la reproductiva. En consecuencia, la utilización de los sementales se amplía considerablemente al congelar y conservar el semen (Evans y Maxwell, 1990; Gorch, 1999; citado en Rojas, 2014, p.35).

### **1.6. Medios de conservación espermática**

Un dilutor es aquel compuesto que proporciona a las células espermáticas una fuente de energía, las protege del daño relacionado con la temperatura, mantiene un pH (capacidad amortiguadora)

y osmolaridad adecuados para que los espermatozoides puedan sobrevivir por periodos cortos o largos de tiempo dándole las cualidades principales de supervivencia (Salaron y Maxwell, 1995, citado en Rojas, 2014, p.35).

### **1.6.1. Características que debe de tener un diluyente o dilutor**

Los medios para la conservación espermática deben cumplir las siguientes características:

- Contener una o más sustancias de tipo iónico que mantengan una adecuada presión osmótica y que protejan de los cambios bruscos de pH. Tales sustancias pueden ser: Tris, Tes, ácido cítrico, citrato de sodio y carbonato de sodio, entre otros.
- Contener una fuente de LDL (lipoproteínas de baja densidad) que proteja contra el shock por frío. En este grupo encontramos a la yema de huevo y a la leche.
- Contener un agente crio protector como glicerol, etilenglicol, propilenglicol o dimetilsulfóxido. También se pueden utilizar otros elementos como disacáridos o trisacáridos de alto peso molecular para brindar a las medias características de hipertonidad.
- Contener una fuente de energía, por lo regular monosacáridos como la glucosa o fructosa.
- Contener otros aditivos como antibióticos que protegen contra la proliferación de agentes patógenos como bacterias y hongos. Habitualmente se utiliza la combinación penicilina-estreptomicina. Se recomienda añadir 1000 UI de penicilina sódica y 1 mg de sulfato de estreptomicina por ml de diluyente (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 2000; Barbas y Mascarenhas, 2009; Cebrián et al., 2010; citado en Rojas, 2014, pp.35-36).

### **1.6.2. Sustancias tampón**

Los diluyentes deben incluir compuestos con capacidad tamponante ya que grandes cambios en el pH del semen pueden causar daños en los espermatozoides, mortalidad espermática o infertilidad (Rasul, Z. et al., 2000; Purdy, P. 2006; citado en Rojas, 2014, p.36).

Por lo tanto, a fin de mantener la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides es necesario mantener un ambiente adecuado mediante el control de las fluctuaciones de pH en los medios de crio-conservación (Rojas, 2014, p.36).

Una de las funciones del plasma seminal consiste precisamente en amortiguar los cambios de pH en condiciones in vivo, pero no bajo condiciones in vitro. Por esta razón, las sustancias que amortiguan los cambios de pH se incluyen de manera rutinaria en la crio-conservación, para reducir al mínimo los cambios (Rojas, 2014, p.36).

En general, una solución de amortiguación para los espermatozoides de caprino debe tener un pKa (es la fuerza que tienen las moléculas al disociarse) de 7.0 (pH 6.0-8.0), ser soluble en agua e impermeable a la membrana, tener interacciones mínimas con las sales, verse mínimamente afectada por concentraciones de tampón, la temperatura y los contenidos iónicos de la disociación del tampón, así como ser capaz de soportar degradación enzimática y no enzimática (Rojas, 2014, p.36).

El pH de los diluyentes a base de yema de huevo y leche normalmente oscila entre 6.75 y 6.8. Se ha observado que el pH del diluyente es muy importante para maximizar la respiración espermática y motilidad. El consumo de oxígeno de las células espermáticas caprinas es máximo entre pH 7.2-7.5 y la motilidad espermática es óptima entre pH 7.0-7.2, lo cual indica que un medio adecuado para la sobrevivencia espermática in vitro debería tener un pH de 7.2. Esto es lógico porque el semen de mamíferos normalmente tiene un pH entre 7.2 y 7.8 (Barbas y Mascarenhas, 2009,p.45).

Entre las sustancias tampón se encuentran el fosfato, citrato sódico y tampones orgánicos que incluyen Tris, los llamados zwitterionicos como Tes, Hepes, Mops, Bes, Mes, Pipes, Tricine. (Cebrián, P., et al., 2010, citado en Rojas, 2014, p.37).

Los tampones orgánicos tienen mayor capacidad que el citrato o fosfato, pueden penetrar en el interior de la célula actuando como tampones intracelulares y pueden aumentar la tolerancia del espermatozoide frente a un aumento intracelular en cationes monovalentes por lo que suelen utilizarse con mayor frecuencia en los medios de conservación espermática (Cebrián, P., et al., 2010, citado en Rojas, 2014, p.37).

La concentración del tampón afecta la viabilidad espermática ya que la capacidad de resistencia en las concentraciones del tampón varía en función de cada especie. Así, los espermatozoides de caprino pueden sobrevivir a concentraciones de Tris en un amplio rango (300-600 mM). Los tampones zwitterionic se utilizan en menor grado por que la calidad espermática y los niveles de fertilidad son poco satisfactorios (Según Purdy, P. 2006., citado en Rojas, 2014, p.38).

El mecanismo por el cual los sistemas tampón protegen a la célula espermática sigue siendo una incógnita, pero en general se acepta que los mismos ayudan al proceso de deshidratación celular por la creación de una fuerza osmótica, aumentando así la estabilidad de la membrana plasmática y neutralizando los ácidos generados durante el almacenamiento (Molinia, F., et al., 1994., citado en Rojas, 2014, p.38).

### **1.6.3.                    *Sustancias crio protectoras***

Para mejorar la viabilidad celular es necesario alterar el comportamiento físico-químico de las soluciones acuosas en las cuales tiene lugar la crio-conservación, para ello se añaden al medio de congelación los agentes crio protectores. Las cuales son sustancias muy hidrosolubles y de baja citotoxicidad que disminuyen el punto eutéctico de una solución determinada (temperatura mínima a la que una solución se encuentra en estado líquido) ( Salamon y Maxwell, 1995., citado en Rojas, 2014,pp.38-39).

El descenso del punto eutéctico implica que se alcanzará una concentración dada de solutos a una temperatura menor, de forma que la célula estará más hidratada y el gradiente osmótico al que estará sometida será menor en el momento de la congelación del espacio extracelular (Portillo et al., 2006,p.294).

Bioquímicamente es posible distinguir tres tipos de crio protectores, los alcoholes (metanol, etanol, propanol, 1-2 propanediol, glicerol), azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y el dimetil sulfóxido. De acuerdo a su sitio de acción y/o permeabilidad celular las sustancias crio protectoras pueden clasificarse en: penetrantes y no penetrantes (Portillo et al., 2006,p.294).

#### **1.6.3.1.                    *Crio protectores penetrantes***

Los crio protectores penetrantes son de bajo peso molecular, permeables a la membrana celular, capaces de llegar al interior del citoplasma celular, actúan intra y extracelularmente protegiendo las células de lesiones producidas en el proceso de congelación a velocidad lenta (Portillo et al., 2006,p.295).

Los crio protectores penetrantes son solutos que causan la deshidratación de los espermatozoides debido al flujo de agua impulsado osmóticamente, que varía de acuerdo a los componentes del medio. Después de un periodo corto periodo de tiempo el crio protector las la sustancia líquida (agua) se equilibran dando como resultado concentraciones similares intra y extracelularmente (Portillo et al., 2006,p.295)

Como la célula espermática ahora tiene menos agua intracelular, el punto de congelación de la célula se reduce, por lo tanto, hay menos formación de hielo intracelular, lo que es muy beneficioso, porque el hielo celular resulta en muerte de la célula, en consecuencia reducción de la fertilidad de la muestra de semen (Portillo et al., 2006,p.295).

Los crioprotectores penetrantes también causan reordenamiento de lípidos y proteínas, lo que resulta en aumento de la fluidez de la membrana, mayor deshidratación a temperaturas bajas y por tanto una mayor capacidad para sobrevivir a la criopreservación. Además, los crioprotectores penetrantes son solventes que disuelven azúcares y sales en el medio de criopreservación (Portillo et al., 2006,p.295).

En este grupo encontramos al glicerol, metanol, etilenglicol, propilenglicol, 1,2- propanediol, butanediol, acetamida y dimetil sulfóxido. Las sustancias crioprotectoras se pueden clasificar en dos grupos: en el primer grupo incluyen aquellas de rápida penetración al interior de la célula, como el dimetil sulfóxido, etilenglicol y propilenglicol, mientras que en el otro grupo se encuentran las sustancias de lenta penetración celular, mismas que presentan mayor peso molecular como el glicerol (Portillo et al., 2006,p.295).

El glicerol es la sustancia crioprotectora más comúnmente utilizada para adicionar a los diluyentes con la finalidad de conservar el semen refrigerado o congelado en la mayoría de las especies de interés zootécnico (Molina et al., 1994.,Salamon y Maxwell, 1995., Salamon y Maxwell, 2000., citado en Rojas, A. 2014,p.40).

Al igual que otras sustancias que son capaces de penetrar la barrera de la membrana celular, reduce los daños causados por la formación de cristales de hielo en el citoplasma celular del espermatozoide, actúa como un diluyente mediante la reducción del grado de disociación de las sales, disminuye la presión osmótica del medio de congelación y, además, tiene un efecto bacteriostático (Molina et al., 1994.,Salamon y Maxwell, 1995., Salamon y Maxwell, 2000., citado en Rojas, A. 2014,p.40).

La concentración de glicerol óptima a utilizar se encuentra alrededor del 6 a 8% (v/v), sin embargo, varios investigadores manifestaron que el glicerol puede ser tóxico para el espermatozoide, lo cual reduce su capacidad fecundante (Molina et al., 1994., Salamon y Maxwell, 1995., Royere et al., 1996., Holt, 2000., Salamon y Maxwell.,2000., Watson, 2000., citado en Portillo et al., 2006,p.296)

El nivel de glicerol incluido en el medio de congelación es limitado por su toxicidad, que a su vez depende de la tasa de enfriamiento y congelación, la composición del diluyente y el método de adición del glicerol. Se ha observado que, a una velocidad alta de enfriamiento, la concentración óptima de glicerol es menor y las mejores tasas de supervivencia de los espermatozoides se observan a una velocidad de congelación de 10 - 100 °C/min. osmótica (Barbas, y Mascarenhas, 2009, p.46).

Además la velocidad de enfriamiento, por concentración óptima de glicerol depende del diluyente (composición) y en particular de la presión osmótica. Las concentraciones de glicerol también se ven influenciadas por los niveles de yema (huevo) en el medio a congelar, ya que al incrementar la concentración de yema se puede reducir el glicerol. (Barbas, y Mascarenhas, 2009, p.46).

#### *1.6.3.2. Crio protectores no penetrantes*

Son sustancias que no pueden penetrar al interior del citoplasma celular, debido a su alto peso molecular y gran tamaño. Por lo tanto, no son crio protectores propiamente dichos, ya que no penetran en la célula, sino que ejercen su acción crio protectora promoviendo la rápida deshidratación celular y suelen usarse asociados a los agentes penetrantes (Barbas y Mascarenhas, 2009,p.47)

Un crio protector no penetrante puede alterar la membrana plasmática o actuar como un soluto, bajar el punto de congelación del medio y disminuir la formación de hielo extracelular. En este grupo se encuentran la sacarosa, glucosa, trehalosa, dextosa, polivinilpirrolidona (PVP), aminoácidos, dextrano, polietilenglicol, además de la yema de huevo y la leche desnatada (Barbas y Mascarenhas, 2009,p.47)

La yema de huevo generalmente no se considera como un agente crio protector, pero debido a sus características y el papel que juega en la protección de la célula espermática es posible considerarla como tal. Esta es un componente normal de los diluyentes que protege a los espermatozoides contra el shock por frío y a la membrana celular durante la congelación, el proceso de descongelación. También mantiene la motilidad, integridad del acrosoma, además, la integridad de la membrana de la mitocondria y del citoplasma del espermatozoide (Barbas y Mascarenhas, 2009,p.47).

Es considerada como un tampón natural, ya que en su presencia las células espermáticas son capaces de soportar dilutores tanto hipertónicos como hipotónicos. La cantidad de yema de huevo generalmente utilizada en el medio de congelación va de 2 al 20%, dependiendo de varios factores como la composición del diluyente, concentración de glicerol, así como la especie animal cuyo semen se va a congelar (Barbas y Mascarenhas, 2009,p.47).

La yema de huevo fresco es un aditivo común en los diluyentes para la conservación espermática. Sin embargo, representa un riesgo potencial de contaminación microbiológica en el diluyente, debido a que es de origen animal (Rojas, 2014, p.45).

La contaminación potencial se puede evitar usando la yema de huevo en polvo, ya que es pasteurizada. En ovinos y bovinos se ha utilizado la yema de huevo en polvo, obteniendo buenos resultados tras la congelación - descongelación sobre todo en los parámetros de viabilidad y motilidad espermática (Rojas, 2014, p.45).

#### **1.6.4. Utilización de la Yema de Huevo**

La yema de huevo se utiliza ampliamente para la dilución del semen de diferentes especies. En bovinos constituye un clásico, dado el alto nivel de “factores de protección espermática” que se le atribuyen. Este efecto protector sería debido a la presencia de lipoproteínas, lecitinas y glucosa; lo que permitiría el mantenimiento de la viscosidad del semen, formaría un barniz protector alrededor de los espermatozoides y proveería de nutrientes a los mismos (De la Vega, 2014,p.2).

#### **1.7. Evaluación Seminal**

El análisis del material seminal o también denominado espermograma incluye varias pruebas donde se evalúa una serie de factores a nivel macroscópico y microscópico, con el fin de poder clasificar la muestra como competente o no para su uso en programas de inseminación artificial ( Hafez, 2003.,citado en Hernández, 2014, p.5).

A continuación, se realizará una breve descripción de las características tanto macroscópicas como microscópicas.

##### **1.7.1. Características macroscópicas**

La valoración a nivel macroscópico en primera instancia está determinada por la valoración visual del color, densidad, aspecto y presencia de algún material extraño; así como también, la medición del volumen (Pineda,2002, citado en Hernández, 2014, p.13)

El semen debe poseer algunas características como tener un color blanco; ya que según estudios tanto el color como la densidad de la muestra están en relación directa con la concentración de espermatozoides. Otro de los aspectos a valorar es el aspecto del eyaculado, el cual debe ser homogéneo. Para lo cual, se puede realizar una prueba mediante la inclinación ligera del tubo de colección y dejando correr su contenido por las paredes (Vale, 2011,p.35).

Esto con el fin de evidenciar grumos, lo cual estaría correlacionado principalmente con la presencia de pus, siendo un indicativo de procesos inflamatorios. El color rosado del semen indica presencia de sangre y puede deberse a lesiones del pene o del aparato reproductor (Vale, 2011,p.35).

De igual forma, se pueden encontrar muestras de material seminal de color verde- amarillento, lo cual corresponde con un pigmento llamado riboflavina que se produce en las glándulas vesiculares y que es inocuo; esto no debe confundirse con orina, la cual tiene un olor característico (Hafez, 2003, p.18).

En cuanto al volumen de un eyaculado para la especie caprina es de 1 ml, en donde existen variaciones por diversos factores como el método de extracción seminal, el estado fisiológico del macho, raza, edad, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete (Cortes, 2002, p.32). El eyaculado de los caprinos presenta las siguientes características físicas y morfológicas, como se presenta en la tabla 3-1.

**Tabla 3-1:** Características del eyaculado de un semental caprino obtenido mediante la vagina artificial

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

**Fuente:** (Grajales et al., 2011, citado en Hernández, 2014,p.14)

### **1.7.2. Características microscópicas**

Dentro de la evaluación de las características microscópicas se incluye: motilidad espermática, tanto masal como individual, determinación de la viabilidad mediante el conteo de espermatozoides vivos - muertos por una tinción supra vital, la determinación de las anormalidades morfológicas tanto de cabeza, pieza media y cola de los espermatozoides (Rodríguez, y Martínez, 2003, p.22).



### *1.7.2.1. Concentración espermática*

La concentración espermática es una de las valoraciones rutinarias de contrastación seminal más importantes, ya que la tasa de dilución depende de ella y por ende el número de dosis por eyaculado (Bonet et al, 2006.,Cebrián et al., 2010.,citado en Hernández, 2014,p.6).

La fertilidad aumenta a medida que se incrementa la concentración de espermatozoides por dosis, si bien a partir de un determinado nivel ya no obtenemos una mejora en la fertilidad. A este respecto, se han realizado diversas investigaciones para determinar la concentración adecuada para la inseminación artificial, dicha concentración va desde  $200 \times 10^6/\text{ml}$  hasta  $400 \times 10^6 /\text{ml}$  (Salamon y Maxwell, 1995., Leboeuf et al., 2000., Cseh et al., 2012.,Faigl et al., 2012., citado en Hernández, 2014,p.6).

Existen varias formas para realizar este cálculo, siendo las más utilizadas las cámaras de recuento celular (Burker, Thoma y Makler) y en menor medida se utilizan los contadores celulares electrónicos y los programas informáticos de análisis seminal (Hernández, 2014, p.7).

### *1.7.2.2. Motilidad Espermática*

La estimación visual del porcentaje de espermatozoides móviles es la prueba que se utiliza con más frecuencia para evaluar la viabilidad de los espermatozoides en semen fresco y descongelado. (Vilanova y Gatica, 2002,p.203).

La motilidad es un buen indicador viabilidad espermática y por ende su relevancia para la fertilidad. Sin embargo, su valoración por sí sola, no es capaz de predecir el nivel fecundante de una muestra de semen (Vilanova y Gatica, 2002,p.203).

La valoración subjetiva por personas experimentadas es de gran valor, debido a que la información se presenta de forma inmediata, además de ser un método económico y de fácil ejecución (Vilanova y Gatica, 2002,p.203).

No obstante, hay que ser consciente que la subjetividad del método puede llevar a la obtención de diferentes resultados para una misma muestra. En la actualidad existe el análisis computarizado de la motilidad espermática como el Sistema Computarizado para Análisis de Semen (Computer Assisted Motility Analysis), con el propósito de tener una evaluación objetiva del movimiento del espermatozoide y la posibilidad de analizar los diferentes patrones de motilidad de las células que se encuentran en una muestra seminal, especialmente luego de haber sido procesada (Hernández, 2014, p.9).

Ciertos patrones de movimiento, como el movimiento lineal están significativamente correlacionados con la fertilidad del caprino in vivo, como se ha comprobado en muestras congeladas y descongeladas (Hernández, 2014, p.9).

La determinación de la motilidad post- descongelación por sí sola, no es capaz de predecir el nivel fecundante de una muestra de semen para I.A. Los espermatozoides maduros son esencialmente células catabólicas que tienen una serie de organelos como el axónema y las mitocondrias que aseguran los patrones de motilidad que ayudarán en la movilización del espermatozoide y a la penetración de la zona pelúcida (Rigau, et al., 2001, p.22).

El patrón de movimiento espermático está modulado por numerosos factores y a su vez está íntimamente relacionado con la gestión del metabolismo energético espermático (Rigau, et al., 2001, p.22).

La pérdida de la motilidad flagelar está directamente relacionada con alteraciones del axónema e indirectamente con una disminución en la producción (Dorado, et al, 2007, p.40).

Siendo la motilidad flagelar progresiva y lineal, estimulada tras la eyaculación y modulada durante el tránsito a través del tracto reproductivo de la hembra e implicando cambios secuenciales importantes que reflejan modificaciones en la actividad metabólica de los espermatozoides, puesto que la motilidad es la principal causa del consumo energético espermático (Dorado, et al, 2007, p.40).

Por lo tanto, en un eyaculado fértil deberá existir un porcentaje significativo de espermatozoides capaces de llevar a cabo estos cambios de motilidad. Cabe mencionar que la motilidad espermática post - descongelación se ve afectada por daños ultra estructurales, bioquímicos y cambios funcionales causados por la congelación y la descongelación (Dorado, et al., 2007, p.40).

#### *1.7.2.3. Motilidad individual progresiva*

La motilidad progresiva es un indicativo de que los espermatozoides son viables, por ende, es una de las principales pruebas que se realizan en las diferentes especies. Su valoración está basada en la observación del movimiento individual de las células con el fin de determinar el porcentaje de células móviles en el eyaculado. Fisiológicamente durante la capacitación, el espermatozoide experimenta un aumento paulatino de la motilidad, evento conocido como hipermotilidad (Vale, 2011, p.33).

Una metodología para la observación de la motilidad en el microscopio es utilizar el aumento de 40 X y se debe diluir una gota de semen en citrato de sodio al 2,9 %, el cual debe estar a la temperatura de 37 °C para evitar el choque térmico que inmovilizarían a los espermatozoides y/o causaría su muerte. Se procede a colocar una gota de semen diluido en un portaobjeto precalentado, se cubre con un cubreobjetos y se observa el movimiento de los espermatozoides (Hernández, 2014, p.12).

El movimiento normal de la célula es el que realiza en forma progresiva y en línea recta, encontrándose correlación entre el movimiento rectilíneo y la fertilidad (Rigau, et al., 2001; Rodríguez, y Martínez, 2003). Es necesario observar varios campos en el frotis, para así tener una mejor valoración de las células móviles. Es muy importante cuidar que la muestra a evaluar no entre en contacto con material húmedo o frío, porque se comprometería la sobrevivencia de los espermatozoides y se obtendrían lecturas falsas (Pineda, 2002, citado en Hernández, 2014, p.14).

#### *1.7.2.4. Morfología Espermática*

El estudio de la morfología espermática es otra prueba importante, se ha demostrado que es un indicador importante del descenso del parámetro fertilidad en un gran número de especies animales. Las anomalías localizadas en la cabeza del espermatozoide se encuentran asociadas con la reducción de la capacidad para unirse al óvulo y por ende pérdida embrionaria temprana, disminución en la fertilidad y calidad del embrión (Hernández, 2014, p.14).

Además de aportar una referencia sobre la fertilidad del eyaculado, la morfología espermática permite la posibilidad de detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria (Hernández, 2014, pp.14-15).

La morfología espermática puede ser evaluada de dos maneras: 1) por definición de la proporción relativa de células dentro de una categoría morfológica predefinida mediante la observación con un microscopio óptico y la evaluación del impacto de las formas anormales en la capacidad fecundante de la muestra de semen o 2) mediante el cálculo morfométrico de los parámetros espermáticos básicos (cabeza, acrosoma, pieza intermedia, etc.) mediante sistemas informatizados y la definición de los biotipos celulares básicos utilizando técnicas de estadística que permitan determinar el potencial fecundante de las muestras analizadas (Hernández, 2014, pp.14-15).

Para poder observar las células se utilizan diferentes tinciones espermáticas, como azul de metileno, rosa de bengala, etc., que proporcionan una distribución homogénea del colorante en el interior de la célula, permitiéndonos así diferenciar el contorno de la misma, al tener un buen contraste con el fondo del campo de visión; en cambio hay otras como la Eosina- nigrosina, Giemsa, William, Papanicolaou, que buscan visualizar partes específicas del espermatozoide o resaltar el resto de las estructuras (Hafez, 2003,p.24).

El análisis tradicional es un método subjetivo, lo que predispone a que existan variaciones importantes entre técnicos y laboratorios que hacen difícil la interpretación exacta y comparación de resultados. Actualmente existen en el mercado equipos que permiten el análisis automático de la morfología espermática (ASMA) (Hernández, 2014, p.p.14-15).

Con estos programas podemos evaluar de forma objetiva, precisa, exacta y repetible la forma y dimensiones de la cabeza de los espermatozoides, revelando sutiles diferencias que no son detectadas visualmente. Sin embargo, los sistemas ASMA requieren para su correcto funcionamiento una estandarización previa propia de cada especie, que consiste en una adecuada preparación y tinción de las muestras, así como el calibrado del equipo (Hernández, 2014, p.p.14-15).

La elección de las condiciones en las que se realiza el análisis puede determinar cambios significativos en la morfología observada; así que se deben elegir cuidadosamente las técnicas de tinción, el tamaño de muestra, el sistema óptico, los aumentos, la cámara de video y el procesado de las imágenes (Hernández, 2014, p.p.14-15).

### **1.8. Método de recolección de semen para caprinos**

La técnica más recomendada para obtener una colecta de semen es el empleo de una “vagina artificial”, que provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir la eyaculación. La misma que consiste en una parte externa rígida, por ej. Caño de polipropileno térmico (17 cm x 5.5 cm), y una camisa interna de látex (Gibbons, et al, 2004,p.5)

Esta se repliega y asegura sobre los extremos del tubo externo con bandas elásticas formando, entre la cubierta y la camisa, un compartimento hermético para el agua. A uno de los extremos de la vagina, se adosa un tubo (Gibbons, et al, 2004,p.5)

La vagina se carga hasta sus 2/3 partes con agua caliente a 50 °C o más, según las pérdidas de calor que se produzcan hasta el momento de su utilización, siendo importante que la temperatura interior de la misma al momento de la eyaculación, sea de aproximadamente 38-40 °C. El

acondicionamiento final de la vagina se logra por el agregado de aire a la cámara de agua con el fin de estrechar la luz vaginal a aproximadamente 1 cm de diámetro (Gibbons, et al, 2004,p.5)

La recolección del semen se realiza en un lugar limpio y libre de polvo. Se lava el prepucio con solución fisiológica y recortan los pelos prepuciales, para disminuir la contaminación del semen (Gibbons, et al, 2004,p.5)

Los machos caprinos generalmente se acostumbran con facilidad a realizar la eyaculación en la vagina artificial. La técnica consiste en realizar la desviación manual del pene en el momento en que el macho realiza la monta sobre una hembra inmovilizada. El tubo colector debe protegerse de los cambios bruscos de temperatura durante toda la operación y hasta su colocación en un baño de agua a 37 °C (Gibbons, et al, 2004,p.5)

### **1.9. Congelación de semen de caprino**

El proceso de congelación se realiza en dos etapas, enfriamiento y congelación propiamente dicha. Un factor importante a considerar antes de iniciar el proceso es el método de adición del crioprotector penetrante, ya que puede realizarse en uno o dos pasos. El glicerol puede añadirse directamente en el diluyente en una única etapa (método en un paso) o añadirse en una fracción separada del diluyente, cuando la muestra diluida haya alcanzado los 5°C (método en dos pasos; Salamon y Maxwell, 1995; Anel et al., 2003; Cebrián et al., 2010) (citado en Rojas, 2014, p.48).

Con el fin de valorar si existe alguna ventaja del método de dos pasos sobre el de un solo se han realizado varios estudios sin encontrarse diferencias; por ello, se prefiere el uso del método en un solo paso, por su simplicidad y menor manejo del semen antes de la congelación (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995; Salamon y Maxwell, 2000) (citado en Rojas, 2014, p.49).

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 (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995; Salamon y Maxwell, 2000; Cebrián et al., 2010) (citado en Rojas, 2014, p.50).

Generalmente, en las primeras dos horas ocurre la disminución de temperatura en la muestra hasta igualarse con su entorno (5°C; Salamon y Maxwell, 1995). 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 equilibrado (citado en Rojas, 2014, p.50).

Durante este periodo los espermatozoides permanecen en contacto con el glicerol antes del proceso de congelación, permitiendo que este penetre en las células espermáticas y establezca un equilibrio entre la concentración intra y extracelular, pero no solo de glicerol, sino también del resto de componentes osmóticamente activos (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a; Salamon y Maxwell, 2000; Cebrián et al., 2010) (citado en Rojas, 2014, p.50).

La congelación se realiza en vapores de nitrógeno líquido, de forma manual o automatizada. Para realizar este proceso de forma manual, la velocidad de congelación se regula por distancia de las pajuelas o tubos al nivel del nitrógeno líquido (10 a 100 °C/minuto). Las pajuelas se colocan horizontalmente en una gradilla a una distancia de 3-4 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno o de cualquier material aislante (Cebrián et al., 2010., citado en Rojas, 2014, p.50).

Las pajuelas se exponen a los vapores de nitrógeno líquido (-80 a -100°C) durante 10 a 20 minutos y posteriormente son depositadas directamente en el nitrógeno líquido -196 °C (Evans y Maxwell, 1990; Salamon y Maxwell, 1995a; Salamon y Maxwell, 2000; Dorado et al., 2007; Balcázar y Porras, 2008) (citado en Rojas, 2014, p.50).

La congelación automatizada se realiza mediante un bio-congelador programable controlado por un ordenador. Consiste en un arcón, en el cual va entrando de forma controlada el nitrógeno para ir disminuyendo progresivamente la temperatura, ajustándose a una rampa previamente fijada (Evans y Maxwell, 1990; Cebrián et al., 2010; citado en Rojas, 2014, p.50)

En cuanto a la velocidad de congelación, hay que tener en cuenta que, si la velocidad es demasiado rápida, se forman cristales de hielo intracelulares que provocan serias lesiones y rotura de la membrana plasmática (Rojas, 2014, p.51)

Pero si, por el contrario, esa velocidad es demasiado lenta, la formación de cristales de hielo comienza en el exterior celular, produciendo la salida de agua del interior de la célula, en un intento por compensar el aumento de la osmolaridad en el medio extracelular y la célula se deshidrata (Rojas, 2014, p.51).

Existe pues una velocidad óptima de congelación, que será variable para cada especie y para cada tipo de envase empleado. Dicha velocidad oscila entre -10 y -80 °C/min. Lo mismo ocurre para el proceso de descongelación (Rojas, 2014, p.51).

## **1.10. Proceso de descongelación**

La descongelación del semen es un punto muy crítico, siendo esta fase tan importante como el proceso de congelación para la supervivencia espermática. Además de los daños ocasionados por la congelación, los espermatozoides se pueden deteriorar si este proceso no se lleva a cabo de una forma apropiada (Rojas, 2014, p.52).

Como norma general, cuanto más rápidamente se congele el semen, más rápido se debe descongelar a fin de obtener una más rápida recuperación de los espermatozoides. El semen de macho cabrío, congelado por cualquiera de los métodos pellets o pajuelas, se debe descongelar a una temperatura no inferior a 37°C. Las muestras pueden descongelarse a velocidad rápida o lenta. El ritmo de descongelación se incrementa con temperaturas elevadas (60-75 °C) (Rojas, 2014, p.51).

Si se descongelan rápidamente, las células están menos tiempo en contacto con los solutos concentrados y con el crio protector, por tanto, la restauración del equilibrio intra y extracelular es más rápida, pero al usar altas temperaturas durante poco tiempo, existe el peligro de una exposición a temperaturas por encima del nivel crítico que pueden ser fatales para las propias células (Rojas, 2014, p.51).

Lo más frecuente es descongelar las pajuelas de semen por inmersión en baño de agua a 37°C durante 30 segundos o bien a 50 °C durante 9 segundos (Evans y Maxwell, 1990; Cebrián et al., 2010). La descongelación de los pellets puede realizarse a 37°C durante 10 a 15 segundos ya sea en tubos secos o en tubos conteniendo solución salina fisiológica (citado en Rojas, 2014, p.51).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1. Localización y Duración del Experimento

La presente investigación se llevó a cabo en la Unidad Académica de Investigación Ovino Caprina y Camélida (UAI OCC) de la Estación Experimental Tunshi, ubicada en la Parroquia Licto, cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

Las condiciones meteorológicas de la zona se detallan en la (tabla 4 -2).

**Tabla 4-2:** Condiciones Meteorológicas de la Estación Experimental Tunshi.

Parámetros	Promedios
Temperatura, °C	14.92
Humedad Relativa, %	76.2
Precipitaciones Anuales, mm/año	842
Altitud, msnm	2.712
Vientos km/h	15

**Fuente:** Estación meteorología de la FRN. ESPOCH (2019).

El trabajo experimental tuvo una duración de 120 días, distribuidos en la recolección del semen, análisis de laboratorio, dilución y congelamiento.

Los análisis microscópicos al post-descongelamiento de las pajuelas se realizaron en el Laboratorio de Reproducción Animal e Inseminación Artificial de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH.



## **2.2. Unidades Experimentales**

En la presente investigación la unidad experimental estuvo constituida por 1 dosis seminal de 0,5 ml congelada en nitrógeno líquido, proveniente de 1 macho cabrío de la raza Saanen de 4 años de edad, utilizando tres tratamientos con 10 repeticiones, siendo necesarias un total de 30 dosis para el desarrollo del experimento.

## **2.3. Materiales, Equipos e Instalaciones**

Los materiales, equipos e instalaciones que se utilizaron en la presente investigación se distribuyen de la siguiente manera:

### **2.3.1. *Materiales***

- Machos cabríos (3)
- Hembras caprinas (2)
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas Pasteur
- Micropipeta
- Reactivos para tinciones
- Vasos de precipitación
- Gradillas
- Pinzas
- Tubos de ensayos
- Tubos de Eppendorf
- Pipetas Pasteur
- Pajillas plásticas (varios colores)
- Jeringas
- Esferas de vidrio (tapas de pajillas)
- Cámara de Neubauer
- Aceite de inmersión
- Termómetro de líquidos
- Termo
- Papel aluminio
- Toallas absorbentes

- Cápsula magnética de agitación
- Guantes estériles
- Fundas de recolección de semen con filtro incorporado
- Diluyente Andromed
- Diluyente Triladyl
- Hormona (Estrumate)
- Nitrógeno Líquido
- Agua Bidestillada
- Eosina - Nigrosina

### **2.3.2. Equipos**

- Microscopio electrónico
- Balanza
- Baño María
- Vagina Artificial para caprinos
- Peachimetro digital
- Agitador magnético
- Termo de Nitrógeno
- Mini congeladora portátil CRYOGEN
- Termohigrómetro
- Cámara fotográfica
- Equipo Sanitario
- Computadora
- Impresora

### **2.3.3. Instalaciones**

La presente investigación se desarrolló en las instalaciones de la Unidad Academia de Investigación Ovino Caprina y Camélida (UAI OCC) de la Estación Experimental Tunshi, y en el Laboratorio de Reproducción Animal e Inseminación Artificial de la Facultad de Ciencias Pecuarias de la ESPOCH.

## 2.4. Tratamiento y Diseño Experimental

Para la presente investigación sobre el efecto de tres dilutores en la crío-conservación seminal de semen caprino las unidades experimentales fueron modeladas con el empleo de un (DCA) Diseño Completamente al Azar ajustándose al siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{ij}: \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Valor Estimado de la variable

$\mu$  = Media General

$T_i$  = Efecto de los tratamientos (Dilutores).

$\epsilon_{ij}$  = Efecto de la aleatorización de las unidades experimentales (Error experimental)

### 2.4.1. Esquema del Experimento

En la tabla 4-2. Se indica el esquema del experimento que se utilizó en la presente investigación

**Tabla 5-2:** Esquema del Experimento.

Tratamientos	Código	T. U. E	Repeticiones	Total
Tris Yema +Glicerol	D1T1L	1	10	10
Dilutor Comercial 1 (TRILADYL)	D2T2T	1	10	10
Dilutor Comercial 2 (ANDROMED)	D3T3A	1	10	10
			<b>TOTAL</b>	<b>30</b>

T. U. E = Tamaño de la unidad Experimental

**Realizado por:** Ramos, Valeria, 2019.

## **2.5. Mediciones Experimentales**

### **2.5.1. *Macroscópicas***

- Volumen por eyaculado, ml
- Color
- Olor
- Aspecto
- pH

### **2.5.2. *Microscópicas***

- Motilidad masal, %
- Motilidad individual, pts.
- Determinación de células vivas y muertas, %
- Concentración espermática, Spz/ml
- Morfología espermática, %
- Anormalidades del espermatozoide, %

### **2.5.3. *Evaluación de dosis seminales en la crio-conservación***

Las mediciones experimentales en el post descongelamiento fueron las siguientes

- Motilidad masal, %
- Motilidad individual, pts.
- Determinación de células vivas y muertas, %

### **2.5.4. *Evaluación Económica***

- Determinación de ingresos y egresos, USD
- Determinación del costo de producción, USD

## **2.6. Análisis estadístico y Pruebas de Significancia**

Los resultados obtenidos fueron sometidos a los siguientes análisis estadísticos, junto al esquema para el (ADEVA) como se muestra en la (tabla 6-2).

- Análisis de varianza (ADEVA).
- Separación de medias por Duncan con  $P < 0,05$  y  $P < 0.01$
- Correlación, para variables que reporten significancia.
- Estadística descriptiva

**Tabla 6-2:** Esquema del ADEVA

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
<b>Total</b>	29
<b>Tratamiento</b>	2
<b>Error</b>	27

Realizado por: Ramos, Valeria, 2019.

## **2.7. Procedimiento Experimental**

### **2.7.1. De campo**

#### **2.7.1.1. Selección de machos cabríos**

Para la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino, se utilizó como unidad experimental 1 macho cabrío, proveniente de un grupo de 3 machos previamente seleccionados del chato de la UAIOCC.

Para la selección de los machos cabríos se consideraron los siguientes aspectos:

- Animales de 1 a 5 años de edad
- Buena simetría testicular
- Libre de lesiones en pene y prepucio
- Sin anomalías físicas
- Buen estado de salud

Se realizó una limpieza corporal de los animales y despálme.

### 2.7.1.2. *Método de extracción seminal*

Los machos cabríos fueron sometidos a entrenamiento y habituados a la extracción seminal mediante el uso de vagina artificial, seleccionándose el animal que se adaptó mejor al entrenamiento y al método de extracción.

Previo a la extracción seminal se utilizó una hembra caprina la cual fue tratada con 0.5 ml de Estrumate (Prostaglandina Sintética) por vía intramuscular, una vez que la hembra se encontró lista para el incentivo del macho se la llevo a la sala de extracción seminal siendo colocada en el podio, procedimiento que se llevó acabó dos veces por semana.

### 2.7.1.3. *Preparación de la vagina artificial*

Se colocó en el interior de la vagina artificial una manga de goma, los extremos de esta manga fueron doblados hacia la parte externa y fijados con ligas de presión, en uno de los extremos se colocó un embudo que en su parte final se acoplo un tubo de Eppendorf, el espacio existente entre la camisa y el tubo se llenó con agua caliente hasta tres cuartos aproximadamente a 60°C de temperatura.

Enseguida se incorporó aire por la válvula para generar la presión necesaria y extender la manga hacia el centro del tubo disminuyendo su luz, simulando de esta forma la vagina de la hembra caprina, de forma inmediata se forro con papel aluminio y coloco un capuchón de protección al extremo de la vagina artificial, en la cual se colocó un embudo más el tubo de Eppendorf, ya que este fue el lugar donde se recolectó la muestra seminal de esta manera se brindó protección a la misma de la radiación solar.

Una vez armada la vagina artificial se trasladó a la sala de extracción seminal, y previo a la extracción se colocó al otro extremo del tubo vaselina para lubricación. Además se controló que la temperatura de la vagina haya descendido de 60°C a 45 °C, temperatura a la que el macho cabrío monta.

Todos los accesorios de la vagina artificial fueron debidamente lavados y esterilizados antes de su uso, en el caso del tubo de Eppendorf se utilizó un tubo nuevo y esterilizado en cada extracción seminal realizada.

#### 2.7.1.4. *Extracción y manejo del semen*

La recolección del semen se realizó en una sala de extracción seminal, lugar limpio y libre de polvo, previo a la monta se ejecutó una limpieza del prepucio en donde se recortaron los pelos del mismo para evitar la contaminación del semen.

Ubicada la hembra caprina en el podio de monta, el macho cabrío fue trasladado a la sala de extracción, el mismo que guiado por el incentivo de la hembra en celo sube al podio, de forma inmediata el operador se colocó al lado derecho del macho de modo que su mano diestra sujeto la vagina con el extremo abierto frente al prepucio del macho en un ángulo de 45° en relación al piso.

Una vez realizado el salto del macho el pene fue desviado lateralmente para ser llevado a la vagina artificial, dándose la eyaculación después de que el animal realizo el denominado golpe de riñón, este procedimiento no debe demorar más de 30 segundos.

Una vez obtenida la muestra seminal se procedió a retirar el tubo de Eppendorf de la parte final de la vagina artificial, se tapó y forro con papel aluminio, colocándose la muestra extraída en un termo de transporte a 37°C, de esta manera la muestra fue protegida de cambios bruscos de temperatura, contacto directo con el agua, radiación solar directa, e impurezas, manteniendo la temperatura del semen para continuar con la dilución y se trasladó a las instalaciones de la UAIOCC en donde se adecuo un pequeño laboratorio de análisis en fresco, dilución y congelamiento seminal.

#### 2.7.2. *De laboratorio*

##### 2.7.2.1. *Preparación de diluyentes*

Para la presente investigación se utilizaron 3 diluyentes uno realizado en el laboratorio y dos comerciales los mismos que fueron preparados de acuerdo a las recomendaciones técnicas y de cada una de las casas comerciales como se describe a continuación:

#### 2.7.2.1.1. *Diluyente de Laboratorio Tris Yema + Glicerol*

El mismo que en su composición llevo:

- Tris 0.44g
- Glucosa 0.06 g
- Ácido Cítrico 0.24 g
- Yema de huevo 1.8 ml
- Penicilina 100.000 UI
- Sulfato de estreptomina 0.66 g
- Glicerol 0.6 ml
- Agua Bidestilada hasta completar 12 ml

Se colocó en una probeta 0.44 g de TRIS, 0.06 g de glucosa, 0.24 g de ácido cítrico y agua bidestilada esterilizada hasta completar los 12 ml. La disolución se realizó por agitación, entibiándose ligeramente, de forma inmediata se colocó la penicilina 100.000 UI, sulfato de estreptomina 0,66 g y la yema de huevo 1.8 ml, la misma que debe ser fresca, proveniente de huevos de no más de 3 días.

La cáscara de huevo se lavó cuidadosamente, colocándose en un recipiente con alcohol por unos minutos, se limpió con una toalla de cocina, y dejó secar. Luego de separar la clara, de la yema se situó sobre un papel absorbente a la yema haciéndolas rodar sobre el mismo de esta forma se retiró los residuos de clara dejando únicamente yema de huevo, cuidando de que no se rompa su membrana. Una vez realizada esta acción con una jeringa, se extrajo la yema desde el interior y se enraso la cantidad necesaria.

Cuando ya se colocaron todos los componentes se trasvasa esta dilución en un vaso de precipitación, siendo colocado en un agitador magnético (con una capsula de agitación) para su buena dilución a una temperatura de +35°C una vez homogenizados todos sus componentes se procedió a filtrar la dilución utilizando el filtro de una funda de recolección seminal quedando un volumen final de 6 ml de dilución total.

Finalmente, a la dilución cernida y colocada en un vaso de precipitación se agregó el glicerol gota por gota y se homogenizo en el agitador magnético. De forma inmediata se determinó la temperatura de la dilución final ya que debe ser la misma que la de la muestra seminal (37°C), a su vez se realizó la determinación del pH, cuyos valores debieron oscilar entre 6,7 y 6,9. Tomando en cuenta que si el pH fuera ácido se corrige con una solución de hidróxido de sodio débil (1M=



diluir 0.4 g de NaOH en agua destilada hasta completar 10 ml de solución); si fuera alcalino se corrige con una solución de ácido cítrico (1M= diluir 1.9 g de ácido cítrico en agua destilada hasta completar 10 ml de solución). Con un pH final de 6.8, una vez terminada la dilución se mantuvo en un tubo de ensayo a 37°C en baño maría.

Si el diluyente es preparado un día antes de su utilización, es conveniente completar la preparación, agregando la yema de huevo a la solución; esta última debe entibiarse previamente en baño termostático a 37°C para facilitar la homogeneización. Esta solución puede ser conservada en refrigeración por 2 o 3 días, o congelada por un tiempo mayor. Es recomendable volver a medir el pH al momento de su utilización.

Las estimaciones de las cantidades de cada uno de los componentes de la dilución se realizaron mediante una regla de tres, basándonos en la disolución realizada por (Cueto et al., 2016,p.11), en su manual de obtención, procesamiento y conservación de semen ovino.

#### 2.7.2.1.2. *Diluyente Comercial 1 (TRILADYL)*

El mismo que en su composición llevo:

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

El diluyente listo se compone de una parte de concentrado de Triladyl®, tres partes de agua bidestilada estéril y de una parte de yema de huevo, en relación 1:3:1, lo que significa que cada parte equivale al 20% de su volumen final.

La solución madre se prepara vertiendo una parte de concentrado de Triladyl® (20 %) en un matraz graduado, y agregando en varios pasos 60 % de agua pura estéril. Esta solución madre es estable y puede mantenerse a +5°C por alrededor de una semana.

Para completar el diluyente, deben agregarse a la solución madre 20 % de yema de huevo fresca, siempre y cuando se mantenga la proporción de; Diluyente: Agua: Yema (1:3:1). Se esteriliza la cáscara del huevo colocándolos en un recipiente con alcohol por unos minutos, se limpia con una toalla de cocina, y se deja secar.

Después se parten los huevos cuidadosamente, tratando de separar yema y clara, vertiendo la yema, sin romperla, de una a otra mitad de la cáscara. Para liberar completamente la yema de la clara y las membranas, se colocan una por una sobre papel de filtro, haciéndolas rodar sobre el mismo, logrando que en el papel se queden los residuos de la yema de huevo.

Una vez realizada esta acción con una ajuga de jeringa liberamos el contenido envuelto en la membrana de la yema de huevo. Enseguida, con una jeringa, se extrae la yema desde el interior y se enrasa la cantidad necesaria, para agregar la yema lentamente la solución madre, mezclándola con un agitador magnético o una varilla de vidrio estéril.

La observación estricta de este orden es de importancia para permitir el total desarrollo de las cualidades de conservación del Triladyl® (agregar la solución madre a la yema, no al revés). Para terminar, el diluyente preparado debe filtrarse a través de un filtro-embudo estéril o una gasa estéril, con lo que queda listo para su utilización.

Con estas especificaciones se preparó 12 ml de diluyente, en una relación; Diluyente: Agua: Yema (1:3:1) respectivamente, para lo cual se utilizó 4.2 ml de Triladyl®:7.2 ml de agua bidestilada esterilizada; 4.2 ml de yema de huevo.

Finalmente se procedió a filtrar la dilución utilizando el filtro de una funda de recolección seminal quedando un volumen final de 6 ml de dilución total, a la que se le mide el pH cuyos valores debieron oscilar entre 6,7 y 6,9, teniendo un pH final de 6.7. Una vez terminada la dilución se mantuvo en un tubo de ensayo a 37°C en baño maría.

#### 2.7.2.1.3. *Diluyente Comercial 1 ANDROMED*

El mismo que en su composición llevo:

- TRIS
- Ácido cítrico
- Azúcares
- Antioxidantes

- Tampones,
- Glicerina
- Agua de altísima pureza
- Antibióticos (Tilosina, Gentamicina, Espectinomycin, Lincomicina).

El diluyente AndroMed® debe diluirse en relación 1:4 con agua destilada estéril previamente temperada a +35°C, de acuerdo al volumen requerido es posible preparar AndroMed®, siempre que se mantenga la proporción de 4 partes de agua con 1 parte de concentrado.

Para lograr las propiedades óptimas de conservación de AndroMed®, la cantidad requerida de agua debe agregarse al concentrado y no viceversa. El diluyente preparado AndroMed® debe temperarse antes de su uso en un baño maría a +37°C. Con estas especificaciones se preparó 12 ml de diluyente, en una relación; Diluyente: Agua: (1:4) respectivamente, para lo cual se utilizó: 2.4 ml de AndroMed® y 9.6 ml de agua bidestilada esteril.

Colocándose la cantidad requerida de AndroMed® en un vaso de precipitación y llevado al agitador magnético controlando que la temperatura llegue a +35°C, ya en esta temperatura se coloca el agua bidestilada esteril, la cápsula de agitación en el vaso por unos minutos hasta que la dilución quede bien homogenizada.

Finalmente se procedió a filtrar la dilución utilizando el filtro de una funda de recolección seminal quedando un volumen final de 6 ml de dilución total, a la que se le mide el pH cuyos valores debieron oscilar entre 6,7 y 6,9, teniendo un pH final de 6.7. Una vez terminada la dilución se mantuvo en un tubo de ensayo a 37°C en baño maría.

#### 2.7.2.2. *Dilución*

Tras la llegada de la muestra seminal fresca al laboratorio, inmediatamente fue evaluada y después de haber calculado la concentración espermática y el volumen necesario para cada dilución entonces se realizó una pre dilución en relación 1:1 (0.46 de semen :0.46 de diluyente), manteniendo la misma en baño maría a +37°C. Al momento de la dilución, el diluyente se encontró a la misma temperatura que el eyaculado (+/-1°C).

Una vez evaluado el eyaculado se efectuó la dilución final, y homogenizo colocando papel aluminio en la boca del tubo de ensayo, realizando la inversión del mismo con movimientos delicados.

La dilución final ha sido mantenida hasta entonces a 37 °C en baño maría y a esa temperatura fue envasado en pajuelas de 0,5 ml con una concentración de  $100 \times 10^6$  Spz. /dosis. Posteriormente, el semen diluido y envasado fue colocado en las rejillas de la crio congeladora seminal CRYOGEN.

#### 2.7.2.3. *Crio- Conservación*

Una vez colocadas las pajillas en las rejillas de la mini congeladora portátil CRYOGEN, de inmediato se cerró la puerta de las rampas de la congeladora y se programó a la misma en una curva de congelación dependiendo a la temperatura ambiental a la que se encuentre y la especie de la que proviene el material seminal a congelar.

Es importante recalcar que la mini congeladora portátil CRYOGEN que se ha utilizado en esta investigación fue fabricada para la congelación de semen y embriones de varias especies de interés zootécnico y posee un programa de curvas de congelación dependiendo de la especie, realizado de esta manera un congelamiento lento que consta de 3 fases las mismas que son:

- Refrigeración (Llevando lentamente las pajuelas a 5°C)
- Estabilización o Equilibrio
- Congelación (Dejando las pajuelas congeladas en -120 °C)

Proceso que lleva un tiempo aproximado de 6 horas con un resultado final de pajuelas a una temperatura de -120°C, congeladas listas para ser trasladadas a un termo de nitrógeno y ambientadas lentamente en el vapor de nitrógeno hasta que lleguen a la temperatura del mismo (-196 °C).

#### 2.7.2.4. *Descongelamiento de las pajuelas*

Para la descongelación se realizó inmersión directa en agua a temperatura de 37°C durante 30 segundos, inmediatamente se retiró la pajuela del termo, se limpió con papel absorbente y cortó en un extremo de la misma, el contenido de la pajuela fue colocado en tu tubo Eppendorf previamente calentado a 37°C. Inmediatamente se colocó una gota de 5µl en un porta objetos previamente calentado en una platina térmica a la misma temperatura, de forma inmediata se colocó un porta objetos y realizó la evaluación correspondiente a las mediciones microscópicas.

## **2.7.3. Metodología de Evaluación**

### **2.7.3.1. Mediciones Macroscópicas**

#### **2.7.3.1.1. Volumen del eyaculado**

La determinación del volumen del eyaculado fue tomada de forma inmediata, mediante la observación directa de la graduación marcada en el tubo de colecta, para lo cual usamos un tubo de Eppendorf graduado en 2ml. Finalmente se consideró eyaculados normales aquellos que presentan un volumen  $\geq 0,5$  ml, como lo indican (Vera y Ricarte, 2016,p.4), en su guía para la evaluación de semen caprino.

#### **2.7.3.1.2. Color**

La determinación del color fue tomado de forma inmediata, mediante la observación directa del tubo de colecta.

#### **2.7.3.1.3. Olor**

La determinación del olor fue tomado de forma inmediata, mediante percepción directa del tubo de colecta.

#### **2.7.3.1.4. Aspecto**

La determinación del aspecto del eyaculado del macho cabrío fue tomada de forma inmediata, mediante la observación directa, colocando una gota de semen en un porta objetos y haciendo un pequeño barrido en el mismo.

#### **2.7.3.1.5. pH**

Esta medición se la realizó a través de la utilización de un peachimetro digital, al momento de la extracción del semen donde se colocó el peachimetro directamente en la muestra, esperando unos segundos para observar la valoración del pH.

### 2.7.3.2. *Mediciones Microscópicas*

#### 2.7.3.2.1. *Motilidad Masal*

Con la utilización de una micro pipeta, se descargó una gota de semen de 5 µl en un portaobjetos seco, limpio y temperado en una platina térmica a 37°C. Se cubrió la gota con un cubreobjetos, con el fin de lograr una capa uniforme evitando que la muestra se seque.

Observamos en el microscopio a un aumento de 100X examinándose varios campos, evaluando de una manera subjetiva el nivel de formación y progresión de ondas de masa espermática en movimiento a una escala de 0 a 100 %, como se detalla en la tabla (7-2).

**Tabla 7-2:** Calificación de movimiento en masa.

<b>Calificación en (%)</b>	<b>Movimiento en masa</b>	<b>Valoración en puntos</b>
Muy Buena (> 90)	Formación de ondas extremadamente altas.	5
Buena (70 - 90)	Las ondas o remolinos se forman rápidamente.	4
Regular (50 – 70)	Presencia de ondas o remolinos muy lentos.	3
Mala (20 - 50)	Presencia de espermatozoides móviles, pero en cantidad insuficiente como para formar ondas.	2
Muy Mala (20 – 1)	Algunos espermatozoides se mueven en su sitio	1
Insuficiente (0)	Ausencia de espermatozoides móviles	0

**Fuente:** (Vera y Ricarte, 2016, pp.5-6)

**Elaborado por:** Ramos Valeria, 2019

Para proceder al congelamiento de un eyaculado, se recomienda que su motilidad masal sea  $\geq 70\%$  (Cueto, et al, 2016,p.8).

#### 2.7.3.2.2. *Motilidad Individual*

Para realizar esta determinación colocamos en un tubo Eppendorf una gota de solución de citrato de sodio 2,92% (ver anexo de soluciones) previamente temperada a 37°C, inmediatamente vaciamos una gota de 5 µl de la muestra seminal y homogenizamos la misma.

Esta dilución se coloca entre porta y cubre objetos templado a 37° C sobre una platina térmica a la misma temperatura, la lectura se realizó en microscopio óptico a 400X.

Se evaluó la motilidad individual en una escala de 0 a 5 como se detalla en el cuadro (8-2).

Como criterio final, se consideraron normales aquellos eyaculados con motilidad individual progresiva  $\geq 70\%$  o de 3 en puntos, tanto en los eyaculados destinados para congelación seminal como en aquellos destinados a la obtención de plasma seminal como lo señalan (Vera y Ricarte, 2016.p.6)

**Tabla 8-2:** Escala para la evaluación microscópica de la motilidad individual progresiva aplicada para el semen caprino

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

Fuente: (Pineda, 2002; citado en Hernandez, 2014,p.9)

#### 2.7.3.2.3. *Determinación de células vivas y muertas*

Sobre un portaobjetos previamente calentado en una platina térmica a 37 °C, colocamos una gota de semen y una gota de solución de eosina-nigrosina (Ver anexo de soluciones) previamente calentada a 37°C para evitar el shock térmico, se mezcla durante 30 segundos. Luego de 1 minuto se realizó un frotis, observándolo al cabo de 2 min, sin cubreobjetos con aumento 100X.

Los espermatozoides muertos se tiñen de rosa ya que la membrana deteriorada en los muertos se hace permeable, mientras que los espermatozoides que se encontraron vivos en la tensión se visualizaron de color transparente. Posteriormente se realizó un barrido de la placa contando un total de 200 células para la estimación del % de vivos y muertos

#### 2.7.3.2.4. *Concentración espermática*

La concentración espermática se determinó mediante el uso de una cámara de Neubauer, misma que consiste en dos sub cámaras, una superior y otra inferior.

Para lo cual utilizamos una dilución 1:800, la cual se realizó colocando en un tubo de Eppendorf 5µl de muestra seminal en 4ml de solución fisiológica formolada al 1% (Ver anexos de soluciones) inmediatamente fue homogeneizada y colocada con una micropipeta en la cámara de Neubauer. Se dejó sedimentar por 10 minutos y se procedió a contabilizar los espermatozoides dentro de los campos definidos en las sub cámaras (cuadrantes), mediante el uso de un microscopio óptico a 40X. Los cuadrantes observados fueron los de las esquinas y el centro.

El número total de espermatozoides contados dentro de los 4 cuadrantes mencionados fue multiplicado por el factor de dilución y por una constante. Basándonos en la formulación de (Delgado, 2013,p.46)

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$CE= NEC \times NC \times FD \times Y$$

Donde:

CE: Concentración Espermática.

NEC: Número de Espermatozoides Contados

NC: Número de cuadrantes utilizados en el conteo (4)

FD: Factor de dilución (800)

Y: Constante (10000)

#### 2.7.3.2.5. *Morfología Espermática*

Al mismo tiempo de realizar la evaluación de células vivas y muertas se determinó la morfología espermática en %, en un total de 200 células encontrando espermatozoides: decapitados, cola en látigo, cola enrollada y macrocéfalo.



#### 2.7.3.2.6. *Anormalidades del espermatozoide*

Al mismo tiempo de realizar la evaluación de morfología espermática se determinó el porcentaje de anomalías de los espermatozoides encontrándose solo gotas citoplasmáticas en la muestra analizada.

#### 2.7.4. *Examinación del semen en el post descongelamiento*

Luego del descongelamiento se procedió a examinar la motilidad masal en %, la motilidad individual en pts., el porcentaje de células vivas y muertas, para lo cual se colocó una gota de semen en un portaobjeto templado a 37°C sobre platina térmica.

La motilidad individual progresiva se estimó como la velocidad de desplazamiento hacia adelante de los espermatozoides vivos en una escala subjetiva entre 0 y 5 (0, mínimo; 5, máximo). Subjetivamente podemos estimar esta escala según las siguientes apreciaciones: 0, los espermatozoides no se mueven. 1, los espermatozoides que se mueven en el lugar, giran sobre sí mismos; 2, los espermatozoides se trasladan brevemente, pero “se quedan”; 2.5, los espermatozoides se trasladan, puedo seguir su trayectoria con la vista; 3, los espermatozoides se trasladan, es difícil seguir su trayectoria con la vista; 4, los espermatozoides se trasladan a mucha velocidad, prácticamente no puedo seguir su trayectoria con la vista, “los veo pasar”; 5, los espermatozoides se trasladan a tanta velocidad que no puedo seguir su trayectoria con la vista, “no los veo pasar”.

Para realizar la calificación las placas estuvieron en la platina térmica a 37°C en un tiempo aproximado de 3 a 5 minutos antes de calificarlas asegurando de esta manera el descongelamiento completo de los espermatozoides.

Para motilidad masal se utilizaron los mismos criterios anteriormente descritos. Examinándose un total de 30 pajuelas, basándose en los criterios de (Cueto et al., 2016,p.16), para la examinación de semen en el post - descongelamiento.

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1. Evaluación de las características macroscópicas del semen del macho cabrío de la raza Saanen.

El análisis macroscópico del semen tiene por objeto la valoración de la cantidad y calidad del eyaculado del macho cabrío que provee la muestra, cabe mencionar que esta evaluación rutinaria no es predictor del potencial reproductivo, así mismo, la resistencia del material seminal a los procesos de crio-preservación (Tello, 1998, citado en Viteri e Hidalgo, 1992).

A continuación describimos las características macroscópicas correspondientes a 8 extracciones seminales provenientes de 1 macho cabrío de la raza Saanen de 4 años de edad, las mismas que posteriormente fueron procesadas y crio-conservadas.

##### 3.1.1. *Volumen del eyaculado, ml*

El volumen del eyaculado de las muestras seminales, obtenidas en las diferentes recolecciones, presentó un promedio de  $1,50 \pm 0,23$  ml, lo cual está dentro de los rangos normales de un reproductor de 4 años de edad, como se muestra en la (tabla 9-3).

**Tabla 9-3:** Evaluación macroscópica seminal de eyaculados del macho cabrío de la raza Saanen.

<b>Características</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
Numero de eyaculados	8	-
Volumen por eyaculado, ml	1,50	0,23
Color	Blanco cremoso	-
Olor	Proteico neutro	-
Aspecto	Viscoso	-
pH	6,2	0,001

**Fuente:** Análisis de Laboratorio Reproducción e Inseminación Artificial –FCP- ESPOCH (2018).

**DS:** Desviación estándar

**Realizado por:** Ramos, Valeria 2019.

El volumen del semen depende del método de recolección, la edad, estado fisiológico del macho cabrío, habilidad del recolector y la frecuencia de obtención de muestras seminales, por lo que el volumen obtenido en la presente investigación se encuentra dentro de los rangos normales (Cueto, et al, 2016)

Los resultados expuestos son similares con los reportes de (Niño, 2005), quien al evaluar la congelación y conservación del semen en la especie caprina mediante la utilización de ultracongeladores de -152 °C: tasa de fertilidad tras inseminación con semen congelado por diferentes protocolos de crio-conservación, reportó valores promedio de  $1,35 \pm 0,21$  ml, en muestras seminales frescas. Así como de (Nieto et al, 2012) quienes al evaluar la calidad espermática postcongelación de semen del macho cabrío Saanen en dos épocas del año reportaron mayor volumen de eyaculado de 2 ml colectado en el mes de diciembre; mientras que en abril solo se recolectó 1,2 ml. Además (Viteri e Hidalgo, 1992), en su investigación de congelación e inseminación del semen caprino utilizando dos diferentes tipos de diluyentes, registraron un valor promedio de 0,95 ml, entre valores de 1,06 a 0,84 ml respectivamente, investigación que fue realizada en la Estación Experimental Tunshi.

Los valores, se encuentran según (Vera y Ricarte, 2016), dentro del rango de la especie ya que en su guía para la evaluación del semen de caprinos, aporte de algunas metodologías para la evaluación de la calidad seminal de reproductores machos caprinos indican, que se consideran eyaculados normales aquellos que presentan un volumen mayor o igual a 0,5 ml, siendo de esta manera el caprino seleccionado apto para la donación del material genético.

### **3.1.2. Color**

La coloración que presentaron los eyaculados del macho cabrío de la raza Saanen, en las diferentes extracciones fue blanco cremoso (tabla 9-3), lo que se debe a la concentración espermática sin ningún tipo de contaminante.

Al respecto (Evans y Maxwell 1990; Arrebola 2012; citado en Rojas, 2014), manifiestan que el semen de macho cabrío es de color blanco grisáceo o amarillento, pudiendo variar de un eyaculado a otro, aún en el mismo semental, algunos machos lo producen de una coloración amarilla, que varía desde un producto espeso y cremosos a un fluido claro, dependiendo de la concentración de espermatozoides, sin embargo es necesario recalcar que el color del semen debe ser blanco-lechoso o cremoso pálido.

Con respecto a estos resultados (Baba, 2011), en su investigación sobre la patología de los espermatozoides en el macho cabrío, manifiesta que el color del semen es normalmente blancuzco, blanco lechoso o levemente amarillento.

(Viteri e Hidalgo, 1992), en su investigación de congelación e inseminación del semen caprino utilizando dos diferentes tipos de diluyentes reportaron una coloración blanca cremosa.

### **3.1.3. Olor**

En las muestras seminales analizadas se apreció un olor proteico neutro como se indica en la tabla (tabla 9-3), sin olores desagradables que podrían ser provocados por contaminación bacteriana debiendo tomar en cuenta que las muestras de semen recolectadas higiénicamente, de machos cabríos sanos y fértiles, tienen un débil olor sui géneris.

Con respecto a estos resultados (Baba, 2011), en su investigación sobre la patología de los espermatozoides en el macho cabrío, manifiesta que el olor es peculiar y variable en cada animal, en función de múltiples factores, determinando olores amoniacaes para muestras seminales recogidas en el verano y olor levemente amoniacal en muestras seminales recogidas en el invierno.

El olor de la presente investigación es similar al reportado por (Viteri e Hidalgo, 1992), quienes en su investigación de congelación e inseminación del semen caprino utilizando dos diferentes tipos de diluyentes reportaron que en las muestras evaluadas el olor fue proteico neutro característico en el semen de esta especie.

### **3.1.4. Aspecto**

La valoración macroscópica de la apariencia del semen caprino, evidencio un aspecto viscoso (tabla 9-3), sinónimo de un material rico en espermatozoides, por ende tienden a presentar condiciones de normalidad. Debiendo tomarse en cuenta que los eyaculados sin espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa y son de apariencia acuosa. Además, la consistencia del semen varía desde clara-acuosa hasta cremosa espesa, dependiendo de la relación de contenido entre sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal.

Con respecto a estos resultados (Baba, 2011), en su investigación sobre la patología de los espermatozoides en el macho cabrío, determina apariencias del semen coagulado para muestras seminales recogidas en el verano y levemente coagulado en muestras recogidas en el invierno.

### **3.1.5. *Potencial Hidrógeno (pH) del eyaculado***

La valoración del pH en el análisis macroscópico de las muestras seminales pertenecientes al macho cabrío de la raza Saanen reportó en las diferentes recolecciones, un promedio de  $6,2 \pm 0,001$ , como se muestra en la (tabla 9-3). Considerándose que el material genético recolectado (semen), posee un carácter muy cercanos a la neutralidad.

Según (Hafez, 2000) manifiesta que es necesario que el semen presente su carácter muy cercano a siete, ya que favorece a los espermatozoides cuando se encuentran en la vagina, donde el pH es ácido. Menos del 10% del volumen del semen de una eyaculación corresponde a los espermatozoides. Más del 90% del volumen del semen de una eyaculación corresponde al líquido seminal. El pH del semen caprino varía en un rango entre 6,7 y 6,8. Normalmente el pH debería ser ligeramente mayor en el segundo eyaculado.

Los valores promedios reportados en la presente investigación son inferiores a los reportes de (Tello, 1998, citado en Viteri e Hidalgo, 1992), que menciona que el valor promedio del potencial hidrogeno encontrado para el total de las muestras fue de 7,04.

De la misma manera (Baba, 2011), en su investigación sobre la patología de los espermatozoides en el macho cabrío, reportó un pH de 7,8 para muestras seminales recogidas en el verano y 6,8 en muestras seminales recogidas en el invierno.

El pH fue una de las variables del espermiograma que presentó una mayor estabilidad a lo largo del estudio.

## **3.2. *Evaluación de las características microscópicas del semen del macho cabrío de la raza Saanen antes de ser sometido a la dilución para su posterior crio-conservación.***

### **3.2.1. *Concentración espermática, Spz/ml***

La concentración espermática es una de las características microscópicas más importantes del semen ya que de ello depende la cantidad de dosis seminales que se puedan obtener de cada eyaculado, es así que el número de espermatozoides por ml de eyaculado, en esta investigación presentó un promedio de  $4216 \pm 559 \times 10^6$  Spz. /ml como se indica en la (tabla 10-3).

Siendo estos valores similares a los que reporta (Ureña, 2015), quien en sus investigaciones de inseminación artificial, recolección y conservación del semen de la especie caprina en la cual reporta valores medios de producción y calidad de semen, tanto en fotoperiodo ascendente como descendente, de dos razas caprinas españolas, Verata y Malagueña, explotadas a una latitud de 40° y 37° N, respectivamente, con los siguientes valores para concentración espermática de la raza caprina Malagueña en fotoperiodo ascendente  $4741 \times 10^6$  Spz./ml y  $4118 \times 10^6$  Spz./ml, para fotoperiodo descendentes.

Con respecto a estos resultados (Nieto et al, 2012), en su investigación calidad espermática postcongelación de semen del macho cabrío Saanen en dos épocas del año, determinan concentraciones espermáticas inferiores a los valores obtenidos en esta investigación teniendo la mayor concentración espermática en diciembre de  $3225,3 \times 10^6$  Spz. /ml y la menor concentración espermática  $2168 \times 10^6$  Spz. /ml para el mes de abril.

### **3.2.2. *Motilidad masal, %***

La valoración microscópica de la motilidad masal, en las diferentes observaciones realizadas, registraron un promedio de  $97,5 \pm 1,73$  % como se indica en la (tabla 10-3), lo cual está dentro de los rangos normales de un semen de calidad, ya que según (Cueto, et al, 2016), manifiestan que, para proceder al congelamiento de un eyaculado de semen de pequeños rumiantes, se recomienda que su motilidad masal sea  $\geq 70\%$ , aunque para la evaluación de este parámetro se necesita mucha experiencia ya que la apreciación de esta variable es subjetiva.

Los resultados expuestos en la presente investigación son similares a los registros de (Viteri e Hidalgo, 1992), quienes en su investigación de congelación e inseminación del semen caprino utilizando dos diferentes tipos de diluyentes, establecieron en la evaluación del semen fresco medias de motilidad masal de 27,33 % y valores que oscilan entre 29,87 % a 24,79 % sobre una calificación de 30 puntos que corresponden al 91,10 %, pero son superiores a los valores reportados por (Nieto et al, 2012), quienes al evaluar la Calidad Espermática Postcongelación de semen del macho cabrío Saanen en dos Épocas del año, presentan un promedio de 85% en el mes de diciembre y un 80% para el mes de abril, en muestras seminales frescas.

### **3.2.3. *Motilidad individual, pts.***

La motilidad individual es un indicativo de que los espermatozoides son viables, por ende es una de las principales pruebas que se realizan en las diferentes especies. Su valoración está basada en

la observación del movimiento individual de las células con el fin de determinar el porcentaje de células móviles en el eyaculado (Vale, 2011).

La motilidad individual observada microscópicamente, en la muestra seminal del macho cabrío de la raza Saneen, en la presente investigación reportó un promedio de  $4,75 \pm 0,05$  puntos como se muestra en la (tabla 10-3). Siendo lo resultados expuestos similares a los expresados por (Nieto et al, 2012), quienes al evaluar la calidad espermática postcongelación de semen del macho cabrío Saanen en dos épocas del año, presentan valores de 4 puntos, en la evaluación de extracciones seminales frescas.

Los valores obtenidos en la investigación son superiores a los registrados por (Ureña, 2015), en sus investigaciones de inseminación artificial, recolección y conservación del semen de la especie caprina en la cual reporta los valores medios de producción y calidad de semen, tanto en fotoperiodo ascendente como descendente, de dos razas caprinas españolas, Verata y Malagueña, explotadas a una latitud de 40° y 37° N, respectivamente, reportan valores para la motilidad individual de la raza caprina Verata de 3,7 pts., y 4,5 pts., en fotoperiodo ascendente y descendente respectivamente; y para la raza Malagueña valores de motilidad individual de 4,3pts., y 4,6 pts., en fotoperiodo ascendente y descendente respectivamente, de igual manera (Viteri e Hidalgo, 1992), en su investigación de congelación e inseminación del semen caprino utilizando dos diferentes tipos de diluyentes observaron en el análisis del semen fresco espermatozoides con movimientos vigorosos a los que denominaron espermatozoides con muy buena motilidad individual.

#### **3.2.4. *Determinación de células vivas y muertas, %***

La determinación del porcentaje de células vivas y muertas, en la presente investigación reporto valores del 99,5 % en el semen fresco del macho cabrío de la raza Saneen como se muestra en la (tabla 10-3), es decir que la muestra colectada presenta una calidad muy alta de células vivas a comparación de las células muertas debido a que solo se aprecia microscópicamente un 0,05 % de espermatozoides muertos. Para la determinación de las células muertas se contó 200 células, observándose de coloración rosada las células muertas y sin colorear las vivas, el porcentaje aceptado como normal no debe exceder el 25 % de células muertas es decir se presentará entre 75 - 100 % de células vivas.

Los resultados obtenidos son mayores a los indicados (Nieto et al, 2012), quienes al evaluar la calidad espermática postcongelación de semen del macho cabrío Saanen en dos épocas del año, presentan valores con un promedio del 85 % de viabilidad espermática en diciembre; y en abril

del 80 %, en la evaluación de extracciones seminales frescas, de machos de la raza Saanen de 3,5 y 4,5 años.

Al igual que (Farshad et al, 2009) quienes en su investigación el efecto de diferentes concentraciones de glicerol y DMSO sobre la viabilidad de los espermatozoides de cabra Markhoz durante diferentes etapas de temperaturas de congelación obtuvieron un promedio de 86,13 %, de viabilidad espermática en invierno, en machos de dos a cuatro años de edad.

Siendo a su vez superiores a los resultados de (Silvestre et al. 2004), quienes en su estudio del efecto del cambio de estímulo en la recolección intensiva de semen en machos cabríos jóvenes murcianos-granadinos obtuvieron 75 % de viabilización espermática en verano, en machos de raza murciana-granadina de tres años de edad.

### **3.2.5. *Morfología espermática, % y anomalías del espermatozoide, %***

La morfología espermática mide el porcentaje de células seminales que presentan características normales; es necesario que mayor sea el porcentaje para considerar un espermatozoide normal, en la presente investigación al analizar la muestra seminal en fresco, se reportaron promedios iguales a  $96,63 \pm 1,93\%$ , como se muestra en la (tabla 10-3), lo que señala que los espermatozoides en general son de estructura normal, sin embargo se determinaron espermatozoides con cola en látigo y cola enrollada.

Como anomalías del espermatozoide del 100 %, que representaron un total 200 células espermáticas contabilizadas, obtuvimos en el análisis seminal promedios del  $1,13 \pm 0,63\%$  de anomalías como se muestra en la (tabla 10-3), encontrándose espermatozoides macrocéfalos y con gota citoplasmática.

Estos valores son inferiores a los indicados por (Ureña, 2015), en sus investigaciones de inseminación artificial, recolección y conservación del semen de la especie caprina reporta valores medios de producción y calidad de semen, tanto en fotoperiodo ascendente como descendente, de dos razas caprinas españolas, Verata y Malagueña, explotadas a una latitud de  $40^\circ$  y  $37^\circ$  N, en los cuales registran un porcentaje de anomalías de 5,7 % y 4,3% en fotoperiodos ascendentes y descendentes respectivamente. Según (Hafez, 2000) manifiesta que el estado fisiológico y la edad del animal puede ser un factor determinante para que existan un cambio en la morfología espermática y se presenten anomalías en el espermatozoide.



**Tabla 10-3:** Evaluación microscópica seminal del eyaculado del macho cabrío de la raza Saneen, antes de ser sometido a la dilución para su posterior crio-conservación.

<b>Características</b>	<b>Promedio</b>	<b>DS</b>
Numero de eyaculados	1	-
Numero de observaciones	4	-
Concentración espermática, (1X10 <sup>6</sup> Spz/ml)	4216	559
Motilidad masal, %	97,5	1,73
Motilidad individual, pts.	4,75	0,05
Determinación de células vivas y muertas, %	99,5	0,00
Morfología espermática %	96,63	1,93
Anormalidades del espermatozoide %	1,13	0,63

**Fuente:** Análisis de Laboratorio Reproducción e Inseminación Artificial –FCP- ESPOCH (2018).

**DS:** Desviación estándar

**Realizado por:** Ramos, Valeria 2019.

### **3.3. Evaluación de las características seminales en la crio-conservación, frente a la utilización de tres diluyentes seminales.**

#### **3.3.1. Motilidad masal, %**

Al realizar la valoración de la motilidad masal al post descongelamiento de las dosis seminales con tres metodologías de dilución se determinaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos aplicados ( $P < 0,01$ ), como se muestra dentro de la (tabla12-3), con lo cual se pudo inferir que la utilización de diferentes diluyentes seminales influye sobre la calidad espermática concerniente a la motilidad masal.

En base a los datos establecidos dentro de la (tabla12-3) y el gráfico 1, se puede evidenciar que el grupo de dosis seminales pertenecientes al tratamiento D1T1L (Tris Yema +Glicerol) registraron los valores más altos en cuanto a la motilidad masal, en el post descongelamiento presentándose resultados en promedio iguales al 77%, respuesta seguida del tratamiento D2T2T (Dilutor Comercial 1 TRILADYL), donde al analizar las pajuelas se obtuvo un valor promedio de 76%.

A diferencia del grupo de dosis seminales correspondientes al tratamiento D3T3A (Dilutor Comercial 2 ANDROMED), que presentó los valores más bajos en la cuantificación del presente parámetro, obteniendo respuestas iguales al 43%, en el post descongelamiento lo cual pone de manifiesto que en la comparación de tres diluyentes en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino, la utilización de los diluyentes Tris Yema + Glicerol o Triladyl,

permiten la obtención de dosis seminales de mayor porcentaje de motilidad masal al post descongelamiento a diferencia del tercer tratamiento en investigación.

Los resultados obtenidos en la presente investigación son superiores a los registrados por (Hernández et al, 2017), quienes en su investigación evaluación de la integridad funcional y estructural de espermatozoides caprinos crio preservados mediante diluyentes comerciales, establecen una motilidad masal al post descongelamiento de 55,07% para el diluyente Lecitina de Soya; 52,03% para el diluyente Yema de Huevo y 36,97 % para la dilución LS (Bajo Glicerol), lo cual estaría relacionado con los componentes de cada diluyente empleado como medio de la conservación espermática y al método de extracción seminal.

De la misma manera los resultados obtenidos son superiores a los registrados por (Niño, 2005), al investigar la congelación y conservación del semen en la especie caprina mediante la utilización de ultracongeladores de -152 °C: tasa de fertilidad tras inseminación con semen congelado por diferentes protocolos de crio – conservación, registrando que con el protocolo de congelación utilizando nitrógeno líquido (NL) la motilidad masal el día 1 post-congelación se situó alrededor del 30 a 45%.

### **3.3.2. *Motilidad Individual, pts.***

Dentro del análisis de la valoración de la motilidad individual en el post descongelamiento de semen caprino, con diferente metodología de dilución, se determinaron diferencias altamente significativa a las medias de los tratamientos aplicados ( $P < 0,01$ ), por lo cual se puede señalar que la aplicación de diferentes dilutores en la crio-conservación seminal para la especie caprina, influye sobre la calidad la motilidad individual.

En base a los resultados obtenidos (tabla 12-3) en la valoración de las dosis seminales en estudio, se pudo evidenciar que el grupo de pajuelas pertenecientes al tratamiento D1T1L (Tris Yema +Glicerol) registró el valor más alto en cuanto a la motilidad individual, presentándose resultados en promedio iguales a 2,82 puntos dentro de la escala de referencia, seguido del tratamiento D2T2T (Dilutor Comercial 1 TRILADYL), con una valoración para la motilidad individual en puntos de 2,81, tras el post descongelamiento, a diferencia de las dosis seminales del tratamiento D3T3A (Dilutor Comercial 2 ANDROMED), que presentaron valores más bajos en la cuantificación de este parámetro con una valoración en puntos de 2,50 con lo cual se pudo inferir que la aplicación de los dilutores Tris Yema +Glicerol o Dilutor Comercial 1 TRILADYL, generan muestras de semen caprino de mayor calidad, como se aprecia en el (gráfico 2-3).

Los valores registrados en la presente investigación son superiores a los obtenidos por (Nieto et al, 2012), quienes en su investigación sobre la calidad espermática postcongelación de semen del macho cabrío Saanen en dos épocas del año, para lo cual registran una motilidad individual en el mes de abril del 20 %, misma que corresponde a 2 puntos y de 22 % en el mes de diciembre que corresponde a la misma puntuación.

Siendo a su vez similares a los resultados obtenidos por (Gibbons et al., 1992), en su investigación sobre la Inseminación Artificial (IA) con semen congelado en cabras de raza Angora, sobre los celos concentrados post incorporación del efecto macho, registrando valores de 74% para la motilidad individual, correspondiendo esta calificación a 4 puntos, para el mes de marzo en machos de raza Angora. Mientras que (Valencia et al, 1994), registra un rangos de 73 % a 78,6 % en motilidad individual valores que corresponden a 4 puntos obtenidos en la investigación; motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0,25ml y 0,5ml descongelado en 2 diferentes ritmos de temperatura.

### **3.3.3. *Determinación de células vivas y muertas, %***

En la cuantificación de las células vivas y muertas presentes dentro de las dosis seminales analizadas de cada uno de los tratamientos en estudio, no se registraron diferencias significativas entre las medias de los tratamientos aplicados ( $P > 0,05$ ) con lo cual se pudo inferir que los diluyentes utilizados en el proceso de crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino no influyeron sobre la calidad seminal referente a la cantidad de células espermáticas vivas a comparación de las células muertas.

Los resultados obtenidos en el análisis determinaron valores de 83%, de células espermáticas vivas en relación a las células muertas, para el tratamiento D1T1L (Tris Yema +Glicerol); 88% de células espermáticas vivas en relación a las células muertas en el tratamiento D2T2T (Dilutor Comercial 1 TRILADYL) y 84,50% para el tratamiento D3T3A (Dilutor Comercial 2 ANDROMED) de células espermáticas vivas en relación a las células muertas.

Respecto a los resultados obtenidos tras el post descongelamiento de las dosis seminales en la crio-conservación al emplear tres diluyentes, estos son menores a los resultados reportados por (Hernández et al, 2017), quienes al evaluar la integridad funcional y estructural de espermatozoides caprinos criopreservados mediante diluyentes comerciales, registraron valores promedios para la viabilidad espermática de  $99,91 \pm 0,06\%$ , en el diluyente Lecitina de soya;

99,5±0,21 %, para el diluyente Yema de huevo y 99,94±0,04 %, para LS(Bajo Glicerol), relacionando directamente estos valores a la composición de cada uno de los diluyentes usados en esta investigación.

Siendo a su vez mayores a los resultados registrados por (Hernández et al, 2014), quienes en su investigación efecto del método de extracción seminal sobre la vitalidad y motilidad espermática postdescongelación en machos cabríos de raza mestiza, registran promedios de viabilidad espermática de 66,87±4,11 % con el diluyente AndroMed®; 80,08±4,25 %, con el diluyente Triladyl®; y 66,83±11,64%, para el diluyente Ovicell®, tras la postdescongelación de semen caprino obtenido bajo la técnica de vagina artificial , en efecto de diluyentes comerciales.

### 3.4. *Correlación de las variables que mostraron significancia en el estudio.*

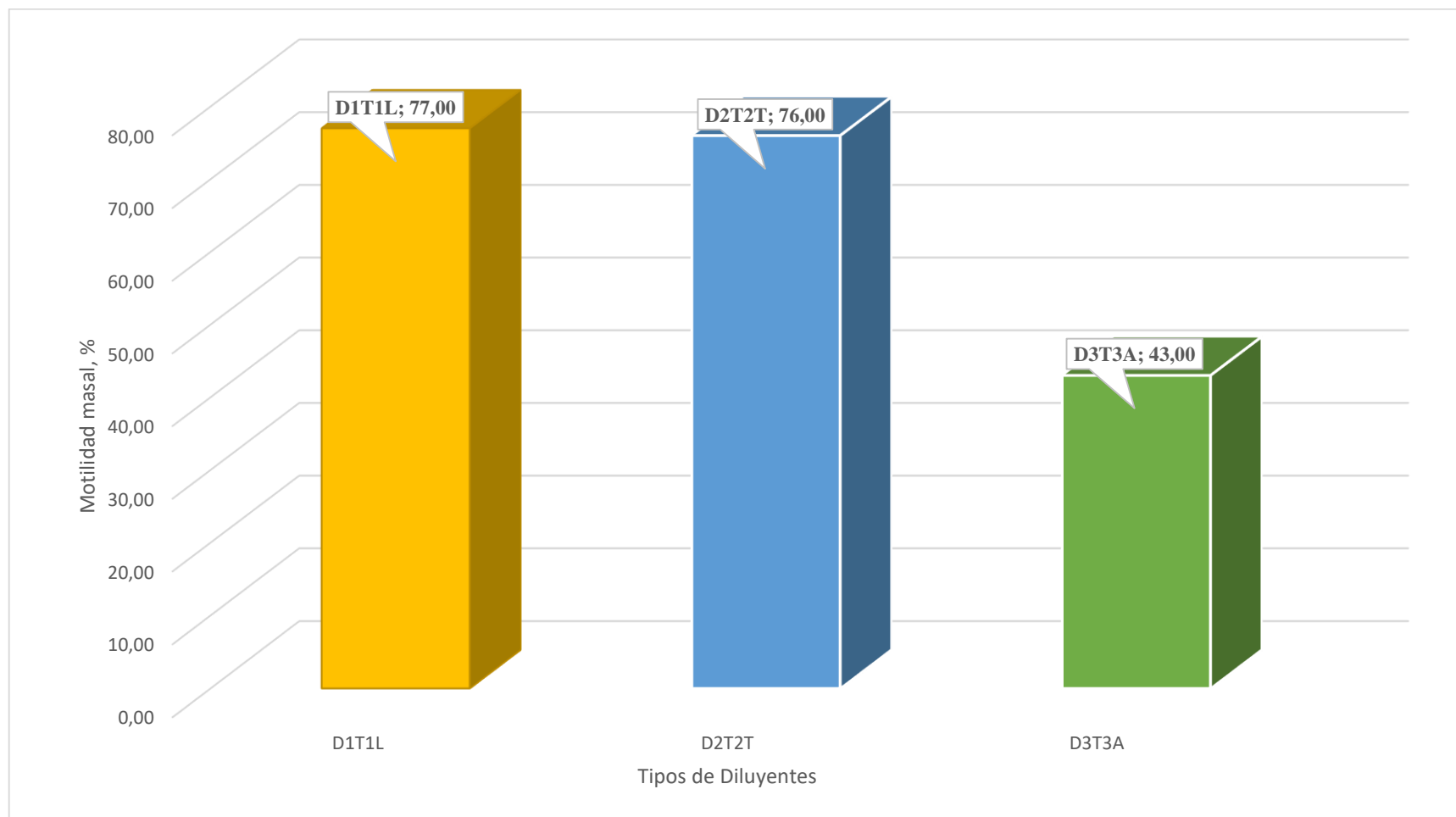
Las correlaciones obtenidas en las muestras seminales al post descongelamiento fueron: Mm, % = Motilidad masal, % x Mi, pts.= Motilidad individual, pts.; Mi, pts.= Motilidad individual, pts., x Mm, % = Motilidad masal, %, con valores de 0,719 en ambos casos, lo que quiere decir que cuando más alta sea la motilidad individual, más porcentaje tendrá la motilidad masal y viceversa. Como se indica en la (tabla 11-3).

**Tabla 11-3:** Coeficiente de correlación de Pearson, para las variables motilidad masal, %, y motilidad Individual, pts.

	<b>Mi, pts.</b>	<b>Mm,%</b>
<b>Mm,%</b>	0,719	-
<b>Mi, pts.</b>	-	0,719

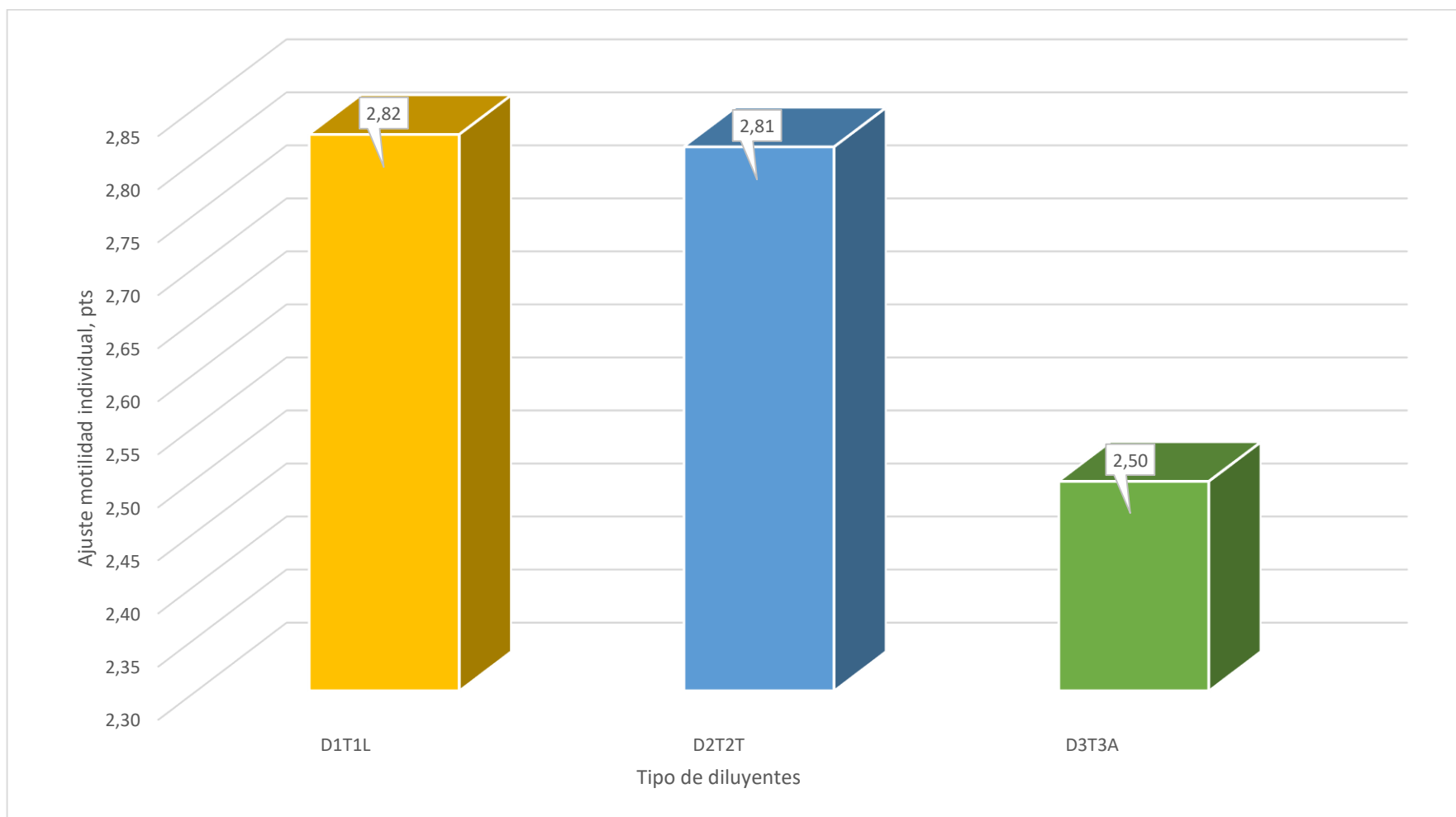
Mm, %: Motilidad masal, %; Mi, pts.: Motilidad individual, pts.

**Realizado por:** Ramos, Valeria 2019.



**Gráfico 1-3. Motilidad masal (%), en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.**

**Realizado por:** Ramos, Valeria 2019.



**Gráfico 2-3. Motilidad individual (pts.), en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.**

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

**Tabla 12-3:** Evaluación de las características microscópicas del semen caprino en la estación experimental Tunshi, sometido a tres dilutores en la criopreservación y viabilidad espermática.

Variable	Tipos de diluyentes seminales						E.E	Prob.	Sig.
	D1T1L= Tris Yema +Glicerol	D2T2T= Dilutor Comercial 1 (TRILADYL)	D3T3A= Dilutor Comercial 2 (ANDROMED)						
Motilidad masal, %	77,00	a	76,00	a	43,00	b	2,20	<0,0001	**
Motilidad individual, pts.	2,82	a	2,81	a	2,50	b	0,07	0,0055	**
Determinación de células vivas, %	83,00	a	88,00	a	84,50	a	2,50	0,3628	ns

E.E.: Error Estándar.

Prob. >0,05: no existen diferencias estadísticas (ns)

Prob. <0,05: existen diferencias estadísticas significativas (\*)

Prob. < 0,01: existen diferencias altamente significativas (\*\*)

Medias con letras iguales en una misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan a la P<0,05 y P<0.01.

**Realizado por:** Ramos, Valeria 2019.

**Tabla 13-3:** Evaluación seminal del eyaculado del macho cabrío de la raza Saneen, al ser sometidos a los tres dilutores previo a la crio-conservación.

Variables	Tratamientos		
	D1T1L	D2T2T	D3T3A
Motilidad masal (%)	98	90	85
Motilidad individual (pts.)	5	4	4
Determinación de células vivas y muertas (%)	99,5	99,5	99,5
Concentración espermática (unidad con $1 \times 10^6$ Spz. /0.5 ml)	$100 \times 10^6$	$100 \times 10^6$	$100 \times 10^6$
Morfología espermática (%)	97,5	98,5	98
Anormalidades del espermatozoide (%)	1	0,5	3
pH de las diluciones	6,8	6,7	6,7

**Fuente:** Análisis de Laboratorio Reproducción e Inseminación Artificial –FCP- ESPOCH (2018).

**Realizado por:** Ramos, Valeria 2019.



### 3.5. *Evaluación Económica*

Como se ilustra dentro de la (tabla 14-3) al realizar la evaluación económica, se consideró los egresos alcanzados para lo cual se determinó un costo de producción en los tres tratamientos de 1,36 USD, por dosis seminal.

**Tabla 14-3:** Análisis económico de la evaluación del semen caprino en la estación experimental Tunshi, sometido a tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática.

Concepto	Tipos de diluyentes seminales		
	D1T1L= Tris Yema +Glicerol	D2T2T= (TRILADYL)	D3T3A= (ANDROMED)
<b>Egresos</b>			
Numero pajuelas	10	10	10
Costo por pajuela	0,23	0,25	0,25
Costo diluyente	2,28	2,49	2,49
Material de recolección	39,81	39,81	39,81
Sanidad	2,00	2,00	2,00
Servicios básico	4,00	4,00	4,00
Mano de obra	30,00	30,00	30,00
Exámenes laboratorio	10,00	10,00	10,00
Transporte	22,00	22,00	22,00
<b>Total Egresos</b>	<b>110,09</b>	<b>110,30</b>	<b>110,30</b>
<b>Ingresos</b>			
Cotización de pajuela caprina	15	15	15
Numero de pajuelas viables	10	10	10
Venta de pajuelas	150	150	150
<b>Total Ingresos</b>	<b>150</b>	<b>150</b>	<b>150</b>
<b>C/P</b>	<b>1,36</b>	<b>1,36</b>	<b>1,36</b>

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

## CONCLUSIONES

- El análisis macroscópico y microscópico de las diluciones espermáticas registró una motilidad masal de 98%, e individual de 5 pts., para la dilución Tris Yema+Glicerol, a comparación de una motilidad masal de 90% en la dilución Dilutor Comercial 1 Triladyl, y 85% en el diluyente Dilutor Comercial 2 ANDROMED, motilidades individuales de 4 pts., en los dos últimos dilutores; viabilidades espermáticas 99,5%, buena morfología espermática y anormalidades del 1, 0,5 y 3 %, pH de 6,8 y 6,7 determinando que los tres diluyentes antes del proceso de crío-conservación muestran características óptimas para la supervivencia espermática, obteniendo 30 dosis seminales de 0,5 ml con una concentración de  $100 \times 10^6$  Spz./dosis.
- En cuanto a las características microscópicas al post descongelamiento se obtuvo motilidad masal (77%), motilidad individual (2,82 pts.) y viabilidad espermática de (83%) al utilizar el tratamiento Tris Yema +Glicerol, sin embargo el tratamiento Dilutor Comercial 1 Triladyl registro los siguientes resultados, motilidad masal (76%), motilidad individual (2,81pts.) y viabilidad espermática de (88%), existiendo entre los dos tratamientos solo diferencias numéricas.
- El costo de producción para los tres tratamientos fue de 1,36 USD, por cada dosis seminal.

## RECOMENDACIONES

- Utilizar los diluyentes Tris Yema +Glicerol o Dilutor Comercial 1 Triladyl, para la crío conservación y viabilidad espermática de semen caprino, ya que presentaron resultados satisfactorios en la calidad de las dosis seminales al post-descongelamiento.
- Realizar el análisis pos descongelamiento de las dosis seminales con los mejores tratamientos en diferentes tiempos 1, 15 y 30 días con el objetivo de asegurar la viabilidad espermática a largo plazo.
- Incluir las dosis seminales de los mejores tratamientos en programas de Inseminación artificial con el fin de determinar la viabilidad de las mismas en la preñez de hembras caprinas.
- Socializar la información obtenida en la presente investigación en centros de procesamiento seminal, entidades educativas, caprinocultores a fin de incentivar a la elaboración de dosis seminales y la comprobación de su uso, ya que la inseminación artificial en la especie caprina en nuestro país ha sido una técnica que todavía no es difundida.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aréchiga, C., Aguilera, J., Rincón, R., Méndez De Lara, S., Bañuelos, V., y Meza, C. (2008). Situación Actual y Perspectivas de la Producción Caprina Ante el Reto de la Globalización. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Volumen (9), pp-pp,1–14.  
[09 de agosto del 2018].  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911227001>
- Baba, E. (2011). Patología de los Espermatozoides en Macho Cabrío. *Revista Veterinaria Argentina*, volumen (18), pp-pp, 1–5.  
[15 de enero del 2019].  
[http://www.produccion\\_animal.com.ar/produccion\\_caprina/inseminacion\\_transferencia\\_caprina/36-Patologia\\_Espermatozoides.pdf](http://www.produccion_animal.com.ar/produccion_caprina/inseminacion_transferencia_caprina/36-Patologia_Espermatozoides.pdf)
- Barbas, J. P., y Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, volumen (10), pp-pp,1– 62.  
Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Cortes, S. (2002). Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino.(Tesis de Doctorado), Universidad Complutense de Madrid,Facultad de Ciencias Biologicas,pp.1-202  
[09 de agosto del 2018].  
Recuperado de: <https://biblioteca.ucm.es/tesis/19972000/X/3/X3050301.pdf>
- Cueto, M., Gibbons, A., Galarraga, B., Macarena, M., y Fernández, J. (2016). Manual de obtencion, procesamiento y conservacion del semen ovino,INTA,volumen 2, pp-pp1-17.  
[15 de septiembre del 2018].  
[https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual\\_de\\_semen\\_ovino\\_2da\\_edicion.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf)
- De la Vega, A. (2014). Asociación Ingenieros Zootecnistas De Argentina Procesamiento de Semen Caprino Para Inseminación Artificial(AIZA). *Revista TAURUS* , volumen (6) , pp-pp,1-8.  
[09 de agosto del 2018].  
Recuperado de:<http://www.ovinos-caprinos.com/INSEMINACION/82> - Procesamiento del semen Caprino para Ins. Art. una revision.pdf.

Delgado, B. (2013). Evaluación Espermática de Semen de Ovino Tratado por la Técnica de Gradiente de Densidad.(Tesis), Universidad RICARDO PALMA. Facultad De Ciencias Biológicas, Escuela Académico Profesional de Biología. Lima -Perú, pp-pp,1-118, [12 de agosto del 2018].

Recuperado de: [http://cybertesis.urp.edu.pe/bitstream/urp/589/1/delgado\\_be.pdf](http://cybertesis.urp.edu.pe/bitstream/urp/589/1/delgado_be.pdf)

Dorado, F., Rodriguez, I., Hidalgo, M. (2007). Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two freezing extender base on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. *Theriogenology* 68,pp, 168-177

EL UNIVERSO. (2010). Caprinocultura puede ser una actividad rentable en el país, Pichincha-Yaruquí, EL UNIVERSO.

<https://www.eluniverso.com/2010/06/12/1/1416/caprinocultura-puede-ser-actividad-rentable-pais.html>

Farshad, A., B., khalili, P. Fazeli. (2009). The effect of different concentrations of glycerol and domosoon viability of Markhoz goat spermatozoa during different freezing temperatures steps, *Revista Pakistan J. Biol. Sci*, volumen 12, pp-pp 239-245. [12 de enero del 2019].

Recuperado de: <https://scialert.net/abstract/?doi=pjbs.2009.239.245>

Gibbons, A., Cueto, M., y Wolff, M. (2004). Inseminacion Artificial en la Especie Caprina. *Revista INTA*, volumen (1), pp-pp. 1-17.

[12 de agosto del 2018].

Recuperado de: <http://inta.gob.ar/documentos/inseminacion-artificial-en-la-especie-caprina/>

Gibbons, A., M., Cueto, P.Willems (1992). Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza Angora, sobre los celos concentrados post incorporación del efecto macho. *Revista INTA (Med. Vet.)*, volumen (3), pp-pp 122-128.

[12 de enero del 2019]

Recuperado de: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/pa\\_307\\_inseminacion\\_artificial.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/pa_307_inseminacion_artificial.pdf)

Hafez, B. (2003). *Reproduction in farm animals, USA*, LEA & FEBIGER. 8th edition

[12 de agosto del 2018].

Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119265306.ch2>

Hafez, E. (2000). Blackwell Scientific Publications. *Reproduction in farm animals*. 4th edition. Philadelphia, U S A: Lea & Febiger. 22, p. 512.

- Hernandez, L. (2014). Evaluación de La Motilidad Espermática de Semen Caprino Criopreservado Bajo Diferentes Medios Diluyentes a través del Sistema Casa. (Tesis), UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD, Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente, Especialización en Mejoramiento Genético, Cucutá - Colombia, pp-pp, 1-56,  
[09 de agosto del 2018].  
<https://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/2518/1/88223283.pdf>
- Hernández, L., Dorado, J. Hidalgo, M., Rubio, J. y Quintero, A. (2014). Efecto del método de extracción seminal sobre la vitalidad y motilidad espermática postdescongelación en machos cabríos de raza mestiza, Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan, volumen (4), pp-pp, 875-885.  
[20 de enero del 2019].  
<http://132.248.9.34/hevila/RevistabiologicoagropecuariaTuxpan/2014/no4/20.pdf>
- Hernández, L., quintero, A., Camargo, O., y Rojas, M. (2017). Evaluación de la Integridad Funcional y Estructural de Espermatozoides Caprinos Criopreservados Mediante Diluyentes Comerciales, Revista Científica. FCV- LUZ, volumen (26), pp -pp 35-43.  
[15 de enero del 2019].  
[https://www.researchgate.net/publication/293820354\\_EVALUACION\\_DE\\_LA\\_CALIDAD\\_ESPERMATICA\\_MEDIANTE\\_CITOMETRIA\\_DE\\_FLUJO\\_EN\\_SEMEN\\_CAPRINO\\_CRIOPRESERVADO\\_CON\\_DOS\\_DILUYENTES](https://www.researchgate.net/publication/293820354_EVALUACION_DE_LA_CALIDAD_ESPERMATICA_MEDIANTE_CITOMETRIA_DE_FLUJO_EN_SEMEN_CAPRINO_CRIOPRESERVADO_CON_DOS_DILUYENTES)
- MAGAP. (2016). MAGAP presenta Proyecto Nacional del Manejo y Comercialización de Ovinos. Manabí - Ecuador, MAGAP. Recuperado de:  
<https://www.agricultura.gob.ec/magap-presenta-proyecto-nacional-del-manejo-y-comercializacion-de-ovinos-caprinos-y-camelidos/>
- Nieto, M., Zarate, F., Lopez, R., Elizondo, R. (2012). Calidad Espermática Postcongelación de Semen del Macho Cabrío Saanen en dos épocas del Año, Revista Agraria (Revista de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro), volumen (9), pp-pp, 57-62.  
[30 de enero del 2019].  
[http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/category/58/Revista\\_Agraria\\_Vol\(9\)\\_No\(2\).pdf#page=19](http://www.uaaan.mx/agraria/attachments/category/58/Revista_Agraria_Vol(9)_No(2).pdf#page=19)

- Niño, T. (2005). Congelación y Conservación del Semen en la Especie Caprina Mediante la Utilización de Ultra congeladores de -152 °C: Tasa De Fertilidad Tras Inseminación con Semen Congelado por Diferentes Protocolos de Crio-conservación, Revista Vectorplus, volumen (1), pp-pp, 1-8.  
[15 de enero del 2019].  
[https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/6639/2/0231633\\_00031\\_0004.pdf](https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/6639/2/0231633_00031_0004.pdf)
- Perulactea. (2012). Proyecto de Producción de Leche Caprina en el Ecuador. Mira- Carchi, Agencias Perulactea. Recuperado de: <http://www.perulactea.com/2012/08/20/proyecto-de-produccion-de-leche-caprina-paga-1-dolar-el-litro-en-ecuador/>
- Portillo, M., Madero, L., López, J., León, C., Acosta, M., Gomez, L., ... Guerrero, M. (2006). FUNDAMENTOS DE CRIOPRESERVACIÓN. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología, Volumen (57),pp-pp, 291–300.  
[20 de julio del 2018].  
Recuperado de <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000869->
- Rigau, T., Farré, M., Ballester, J., Mogas, T., Peña, A., Rodríguez-Gil, J. (2001). Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates, USA. PudMed.gob Theriogenology.  
Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11665883>
- Rojas, A. (2014). Optimización del Protocolo de Crioconservación de Semen Caprino de la Raza Autóctona en Peligro de extinción Blanca De Rasquera. (Tesis Doctoral). Universida Autònoma de Barcelona, Facultad de Veterinària, Departamento de Medicina y Cirugia Animal, Barcelona -España.  
[20 de julio del 2018]  
<https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/285040/atr1de1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Rodríguez, I., y Martínez, H. (2003). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia. *Reprod Dom Anim* 38, pp.: 312–318.
- Silvestre, M.A., I., Salvador, J.P., Sanchez, E.A. Gomez. (2004). Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young Murciano-Granadina male gotas, *Revista J. Anim. Sci*, volumen (82), pp-pp 1641-1645.  
[20 de enero del 2019]



- <https://pdfs.semanticscholar.org/43b3/2045daad57b00243b15d438171aceb830494.pdf>
- Taípe, V. (2017). La Producción Caprina en el Ecuador, Latino América y Mundial. Manabí - Ecuador, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/veronicataipe904/produccion-caprina-en-el-ecuador>.
- Ureña, F. (2015). INSEMINACIÓN ARTIFICIAL: RECOLECCIÓN Y CONSERVACIÓN DEL SEMEN EN LA ESPECIE CAPRINA. Córdoba –España, Universidad de Córdoba. Recuperado de: <http://www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=120>
- Vargas, J., Martínez, L., Delgado, J., y Rodríguez, G. (2016). BIODIVERSIDAD CAPRINA IBEROAMERICANA, Bogotá, Editorial Ediciones Universidad Cooperativa de Colombia, <zpp-pp,1-244.  
[20 de julio del 2018].  
Recuperado de: <https://doi.org/10.16925/9789587600674>
- Vale, W. (2011). Avances biotecnológicos en reproducción de búfalos. En: Tecnología en Marcha, Revista Especial, volumen (24), N° 5, pp, 89-104. [15/09/2018]. Recuperado de: [http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/168](http://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/168)
- Valencia, J., G., Gonzalez, M., Gonzalez, A., Trejo. (1994). Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 ml y 0.5 ml y descongelado de 2 diferentes ritmos de temperatura. Revista Vet. Mex, volumen (2), pp -pp. 127- 131.  
Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/vetmex/vm-1994/vm942e.pdf>
- Vera, T., y Ricarte, A. (2016). Guía para la evaluación del semen de Caprinos. Revista INT, volumen (1), pp.1-1,(Instituto Centro Regional Catamarca – La Rioja Estación Experimental Agropecuaria )  
Recuperado de: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2143.9125>
- Vilanova, L., y Gatica, R. (2002). ¿ Puede el Análisis Seminal predecir Realmente la Fertilidad Potencial en Toros ?, Revista Científica, FCV-LUZ, volumen (12), pp, 202–208.  
[15 de septiembre del 2018].  
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/27627/articulo8.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Viteri e Hidalgo (1992). CONGELACIÓN E INSEMINACIÓN DEL SEMEN CAPRINO UTILIZANDO DOS DIFERENTES TIPOS DE DILUYENTES.(Tesis ), Escuela Superior

Politecnica de Chimborazo, Facultad de Ciwncias Pecuarias , Escuela de Zootecnia.,  
Riobamba Ecuador.

## **ANEXO 1. SOLUCIONES PARA EL ANALISIS MICRISCOPICO DEL SEMEN CAPRINO**

### **Preparación de la solución de citrato de sodio 2,92%**

La solución de citrato de sodio se prepara el día anterior a ser utilizado y se descarta el sobrante transcurrido 30 días de su constitución. La misma se realiza como se detalla a continuación: se pesa 2,92 g de citrato de sodio mezclándose con agua destilada 100 ml. (bi o tri destilada). Una vez homogeneizada la solución, se filtra utilizando un papel filtro en un recipiente esterilizado donde permanece en este recipiente en heladera a 4° C hasta su utilización.

Componentes de la solución de citrato de sodio 2,92%

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Citrato de Sodio	2,92 g
Agua destilada (Bi o tri destilada)	100 ml

**Fuente:** (Vera y Ricarte, 2016)

### **Preparación de la coloración supravital**

Para la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se utiliza la coloración supravital de eosina-nigrosina (10%) descrita por Watson (1990): Se disuelve 2,94 g de Citrato de Sodio, 1 g de eosina y 10 g de nigrosina en 100 ml de Agua destilada (Bi o tri destilada), en agitador mecánico a 30° C, se ajusta el pH a 6,75 con solución concentrada de ácido cítrico. Se deja reposar a 4° C por 24 h, se entibia a 20° C, se mide y corrige nuevamente el pH si es necesario. Se deja reposar en refrigeración hasta que tome temperatura de 4° C y se filtra utilizando papel de filtro apropiado. Se debe conservar en refrigeración, convenientemente envasado en envases chicos y de vidrio opaco.

Componentes de la coloración supravital de eosina-nigrosina (2%)

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (g)</b>
Citrato de Sodio	2,94 g
Nigrosina	2 g
Eosina	1 g
Agua destilada (Bi o tri destilada)	100 ml

**Fuente:** (Vera y Ricarte, 2016)

### **Solución Fisiológica Formolada 1%**

La preparación de la solución de dilución para el conteo de espermatozoides se logra mezclando 10 ml de solución de formol al 38% en 1000 ml de Solución fisiológica de ClNa 0,9%.

La misma permanece en envase de vidrio a temperatura ambiente hasta su uso.

#### Componentes de la solución Formolada 1%

<b>Componente</b>	<b>Cantidad (ml)</b>
Solución de Formol al 38%	1
Solución fisiológica de Cl Na 0,9%.	1000

**Fuente:** (Vera y Ricarte, 2016)

**Anexo 2.** Motilidad masal %, en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.

### 1. Resultados Experimentales

Tratamientos	Repeticiones										Suma
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
D1T1L	80,00	80,00	75,00	80,00	70,00	80	80	65	80	80	385,00
D2T2T	80,00	70,00	80,00	70,00	65,00	85	70	85	75	80	365,00
D3T3A	30,00	50,00	30,00	50,00	45,00	55	40	45	40	45	205,00

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

### ADEVA

F. Var	gl	S. C.	C. Medio	Fisher	
				Cal	Prob.
Total	29	8796,67			
Tratamiento	2	7486,67	3743,33	77,15	<0,0001
Error	27	1310,00	48,52		
CV %			10,66		
Media			63,67		

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

### Separación de medias según Duncan $P < 0,5$

Tratamientos	Media	E. E	Duncan
D1T1L	77,00	2.20	a
D2T2T	76,00	2.20	a
D3T3A	43,00	2.20	b

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

**Anexo 3.** Motilidad individual pts., en la comparación de tres dilutores en la crio-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.

## 2. Resultados Experimentales

Tratamientos	Repeticiones									
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
D1T1L	3,00	2,73	2,73	3,00	2,73	2,73	2,73	2,58	3,00	3,00
D2T2T	2,73	2,73	3,00	2,73	2,73	3,00	2,73	2,73	3,00	2,73
D3T3A	2,00	2,58	2,00	2,73	2,41	3,00	2,41	3,00	2,41	2,41

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

## ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	
				Cal	Prob.
Total	29	2,16			
Tratamiento	2	0,69	0,34	6,35	0,0055
Error	27	1,47	0,05		
CV %			8,62		
Media			2,66		

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

## Separación de medias según Duncan $P < 0,5$

Tratamientos	Media	E. E	Duncan
D1T1L	2,82	0,07	a
D2T2T	2,81	0,07	a
D3T3A	2,50	0,07	b

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

**Anexo 4.** Determinación de células vivas y muertas %, en la comparación de tres dilutores en la crío-conservación y viabilidad espermática de semen caprino en la Estación Experimental Tunshi.

### 3. Resultados Experimentales

Tratamientos	Repeticiones										Suma
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
D1T1L	80,00	70,00	70,00	90,00	95,00	70	90	80	90	95	405,00
D2T2T	90,00	90,00	95,00	80,00	90,00	95	85	90	80	85	445,00
D3T3A	95,00	80,00	85,00	90,00	80,00	90	80	90	70	85	430,00

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

### ADEVA

F. Var	gl	S. Cuad	C. Medio	Fisher	
				Cal	Prob.
Total	29	1824,17			
Tratamiento	2	131,67	65,83	1,05	0,3637
Error	27	1692,50	62,69		
CV %			9,30		
Media			85,33		

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.

### Separación de medias según Duncan P<0,5

Tratamientos	Media	E. E	Duncan
D1T1L	83,00	2.50	a
D2T2T	88,00	2.50	a
D3T3A	84,50	2.50	a

Realizado por: Ramos, Valeria 2019.