



Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología

Dirección:
Av. Sucre (Villa Esperanza) s/n
Tel: (591-2) 2844177
Fax: (591-2) 2845800
Sitio Web: www.upea.edu.bo



Universidad Pública de El Alto

VICERRECTORADO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA



DICYT - UPEA
Dirección de Investigación, Ciencia y Tecnología

CARRERA INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL

**“INVESTIGACIÓN DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO POR
VAPORIZACIÓN CONTROLADA DE NITRÓGENO EN
COLLPAJAWA - LAJA”**

El Alto - Bolivia
2021

**PROYECTO FINANCIADO CON RECURSOS DEL IMPUESTO DIRECTO A LOS
HIDROCARBUROS (IDH)**



**UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO
VICERRECTORADO
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL
CARRERA INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA**

**“INVESTIGACIÓN DE CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO
POR VAPORIZACIÓN CONTROLADA DE NITRÓGENO EN
COLLPAJAWA – LAJA”**

**PROYECTO FINANCIADO CON RECURSOS DEL IMPUESTO
DIRECTO A LOS HIDROCARBUROS (IDH)**

**EL ALTO – BOLIVIA
2021**

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO

AUTORIDADES

Dr. Carlos Condori Titirico
RECTOR

Dr. Efrain Chambi Vargas Ph.D
VICERRECTOR

Dr. Antonio López Andrade Ph. D.
DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Ing. Laoreano Coronel Quispe
DECANO DE ÁREA
CIENCIAS AGRICOLAS, PECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

M. Sc. Marcelo Paxi Sillo
DIRECTOR DE CARRERA
INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA

Ing. Agr. Edwin Carita Tarqui
COORDINADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL
INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN
Ing. Guillermo Marca Marca
Univ. Viedma A. Mamani Quispe

COMITÉ DE REVISIÓN TÉCNICA ESPECIALIZADA

Ing. Rubén Vera Tola
Ph.D. Ing. Flavio Merlo Maydana
Lic. MVZ. Willy Antonio Villavicencio Yana

COMITÉ DE REVISIÓN ESTILO Y FORMA

Ing. Leddy Teresa Gutiérrez Huallpa
Lic. Lillet Jovana Huanca Ortuño

CONVENIO INTERINSTITUCIONAL
UNIVERSIDAD PÚBLICA DE EL ALTO – MUNICIPIO DE LAJA

DERECHOS RESERVADOS: Universidad Pública de El Alto
DEPOSITO LEGAL: 4-1-398-2021

EDITORIAL: INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA ANIMAL – INGENIERÍA EN ZOOTECNIA E INDUSTRIA PECUARIA

IMPRENTA:

Dirección UPEA: Av. Sucre s/n Zona Villa Esperanza
Telefono:2840040
Web: <http://www.upea.bo/>

Diciembre 2021
El Alto – Bolivia

PRESENTACIÓN

La producción de ovinos es una actividad que involucra a un gran número de familias en la región del altiplano boliviano, donde la crianza de esa especie es completamente tradicional en todas sus bases productivas, situación que amerita mejorar las condiciones técnicas y tecnológicas de su crianza.

El presente trabajo de investigación nace ante la ausencia y carencia de tecnologías orientados a la producción y reproducción de ovinos, donde la etapa reproductiva se lleva a cabo de manera rutinaria y tradicional, asimismo, el manejo técnico no está de la mano del ganadero de ovinos. El proceso de capacitación y asistencia técnica para mejorar esta especie está completamente ausente, es decir, no existe apoyo técnico de parte del Gobierno central, ni departamental y mucho menos de los gobiernos locales.

Investigaciones orientadas a la producción y mejoramiento de ovinos en nuestro medio es escasa, razón por la cual el presente trabajo de investigación pretende apoyar con criterios técnicos en lo referente a la reproducción mediante inseminación artificial por medio de técnica de la criopreservación que es un método reproductivo poco desarrollado de manera general, por el bajo nivel de eficacia, en nuestro medio, esta técnica es casi de nula la aplicación para el mejoramiento genético en la crianza de ovinos, por lo que es necesario desarrollar trabajos de investigación referente al tema, que podría fomentar la crianza de esta especie y también ayudar a mejorar los rebaños de las familias dedicadas a esta actividad.

La carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria de la Universidad Pública de El Alto, siempre estará generando técnicas, tecnologías e innovaciones para apoyar el desarrollo productivo de las diferentes especies domésticas, propias de nuestro altiplano.

*Ing. Edwin Carita Tarqui
Coordinador del Instituto de Investigación en Ciencia Animal
Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria*

CONTENIDO

PRESENTACIÓN	5
ÍNDICE DE CUADROS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1 Introducción	17
1.2 Identificación del problema	17
1.3 Objetivos de la investigación	18
1.3.1 Objetivo general	18
1.3.2 Objetivos específicos	18
1.4 Hipótesis de la investigación	18
1.4.1 Hipótesis nula	18
1.4.2 Hipótesis alterna	18
1.5 Justificación	19
2. MARCO TEÓRICO	21
2.1 La inseminación artificial con semen congelado	21
2.2. Congelación del semen ovino	22
2.3. Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de crioconservación	22
2.3.1. Alteraciones de los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación	23
2.3.2. Procesamiento y congelación del semen ovino para inseminación artificial	23
2.3.3. Diluyentes para congelar semen de ovino	24
2.3.4. Sustrato Energético	24
2.3.5. Agentes Proteínicos	24
2.3.6. Agentes tamponadores o reguladores de pH	25
2.3.7. Agentes Crioprotectores	25
2.3.8. Aditivos empleados en los diluyentes ovinos	25
2.3.9. Descongelación del semen ovino crioconservado	26
2.3.10. Valoración del esperma congelado-descongelado	26
2.3.11. Motilidad y viabilidad	26
2.3.12. Integridad de las membranas plasmática y acrosomal	26
3. Materiales y Metodos	29
3.1. Localización	29
3.2. Características del Ecosistema	29
3.2.1. Características flora de la zona	29
3.2.2. Suelos	29
3.2.3. Cuencas Hidrográficas	29
3.2.4. Clima	30
3.2.5. Precipitación pluvial y vegetación	30
3.3. MATERIALES	30
3.3.1. Material Biológico	30
3.3.2. Material de Campo	30
3.3.3. Insumos veterinarios y de laboratorio	31
3.3.4. Material de Gabinete	31
3.4. Metodología	31
3.4.1. Socialización del proyecto	31
3.4.2. Selección del reproductor de la raza Hampshire Down para la colección del semen	31
3.4.3. Entrenamiento del carnero	32
3.4.4. Colección de semen	32
3.4.5. Evaluación de semen colectado	32
3.4.5.1. Evaluación macroscópica del eyaculado	32
3.4.5.1.1. Volumen	32

3.4.5.1.2. pH	32
3.4.5.2. Evaluación microscópica del semen	32
3.4.5.2.1. Motilidad espermática	32
3.4.5.2.2. Vitalidad espermática	32
3.4.6 Concentración Espermática	33
3.4.7. Proceso de dilución y congelación de semen	33
Congelación de semen	34
Descenso de la temperatura	34
Fase de equilibrio	34
Identificación de las pajillas	34
Empajillado de semen y sellado de pajueta	34
3.4.8. Evaluación de semen post descongelado	35
3.4.9. Inseminación con semen criopreservadas	35
3.4.10. Variables de respuesta	35
3.4.11. Evaluación estadística del estudio	37
4. Resultados	37
4.1. Determinación de la vitalidad espermática post congelado	37
4.2. Determinación el porcentaje de movilidad individual de los espermatozoides post – descongelación utilizando vapores controlados de nitrógeno líquido.	38
4.3 Evaluación de la preñez en ovinos inseminados con semen fresco y congelado	39
5. Conclusiones	41
6. Recomendaciones	43
7. Bibliografía	45

ÍNDICE DE CUADROS

<i>CUADRO 1. Determinación de la vitalidad espermática post descongelado a efecto de la vaporización controlada de nitrógeno</i>	37
<i>CUADRO 2. Determinación de la motilidad espermática post descongelado a efecto de la vaporización controlada de nitrógeno</i>	38
<i>CUADRO 3. Determinación de la malformación espermática post descongelado a efecto de la vaporización controlada de nitrógeno</i>	
<i>CUADRO 4. Preñes en ovinos inseminados con semen fresco y congelado</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Comparación de medias de la vitalidad espermática post descongelado a efecto de la vaporización controlada de nitrógeno</i>	37
<i>Figura 2. Comparación de medias de la motilidad espermática post descongelado a efecto de la vaporización controlada de nitrógeno</i>	38

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>ANEXO 1. Socialización del convenio con los productores de ovinos del municipio de Laja, para la ejecución del proyecto de investigación</i>	51
<i>ANEXO 2. Firma del convenio para la ejecución del trabajo de investigación con las autoridades de la comunidad de Collpajawa y las autoridades del municipio de Laja</i>	53
<i>ANEXO 3. Proceso de recolección del semen del reproductor ovino de la raza Hampshire Down</i>	54
<i>ANEXO 4. Llenado de pajuelas con el semen de del reproductor ovino de la raza Hampshire Down, para su criopreservación</i>	55
<i>Anexo 5. Proceso de congelación del semen del reproductor ovino de la raza Hampshire Down.</i>	56
<i>Anexo 6. Proceso de evaluación del semen del reproductor ovino de la raza Hampshire Down.</i>	57
<i>Anexo 7. Proceso de inseminación con semen criopreservado.</i>	58

RESUMEN

El sistema productivo en ovinos presenta bajos índices reproductivos y productivos, lo cual afecta directamente a las familias dedicadas a esta actividad.

El objetivo del estudio fue evaluar la criopreservación de semen de ovino por vaporización controlada de nitrógeno a 5, 10 y 15 minutos respectivamente. El trabajo de laboratorio se desarrolló en los ambientes de los módulos productivos de la Carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria de la Universidad Pública de El Alto, y para la prueba de inseminación se lo realizó en la comunidad de Collpajawa del municipio de Laja. El material biológico utilizado fue un ovino de la raza Hampshire Down. La colección de semen fue evaluada macroscópicamente y microscópicamente mediante el equipo FOTOMETRO SDM1.

Para el primer y segundo objetivo específico se utilizó un diseño completamente al azar, el nivel de significancia con la que se trabajó fue al 5 %, para evaluar las diferencias estadísticas en el análisis de varianza, asimismo, se procedió a realizar la comparación de medias Tukey. Para el tercer objetivo específico se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrado (X^2).

Los resultados con relación a la vitalidad espermática postdescongelado, muestran que con la aplicación de 15 minutos de vaporización controlada es estadísticamente diferente y superior a los otros dos tratamientos, alcanzando un 50.03 %, seguido de 45.53 % con 10 minutos y 37.60 % con 5 minutos respectivamente.

Con relación a la movilidad espermática post descongelado, se evidencia que la vaporización por 15 minutos es estadísticamente diferente y superior (50.03 % motilidad) respecto a los demás tiempos de vaporización; la motilidad espermática post descongelado fue de 43.93 % y 36.60 para 10 y 5 minutos de vaporización con nitrógeno respectivamente. Los resultados de preñez con semen fresco y semen congelado, muestran que las borregas inseminadas con semen fresco alcanzaron un porcentaje de preñez de 38.89 %; mientras las borregas inseminadas con semen congelado, fue del 10 %.

Palabras clave: Ovis aries, criopreservación, semen, tiempos de vaporización controlada de nitrógeno.

ABSTRACT

The sheep production system has low reproductive and productive indices, which directly affects the families dedicated to this activity.

The objective of the study was to evaluate the cryopreservation of sheep semen by controlled nitrogen vaporization at 5, 10 and 15 minutes respectively. The laboratory work was developed in the environments of the productive modules of the Career of Engineering in Zootechnics and Livestock Industry of the Public University of El Alto, and for the insemination test it was carried out in the community of Collpajawa in the municipality of Laja. The biological material used was a sheep of the Hampshire Down breed. The semen collection was evaluated macroscopically and microscopically using the PHOTOMETER SDM1 equipment.

For the first and second specific objective, a completely randomized design was used, the level of significance with which it was worked was at 5%, to evaluate the statistical differences in the analysis of variance, likewise, the comparison of means was carried out Tukey. For the third specific objective, the statistical test of Chi square (χ^2) was used.

The results regarding post-thaw sperm vitality show that with the application of 15 minutes of controlled vaporization it is statistically different and superior to the other two treatments, reaching 50.03%, followed by 45.53% with 10 minutes and 37.60% with 5 minutes respectively.

Regarding post-thaw sperm motility, it is evidenced that vaporization for 15 minutes is statistically different and higher (50.03% motility) compared to the other vaporization times; post-thaw sperm motility was 43.93% and 36.60 for 10 and 5 minutes of nitrogen vaporization, respectively. Pregnancy results with fresh semen and frozen semen show that ewes inseminated with fresh semen reached a pregnancy percentage of 38.89%; while sheep inseminated with frozen semen, it was 10%.

Keywords: Ovis aries, cryopreservation, semen, controlled nitrogen vaporization times.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

La crianza y producción de ovinos (Ovis aries) en Bolivia, tiene una importancia vital en el altiplano boliviano, particularmente en el departamento de La Paz, por ser esta una actividad de importancia social y económica para pequeños productores.

Según el Censo Agropecuario 2013 , la producción de ovinos a nivel de Bolivia es de 6.267.743 cabezas, de las cuales 4.667.921 son hembras y 1.599.822 machos; donde los departamentos de La Paz, Potosí, Oruro y Cochabamba concentran 82,8 por ciento del ganado ovino. Donde el departamento de La Paz cuenta con 1.799.374 cabezas, ocupando el primer lugar, seguido de Potosí con 1.375.349 cabezas; el menor productor es Pando con 2.554 cabezas.

La inseminación artificial es una técnica de reproducción que se utiliza para difundir las características productivas deseables de carneros con alto valor genético, que tiene como objetivo incrementar notablemente el aprovechamiento de un reproductor, al permitir obtener un gran número de crías del mismo padre. Las técnicas de congelamiento del semen posibilitan aún más la multiplicación y difusión de genes, al tiempo que permiten su conservación en nitrógeno líquido (a 196°C bajo cero) por un período ilimitado de tiempo. (Gibbons, A., & Cueto, M. 1995).

Así también afirman que el empleo del semen congelado ovino puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético, al aumentar considerablemente el flujo de material genético de las cabañas hacia las majadas generales, así como al facilitar el transporte de semen a nivel internacional. De esta manera, se evita el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el riesgo sanitario.

Aisen et al., 1995, citados por Ramos Zarate, L., Rojas Pardo, A., & Martínez Flores, Z. 2017, mencionan que la criopreservación del semen y la inseminación artificial son técnicas reproductivas utilizadas para conseguir un rápido progreso genético. Sin embargo, la inseminación artificial con semen congelado, aun es insatisfactoria debido a la baja tasa de fertilidad en el ganado ovino, esto podría deberse a varios factores como los daños ocasionados en las membranas de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación alterando su función metabólica, esto puede ser prevenido parcialmente mediante el control de la velocidad de congelamiento y uso de un dilutor adecuado.

Los mismos autores mencionan que se hace necesario buscar una alternativa para prevenir daños en los espermatozoides durante su criopreservación y así lograr mejores tasas de fertilidad en los ovinos sometidos a la técnica de la inseminación artificial. Los daños producidos en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, pueden prevenirse controlando la velocidad de congelamiento y usando un dilutor adecuado.

En consecuencia, el objetivo de la investigación fue evaluar la criopreservación de semen y la inseminación artificial en ovino por vaporización controlada de nitrógeno.

1.2 Identificación del problema

La crianza y producción de ovinos en Bolivia tiene una relevancia económica y social muy importante principalmente para los pequeños productores, en especial de la región del altiplano, es en este contexto la inseminación artificial por criopreservación puede ser una alternativa para el mejoramiento genético.

¹ Instituto Nacional de Estadística, Censo Agropecuario 2013, BOLIVIA

Según Cardozo y Rodríguez, (1989), el índice de fertilidad promedio en ovinos es 48,4 % a nivel nacional.

Así también mencionan que los factores que afectan la producción del ganado ovino son:

- Los costos de los equipos de criopreservación automáticos de semen son elevados.
- Los índices productivos y reproductivos son muy bajos
- Existe ausencia de programas de mejoramiento genético a nivel Municipal y Departamental.
- Ausencia de cabañas con animales de alto valor genético para el mejoramiento genético.
- Sistema de reproducción en ovinos es bajo la tecnología ancestral y/o de conocimientos locales heredados.
- Manejo tradicional reproductivo de los ovinos en la comunidad.
- Poco incentivo de parte del Gobierno a este sector.
- Alta consanguinidad por la falta de refrescamiento genético y de un mal manejo de las hembras gestantes.
- Alta presencia de hembras infértiles por motivos fisiológicos.
- Mínima presencia de razas especializadas para la producción de carne y/o leche.
- Productividad baja por lo cual los ingresos de las familias son bajos.

Todos estos problemas se enmarcan en el aspecto reproductivo; estos requieren ser investigados por los profesionales especializados en el área, lo que permite encontrar soluciones a los problemas descritos y así contribuir a la mejora de la producción ovina en el altiplano boliviano.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la criopreservación de semen y la inseminación artificial en ovinos por vaporización controlada de nitrógeno en la comunidad Collpajawa, municipio de Laja.

1.3.2 Objetivos específicos

- Comparar la vitalidad espermática post – descongelación, utilizando la técnica de criopreservación (vapores controlados de nitrógeno líquido).
- Determinar el porcentaje de movilidad individual de los espermatozoides post – descongelación utilizando vapores controlados de nitrógeno líquido.
- Realizar la inseminación artificial utilizando semen tratado mediante la técnica de criopreservación (vapores controlados de nitrógeno líquido).

1.4 Hipótesis de la investigación

1.4.1 Hipótesis nula

No existe diferencia significativa en la evaluación de las características seminales al realizar la criopreservación del semen bajo tiempos de vaporización controlada de un ovino reproductor de la raza Hampshire Down.

1.4.2 Hipótesis alterna

Existe diferencia significativa en la evaluación de las características seminales al realizar la

criopreservación del semen bajo tiempos de vaporización controlada de un ovino reproductor de la raza Hampshire Down.

1.5 Justificación

El Instituto de Investigación de la Carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria, identifica las necesidades de temas de investigación conjuntamente con los pobladores del Municipio de Laja, quienes solicitan y firman un acuerdo para llevar adelante la presente investigación.

El Proyecto y su estructura responden a una estrategia que busca consolidar los esfuerzos realizados con el acercamiento de la comunidad de Collpajawa, Municipio de Laja con la Carrera de Ingeniería en Zootecnia e Industria Pecuaria, para integrar la investigación científica con las necesidades sociales del municipio, a través del financiamiento IDH.

La obtención y fraccionamiento del semen de carnero genéticamente superior para su utilización en fresco y/o preservado permite acelerar el mejoramiento de las características productivas de los rebaños, al aumentar el número de crías logradas con respecto a las que se obtendrían en servicio natural. Las técnicas de congelamiento de semen posibilitan la multiplicación y difusión de genes, al mismo tiempo que su conservación por períodos prolongados de tiempo.

El uso de semen congelado ovino en la inseminación artificial, produjo un gran impacto en el mejoramiento genético mundial, al permitir acelerar considerablemente el flujo de material genético superior hacia sectores poblacionales de inferiores características productivas, así como al facilitar el transporte de semen. Su utilización permite la absorción genética de una raza local por una introducida, a través de cruzamientos absorbentes en varias generaciones. Se evita también el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el riesgo sanitario.

En este sentido, se desarrolló la investigación, la misma que fue socializada en una primera instancia con autoridades del municipio de Laja, posteriormente con los productores de ovinos; la aplicación de esta técnica de criopreservación de semen, mediante la congelación de vapores controlados de nitrógeno líquido es una alternativa en el mejoramiento genético.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 La inseminación artificial con semen congelado

La Inseminación Artificial es una técnica empleada en la producción ganadera, en una mayor dimensión en el ganado bovino, y en una menor escala en ovinos; esta contribuye de forma rápida, efectiva y económica al progreso de la ganadería lechera y de carne en el país; lo que constituyó una razón fundamental de realizar investigaciones sobre este aspecto reproductivo.

Durán del Campo, 1980, citado por Clifton, G., 1993, señala que inseminación artificial es una técnica reproductiva en la cual las células sexuales masculinas (espermatozoides) son descargadas en el tracto genital femenino con la ayuda de medios mecánicos que sustituyen los órganos del macho.

La criopreservación del semen de ovino y la inseminación artificial son técnicas reproductivas utilizadas para conseguir un rápido progreso genético. Sin embargo, la inseminación artificial con semen congelado, aún es insatisfactoria debido a la baja tasa de fertilidad en el ganado ovino, esto podría deberse a varios factores como los daños ocasionados en las membranas de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación alterando su función metabólica, esto puede ser prevenido parcialmente mediante el control de la velocidad de congelamiento y uso de un dilutor adecuado (Aisen et al., 1995), mencionado por Ramos et. al., 2017.

Maxwell y Watson, 1996 (citados por Valdez J. D. 2013), indican con relación a la fertilidad obtenida con semen congelado es menor a la de semen fresco, debido a una baja viabilidad postdescongelamiento y a un trastorno sub letal en la proporción de espermatozoides sobrevivientes. Esto se debe a los daños ocasionados en la membrana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación, donde se altera la función metabólica del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables y ocasionando una capacitación espermática prematura.

Gillan y Maxwell, 1999, (mencionados por Valdez J. D. 2013), señalan que consecuentemente los espermatozoides sólo serían viables un corto periodo de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra, y, por lo tanto, tendrían una menor oportunidad de poder fecundar los ovocitos. Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas, reduciendo la concentración de electrólitos del medio celular interno y posibilitando la supervivencia al permitir que el agua intracelular salga al exterior y se congele durante el proceso de criopreservación, la célula se deshidrata y evita que se forme cristales de hielo internamente. Sin embargo, estos compuestos incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides y que está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores.

Stornelli, et. al., 2005; Ávila, et. al., 2006, (mencionados por Valdez J. D. 2013), revelan que el estrés osmótico afecta los fosfolípidos de la membrana plasmática aumentando la permeabilidad y fusionándola con el acrosoma. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por el glicerol posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica pudiendo ser reducido mediante la incorporación en etapas del glicerol en el medio de congelación en el proceso de criopreservación lo que permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado.

Los crioprotectores, según Salomón, Wilmot y Polge 1973, (citados por Clifton. G.1993), se dividen en:

Penetrantes: por ejemplo, el glicerol: su efecto protector está basado en la capacidad de unirse a la estructura molecular del agua, reforzándola (propiedad coligativa) provocando un descenso del punto de congelación y aumentando la viscosidad. Esto retarda la formación de hielo y la rápida concentración de sales. Por consiguiente, el glicerol permite la formación limitada de hielo, evita su crecimiento y reduce la concentración de sales al mantener una parte del agua sin congelar; también ayuda a la dilución de eletrólitos.

Cuando se incorpora glicerina a un medio isotónico este se vuelve hipertónico y la célula libera agua al medio extracelular para equilibrar las diferencias de presiones. Como el glicerol penetra en el citoplasma celular, la célula incorpora agua de acuerdo a la concentración de glicerol penetra en el citoplasma celular. Este proceso biofísico es dependiente del tiempo y se denomina “equilibración”.

La glicerina modifica también la estructura de los cristales de hielo que se forman al congelarse el agua, disminuyendo la posibilidad de un trauma mecánico por punción de la membrana. El glicerol presenta la característica que su grado de penetración en la célula varía con la temperatura, haciéndose casi nula a 0 °C. Variando la temperatura del medio al que se agrega el glicerol se logra disminuir su toxicidad.

No penetrantes: Dextrin, peptona, metilcelulosa (Leiacal M 20), polyvimilpyrrolidona, ácido etil diámino tetra acético dimetil sulfóxido (DMSO) y lactosa, entre otros.

2.2 Congelación del semen ovino

Evans, et. al., 1990, (mencionados por Clifton. G.1993), indican que la congelación del semen para su conservación se realiza a bajas temperaturas (-196 °C), a esta temperatura las reacciones metabólicas de los espermatozoides se detienen pudiendo conservarlo durante mucho tiempo, además se facilita su transporte ampliando considerablemente la utilización de los sementales.

2.3 Factores que afectan la viabilidad espermática durante el proceso de crioconservación

Galina, et. al., 2009 y Choez, 2010, (citados por Valdez J. D. 2013), indican que la estructura y composición de las membranas plasmáticas determinan los principales eventos celulares que tienen lugar durante los procesos de criopreservación, su comportamiento durante la congelación y descongelación definirá los índices de supervivencia de la célula congelada. Los periodos críticos para la sobrevivencia celular durante la criopreservación son, la fase inicial del congelamiento y el periodo de retorno a condiciones fisiológicas.

Stornelli, et. al., 2005 y Galina, et. al., 2009, (citados por Valdez J. D. 2013), afirman que cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol, y posteriormente cuando la solución es congelada. Más tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y eletrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determina la mayor o menor capacidad de la célula para soportar.

Stornelli et. al., 2005, (mencionados por Valdez J. D. 2013), afirman que el shock térmico, dado por el enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C, inducen a un estrés letal y el aumento de la permeabilidad de la membrana en algunas células viéndose afectada la regulación del calcio, por lo

que debe realizarse cuidadosamente. Usualmente se utiliza yema de huevo en la preparación de los diluyentes debido a que los fosfolípidos y las lipoproteínas de baja densidad y alto peso molecular posee un efecto protector contra el shock de frío al actuar sobre la superficie celular.

Los crioprotectores permiten mantener una mayor proporción de agua líquida a bajas temperaturas, reduciendo la concentración de electrólitos del medio celular interno posibilitando la supervivencia al permitir que el agua intracelular salga al exterior y se congele durante el proceso de criopreservación, la célula se deshidrata y evita que se forme cristales de hielo internamente. Sin embargo, estos compuestos, incorporados a los diluyentes producen un estrés transitorio importante sobre la membrana plasmática de los espermatozoides y que está íntimamente relacionada con la capacidad penetrante de los crioprotectores.

Stornelli et. al., 2005 y Ávila et. al., 2006, (nombrados por Valdez J. D. 2013), afirman que el estrés osmótico afecta los fosfolípidos de la membrana plasmática aumentando la permeabilidad y fusionándola con el acrosoma. Se ha observado que la hiperosmolaridad producida por el glicerol posee un efecto estimulador de la reacción acrosómica pudiendo ser reducido mediante la incorporación en etapas del glicerol en el medio de congelación en el proceso de criopreservación lo que permite aumentar considerablemente la proporción de espermatozoides sobrevivientes al descongelado.

2.3.1 Alteraciones de los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación

Stornelli, et. al., 2005, (mencionado por Valdez J. D. 2013), concluyen que la crioconservación disminuye la motilidad espermática, dado por la heterogeneidad de la población de células espermáticas presentes en el semen al momento de la congelación. Los espermatozoides descongelados muestran movimiento de intensidad variable relacionándose con la pobre capacidad fecundante del semen congelado.

Camara, et. al., 2011, mencionan que en la célula espermática, los lugares primarios de daños causados por la crioconservación son las membranas: plasmática y acrosomal, estructuras celulares importantes para la supervivencia y fertilidad de los espermatozoides. La agrupación de las proteínas de la membrana celular durante la fase de separación lipídica inducida por el enfriamiento no es enteramente reversible comprometiendo la estructura de los receptores y en consecuencia sobre la interacción entre gametos (espermatozoide-óvulo).

La crioconservación induce a que los espermatozoides sufran una aparente capacitación mostrando un aumento de calcio libre intracelular y cambios típicos de este evento como la reacción acrosomal (Stornelli, et. al., 2005), mencionado por Valdez J. D. 2013.

Gadea, 2003 y Hafez, et. al., 2004, (citado por Valdez 2013), afirman que la reacción del acrosoma es el contribuidor esencial para la fertilización porque solo con esta reacción el espermatozoide puede penetrar la zona pelúcida y fusionarse con el oocito, y su daño impide la viabilidad del espermatozoide

2.3.2 Procesamiento y congelación del semen ovino para inseminación artificial

El semen del carnero se puede congelar empleando la metodología convencional (congelación lenta) o la metodología rápida (congelación rápida) pudiendo emplearse para el efecto pajuelas de plástico, ampollitas o pellets; el semen congelado con la metodología rápida mejora la supervivencia de los espermatozoides (Evans, et. al., 1990), mencionado por Valdez J. D. 2013.

El plasma seminal no contiene sustancias suficientes para mantener la viabilidad del eyaculado por largos periodos de tiempo por lo que es imprescindible la adición de agentes crioprotectores que prolonguen la vida de las células espermáticas destinadas a inseminación artificial (Illera, 1994), mencionado por Valdez J. D. 2013.

Evans, et. al., 1990, (citado por Valdez J. D. 2013), afirman que el método de congelación de un solo paso es ampliamente empleado en la congelación de semen de carnero por su simplicidad y menor manejo del semen antes de su congelación; para hacer la dilución de un solo paso, el semen se diluye a la dilución final de precongelación a 30 °C con diluyente que contiene glicerol y luego se refrigera a temperatura de 5 °C por 1.5 a 2 horas para luego ser expuestas a vapores de nitrógeno líquido y posterior sumergimiento en el mismo

2.3.3 Diluyentes para congelar semen de ovino

Las funciones básicas de los diluyentes son: el mantenimiento de la fertilidad durante la crioconservación y la dilución del eyaculado para alcanzar el número apropiado de espermatozoides por dosis inseminante (Cueto M., et al., 1993).

Los diluyentes del semen deben contener: un sustrato energético (azúcar), una concentración apropiada de electrolitos para proteger a los espermios de los cambios de pH y presión osmótica (solución tampón), componentes de alto peso molecular para proteger a las células de los efectos nocivos del frío y estabilizar las membranas durante la congelación (lecitina, proteínas, lipoproteínas), un agente crioprotector (glicerol) y antibióticos (Illera, 1994; Laing, et. al., 1990).

Evans, et al., 1990 (mencionado por Valdez J. D. 2013), afirma que el medio Tris-glucosa-yema de huevo de un solo paso, es el más adecuado para la dilución de semen de carnero en pajueta o pelets.

2.3.4 Sustrato Energético

La composición de los diluyentes seminales incluye los carbohidratos para brindar energía a las células espermáticas. Los carbohidratos pueden ser preferiblemente un azúcar de metabolismo simple y que las células pueden utilizarlo como fuente de energía (Laskutoff, et. al., 2010), citado por Valdez J. D. 2013.

Galina, et al., 2009; Illera, 1994 (citados por Valdez J. D. 2013), afirman que la glucosa es el sustrato de energía más frecuentemente utilizado en la composición de los diluyentes, aunque se han usado también la galactosa, fructosa, ribosa y trehalosa pero con resultados inferiores

Laskutoff, et. al., 2010, (citados por Valdez J. D. 2013), afirman que la cantidad de azúcar no debe ser menor a 0.5 %. Así mismo, un exceso de carbohidratos puede aumentar la osmolaridad por lo que no debe superar el 3 % en la composición.

2.3.5 Agentes Proteínicos

Martínez, et. al., 2011, (citados por Valdez J. D. 2013), mencionan que los agentes proteínicos empleados en los diluyentes seminales se encuentran en la yema de huevo (YH) y la leche descremada. La yema de huevo (YH) se utiliza ampliamente para la dilución del semen de diferentes especies 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, formando un barniz protector alrededor de los espermatozoides y proveyendo de nutrientes a los mismos.

De la Vega 2000, (citado por Valdez J. D. 2013), afirman que la leche de vaca es otro compuesto utilizado en la preparación de diluyentes para semen, y que para ser empleada debe ser descremada (leche descremada "LD") y llevada hasta el punto de ebullición por 15 minutos con lo que se inhibe la lactenina presente en la leche y que resulta tóxica para los espermatozoides. Con el proceso de calentamiento, la leche además de contribuir con el componente proteico para el diluyente seminal, promueve el desdoblamiento de la lactosa a glucosa y galactosa, que los espermatozoides pueden utilizar como fuente energética de mayor disponibilidad.

Córdova, et. al., 2008, (mencionado por Valdez, 2013), afirman que el uso de la leche de vaca se debe a la fracción proteica (caseína), la cual puede actuar como amortiguador contra los cambios del pH y como agente quelante contra algunos metales pesados. También protege parcialmente al espermatozoide durante la reducción de la temperatura en el almacenamiento.

2.3.6 Agentes tamponadores o reguladores de pH

Galina, et. al., 2009 y Laskutoff, et. al., 2010, (citados por Valdez, 2013), mencionan que el aditamento de agentes tamponadores a los diluyentes seminales ayuda a controlar el pH del medio. Sin estas sustancias el pH disminuye por acción del metabolismo del espermatozoide formando ácido láctico que es el principal metabolito, reduciendo el pH intracelular y su metabolismo. Entre las sustancias tamponadoras simples se encuentran el citrato y el bicarbonato de sodio con una capacidad tamponadora limitada; se han empleado sustancias más complejas que pueden regular el pH en un rango más amplio y no son dependientes de la temperatura (TES, HEPES, MOPS y TRIS).

2.3.7 Agentes Crioprotectores

Herrera, et. al., 2012, (mencionados por Valdez, 2013), afirman que el crioprotector más frecuentemente usado es el glicerol, usado para el congelamiento de semen, la concentración óptima está determinada por la composición del diluyente, la velocidad de enfriamiento, el método de congelación y descongelación empleado y la especie animal, siendo este último factor el más determinante.

Así también afirman que la principal función del glicerol es reducir la concentración de sales y conservar mayor cantidad de agua no congelada, tanto en el interior como en el exterior de la célula a cualquier temperatura. El glicerol pese a ser un buen crioprotector, también tiene efectos adversos sobre el espermatozoide durante su adicción y en el proceso de congelación y descongelación, viéndose afectada la motilidad posdescongelación. La velocidad de congelamiento y descongelamiento, y la composición del diluyente interactúan con la concentración del crioprotector, por lo que se hace necesario variar los porcentajes de glicerol según el método de congelación, la que hace que la supervivencia de los espermatozoides depende de la concentración del crioprotector y la velocidad de congelamiento y descongelamiento escogidas.

2.3.8 Aditivos empleados en los diluyentes ovinos

Bittencourt, et. al., 2008; Deneb, et. al., 2012 y Morton et. al., 2010, (citados por Valdez, 2013), mencionan que entre los aditivos más empleados tenemos la yema de huevo, leche entera descremada y albúmina sérica bovina, principales constituyentes de los diluyentes seminales por décadas, se han empleado sustancias que permiten mejorar las tasas de movilidad e integridad de la membrana

plasmática de los espermatozoides ovinos crioconservados con diluyentes convencionales (Tris + yema de huevo) como surfactantes o detergentes, anticoagulantes, factores de crecimiento y antioxidantes.

Así también afirman, que el surfactante lauril sulfato sódico conocido también como dodecil sulfato iónico (DSI) o dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico soluble en agua que se utiliza para solubilizar proteínas.

2.3.9 Descongelación del semen ovino crioconservado

La fase de descongelamiento es tan importante para la sobrevivencia de los espermatozoides como el proceso de congelamiento, los espermatozoides que sobreviven a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ son sometidos al calentamiento y atraviesan nuevamente la zona crítica de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Mazon, 2011), mencionado por Valdez J. D. 2013. La descongelación de semen es un punto muy crítico pudiendo lesionarse los espermatozoides si el proceso de descongelación no se lleva a cabo de una forma apropiada, aparte de los daños criogénicos causados por la congelación.

El semen de carnero se debe descongelar a una temperatura no menor a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un baño de agua con termómetro por un lapso de 45 a 50 segundos (Evans, et. al., 1990; Illera, 1994). La descongelación del semen a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ es más adecuada en condiciones prácticas por excluir el riesgo de súper calentamiento (Mazon, 2011), citado por Valdez J. D. 2013.

2.3.10 Valoración del esperma congelado-descongelado

Galina, et. al., 2009, (mencionados por Valdez J. D. 2013), afirman que la fertilidad del semen congelado-descongelado se relaciona con la motilidad, viabilidad, ultra-estructura y cambios bioquímicos del espermatozoide congelado-descongelado. Sin embargo, las pruebas de laboratorio básicas para evaluar el semen crioconservado son la motilidad, viabilidad e integridad de las membranas: plasmática y acrosomal.

2.3.11 Motilidad y viabilidad

Evans, et. al., 1990, (citados por Valdez J. D. 2013), afirman que la motilidad es el análisis más simple de realizar, se basa en la visualización de ondas de movimiento espermático observadas al microscopio en un portaobjetos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ luego de descongelar el semen apropiadamente. Para el indicativo de viabilidad de los espermatozoides, el análisis de motilidad se debe realizar a intervalos de una y dos horas después de descongelado el semen en una muestra de 0.5 ml incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los eyaculados de carnero se consideran adecuados para su conservación y uso en inseminación artificial si el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo no es menor del 40 % al descongelarlos y de 30 % después de terminado la prueba de viabilidad.

2.3.12 Integridad de las membranas plasmática y acrosomal

El proceso de congelación-descongelación afecta las membranas: plasmática y acrosomal. La proporción de daño acrosomal varía con el método de congelación sin exceder el 70 % (Evans, et. al., 1990), mencionado por Valdez J. D. 2013.

Rubio, 2009, (citado por Valdez J. D. 2013), afirman que las pruebas más simples para detectar el daño en las membranas: plasmática y acrosomal, son el test de endosmosis positiva (HOST), que

evalúa la integridad de la membrana plasmática, y el test de resistencia osmótica (ORT), que evalúa la integridad del acrosoma.

Rubio, 2009, (citado por Valdez, 2013), afirman que el test de valoración de la funcionalidad acrosomal, es una prueba que permite valorar la integridad del acrosoma al someter los espermatozoides a un medio hipo-osmótico (Osmotic Resistance Test, ORT), de forma que aquellos funcionales no mostrarán alteraciones estructurales evidentes a nivel acrosómico. La evaluación del estado de los acrosomas permite comparar la resistencia osmótica de las membranas de distintos eyaculados. Al realizar esta prueba se evalúan dos grupos de muestras sometidas a dos diferentes condiciones, una en hiposmosis (150 mOsm/L) y otra en condiciones isosmóticas a 320 mOsm/L que sirve como grupo control al test. Los resultados se reflejan de manera porcentual, luego de sumar los porcentajes de acrosomas intactos en las muestras evaluadas de ambos grupos y dividirlos entre dos, para obtener así un cociente que representa el porcentaje de resistencia acrosomal al medio hipo-osmótico (%ORT).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El trabajo de investigación se realizó en la comunidad de Collpajawa del Municipio de Laja, segunda sección municipal de la Provincia Los Andes del departamento de La Paz. Se encuentra ubicado a 35 km de la ciudad de La Paz, capital del departamento; y se encuentra a 3.860 msnm (PTDI Laja, 2016).

3.2 Características del ecosistema

3.2.1 Características flora de la zona

- Las características edafológicas de las comunidades del municipio de Laja, y según el PTDI Laja, (2016) son las siguientes:
- Dispersa de pajonales amacollados en pedregales de la Puna húmeda, pastoreo, agropecuario, con minería en sectores.
- Arbustos dispersos, pajonales amacollados en sustrato rocoso y manchones de bosques de *Polylepis* de la puna húmeda, pastoreo, agricultura, ganadería y minería por sectores pajonales, herbazales amacollados y bofedales alto andinos de la Puna húmeda, ganadería, agropecuaria y minería por sectores.
- Pajonales, herbazales amacollados y bofedales alto andinos de la Puna húmeda, ganadería, agropecuaria y minería por sectores.
- Pajonales amacollados y tolares en pedregales de la Puna Norteña subhúmeda a húmeda, ganadería, agropecuario, con áreas de explotación de yacimientos mineros.
- Pajonales amacollados y tolares en pedregales de la Puna Norteña subhúmeda a húmeda, ganadería, agropecuario, con áreas de minería.

3.2.2 Suelos

El tipo de suelo de municipio de Laja es una asociación Cambízales Leptosoles con inclusión fluvisoles, Asociación Cambízales Leptosoles con inclusión gleysoles, Asociación Cambízales Leptosoles con inclusión luvisoles, Asociación de gleysoles, Asociación de leptosoles con inclusión de fluvisoles, Asociación de regosoles con inclusión de fluvisoles y litosoles.

3.2.3 Cuencas Hidrográficas

El municipio de Laja corresponde a la Unidad Hidrogeográfica (UH) endorreica denominada Cuenca del Altiplano; donde se encuentran los siguientes ríos y afluentes a la cuenca, las cuales son:

- Río Vilaque
- Río Tujsa Jahuira
- Parte Media Río Jacha Jahuira
- Río Caicoma
- Río Catavi
- Río Guaquira.

²Plan de Desarrollo Territorial Integral (PTDI - 2016).

3.2.4 Clima

El territorio del Municipio de Laja presenta un clima frígido, bajas temperaturas, con presencia de vientos de sur a norte, siendo un factor determinante para el desarrollo de la actividad agropecuaria, donde no es posible realizar actividades agrícolas durante la época seca y fría, inclusive puede afectar a los cultivos protegidos (invernaderos) por las temperaturas extremas mínimas, temperatura promedio anual es de 10 °C.

3.2.5 Precipitación pluvial y vegetación

La precipitación promedio anual en la zona es de 667 mm, en los meses comprendidos entre noviembre a marzo, si bien las primeras lluvias se registran en septiembre y pueden extenderse hasta abril. El promedio de precipitación máxima anual llega a los 911 mm y mientras que el promedio mínimo es de 404 mm.

A nivel de municipio la vegetación nativa en su gran mayoría es arbustiva y más que un aprovechamiento en términos de volúmenes, se tiene una extracción selectiva con fines de uso doméstico (leña). La vegetación existente es rala y se concentra en las zonas de piedemonte y serranía, existiendo especies introducidas principalmente arbóreas adaptadas a los factores geomorfológicos y climatológicos de la región.

En las serranías la vegetación comprende dominante son los pajonales de Chilliwa e Ichu sicuya (*Stipa ichu*), arbustos de añahuaya (*Adesmia miraflorensis*) y kaylla (*Tetraglochin cristatum*); en las zonas más bajas se encuentran relictos de arbustos, sobre todo de la familia *Baccharis* sp. (*Thola*, *Añawayá*). En las cuevas y mesetas, la vegetación con mayor presencia corresponde a pastos del tipo chillihuas porkeal y los chijiales sicuya (*Stipa ichu*), así mismo se encuentran ichuales, cebadillares, *naccka tholares*, *ilchual*, *chillihuar kaillar*, añahuaya (*Adesmia miraflorensis*) y kaylla (*Tetraglochin cristatum*).

3.3 MATERIALES

3.3.1 Material Biológico

Se seleccionó un reproductor ovino de la raza Hampshire Down para la colección del semen, el cual fue adquirido de los mejores rebaños de productores de ganado ovino de la región altiplánica de nuestro País, mediante evaluación de parámetros como la condición corporal, edad, tamaño testicular y fenotipo característico de la raza.

Por otra parte, se utilizaron 50 hembras de razas criollas y mestizas, con edades que oscilan entre 9 meses y 1 año, en algunos casos fueron multíparas.

3.3.2 Material de Campo

Los materiales utilizados durante el proceso de investigación fueron los siguientes:

- 1 Aplicador de dispositivos intravaginales para ovinos
- 1 Termo criogénico de semen
- 1 Pistola de inseminación de ovinos
- 1 Termómetro
- 1 Funda de catéter
- 1 Areteador aplicador de caravana

- 1 Corta pajuelas
- 100 Guantes de palpación rectal
- 100 Jeringas de 10 ml
- 100 Agujas hipodérmicas desechables
- 5 kg de algodón
- 1 Litro de yodo
- Una caja de barbijos
- Una caja de guantes quirúrgicos
- 10 rollos de papel secante.
- Un Ecógrafo de uso veterinario
- Congeladora de semen (adaptación propia)
- Un Kit de colección de semen ovino.
- Un microscopio electrónico
- 200 Pajillas para semen
- 500 g de alcohol polivinílico

3.3.3 Insumos veterinarios y de laboratorio

Durante el desarrollo del trabajo de investigación se emplearon los siguientes insumos veterinarios y de laboratorio:

- 50 ml de benzoato de estradiol
- 50 ml de análogo de prostaglandina
- 35 dispositivos intravaginales o esponjas vaginales
- 100 ml de análogo de GnRH (Hormona folículo estimulante de las gonadotropinas)
- 250 ml de minerales (P, Ca, Ze)
- 250 ml de antibiótico (oxitetraciclina)
- Dilutor de semen comercial triladil.

3.3.4 Material de Gabinete

Se emplearon los siguientes materiales de gabinete:

- 1 cámara fotográfica
- Libreta de campo
- Planillas de registro
- Computadora portátil
- Calculadora
- Impresora

3.4 Metodología

3.4.1 Socialización del proyecto

Esta etapa consistió en socializar el proyecto con los beneficiarios de la comunidad de Collpajawa, las autoridades locales y municipales del municipio de Laja y el equipo técnico de la Carrera de zootecnia e Industria Pecuaria, con la finalidad de socializar el proyecto y hacerlos partícipes de las actividades que se tienen que desarrollar en la ejecución del proyecto.

3.4.2 Selección del reproductor de la raza Hampshire Down para la colección del semen

Se adquirió un reproductor macho de la raza Hampshire Down, de la población de Toledo, perteneciente a la provincia de Saucará en el departamento de Oruro; se realizó una evaluación en base a los parámetros como la condición corporal 3.5 (escala 1-5), edad 18 meses, tamaño testicular y fenotipo característico de la raza.

3.4.3 Entrenamiento del carnero

Consistió en inducir al carnero para que pueda realizar la monta a una hembra sin necesidad que ésta esté en celo, para posteriormente proceder con la colección de semen, utilizando una vagina artificial.

3.4.4 Colección de semen

Con una borrega sujeta a la guillotina de colección y con la vagina artificial armada (temperatura 38 °C y presión adecuada), se indujo a que el carnero realice la monta, previa estimulación (excitación), al momento de la monta se realizó la desviación del pene hacia la vagina artificial para que realice la eyacuación (2 a 4 segundos), todo el proceso de colección duró entre 6 a 10 minutos aproximadamente, pasado este tiempo se retiró al carnero e inmediatamente el eyaculado se trasladó hasta el laboratorio para la correspondiente evaluación.

3.4.5 Evaluación de semen colectado

3.4.5.1 Evaluación macroscópica del eyaculado

3.4.5.1.1 Volumen

El volumen del eyaculado se determinó mediante la medición directa en tubos de recolección graduado en (mL).

3.4.5.1.2 pH del semen

Para la evaluación de pH, se tomó una muestra de 10 µl del eyaculado, el cual se depositó en un portaobjeto, posteriormente una tira de indicador de pH se empañó en la muestra del semen, a los 5 minutos se comparó el color obtenido de la tira, con los colores de la escala cromática impresa en la caja del papel tornasol, el rango para verificar si es básico o ácido es entre 5.5 y 9.

3.4.5.2 Evaluación microscópica del semen

3.4.5.2.1 Motilidad espermática

Para la evaluación de motilidad espermática se colocó 10 µL de semen en un portaobjeto atemperado a 37 °C, la muestra se cubrió con un cubre objeto también atemperado, la lectura se realizó a 40x; contando y valorando los espermatozoides que se mueven de forma rectilínea.

Se dividió el número de espermatozoides en movimiento contado, entre el total de espermatozoides contados en un campo y multiplicado por 100.

$$\% \text{ de motilidad} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides móviles}}{\text{Total, espermatozoides contados}} \times 100$$

3.4.5.2.2 Vitalidad espermática

Se tomó una alícuota del eyaculado y se puso sobre un extremo del portaobjeto atemperado a 37 °C, el eyaculado se mezcló con una alícuota de eosina y nigrosina los cuales se homogenizaron suavemente con el borde de otro portaobjeto también atemperado, luego se realizó el extendido en forma firme, para que el frotis no tenga un grosor excesivo, se dejó secar en la platina térmica y se procedió a la lectura correspondiente con microscopio a 100x, visualizando teñidos cuando los espermatozoides están muertos y vivo cuando están de color blanco brillante, se determinó el porcentaje de vitalidad con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Vitalidad} = \frac{n}{N} \times 100$$

n= Número de espermatozoides sin teñir

N= Número de espermatozoides contados

3.4.6 Concentración espermática

La concentración espermática fue determinada con un fotómetro SDM1 calibrado para semen ovino, el semen se extendió 1:1 con solución salina fisiológica en una cubeta (del fotómetro), luego se procedió a acomodar la cubeta en la cámara del fotómetro para su respectiva valoración. la concentración se determinó en x106 espermatozoides/ml.

Se realizó la evaluación macroscópica y microscópica, mediante el uso FOTOMETRO SDM1.

Sorensen, (1991), (citado por Cáceres, B. E. 2013), afirma que la evaluación espermática nos permitió estimar la fertilidad potencial del semental, determinándose los parámetros espermáticos que son indicadores de calidad del semen del reproductor, según metodología propuesta por el autor.

Estos parámetros pueden ser de carácter macroscópico (color, aspecto, volumen, pH) ya que pueden ser evaluados a simple vista en la muestra seminal; y microscópicos (motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, anormalidades, integridad de membrana, vitalidad) que deben ser evaluados utilizando un microscopio.

3.4.6.1 Motilidad Masal

Evans y Maxwell, 1990, afirman que la motilidad masal valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento solo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes.

Pérez y Pérez, 1985; Padrón et al., 1998, afirman que la motilidad masal se determina mediante microscopía óptica a 100 aumentos (100x), utilizando una pequeña gota de semen puro colocada sobre un portaobjeto temperado a 37 °C.

3.4.6.2. Vitalidad

La membrana celular de los espermatozoides representa una barrera al paso de tinciones al medio intracelular. Los espermatozoides vivos no dejan pasar ningún tipo de colorante a su medio intracelular, mientras que los muertos, los absorben. Este fenómeno biofísico permitió el desarrollo de técnicas orientadas a la diferenciación de espermatozoides vivos de los muertos (Mex., J.E. et al 2009).

Actualmente, existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descrito numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina-nigrosina (Colas, 1975), y azul de Tripán (Suttiyotin y Thwaites, 1992). De tal manera, que si el espermatozoide está vivo, la membrana celular actúa como barrera impermeable impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse Ozturkler et al., (2000), citado por Valdez J. D. 2013.

3.4.7 Proceso de dilución y congelación de semen

Para el proceso de dilución del semen colectado, se utilizó el dilutor comercial Triladyl, previamente atemperado a 36 °C, para luego proceder con la criopreservación mediante la técnica propuesta de congelación por vapores de nitrógeno líquido controlado. Posteriormente fue empajillado para la fase de inseminación.

***Dilución del semen**

Posterior a la evaluación microscópica de los espermatozoides, el eyaculado fue diluido con el dilutor comercial Triladyl, la dilución se realizó a una temperatura de 37 °C. al finalizar la dilución realizó una segunda evaluación de la motilidad.

***Congelación de semen**

***Descenso de la temperatura**

El semen diluido fue sometidas a un descenso de temperatura gradualmente hasta alcanzar 5 °C a una velocidad de 1 °C /2.9 minutos.

***Fase de equilibrio**

Con el propósito de que el crio protector del dilutor tenga efecto sobre los espermatozoides, el semen diluido se refrigeró en una conservadora portátil (5 ± 2 °C) durante 2 horas, se realizó una agitación de la dilución en intervalos de 30 minutos.

***dentificación de las pajillas**

Las pajillas se codificaron con un marcador indeleble, se codificó la especie, código del carnero, fecha y el tratamiento (tiempo de exposición al vapor de nitrógeno).

***Empajillado de semen y sellado de pajuela**

Transcurrido el tiempo de equilibrio (2 horas) se realizó el empajillado del semen diluido, para esto se

utilizó una jeringa modificada, se succionó el semen dejando un espacio de aire de 1cm en la pajilla, estas se sellaron con plastilina, todos estos proceso se realizaron a una temperatura de 5 °C.

***Crioconservación**

La crioconservación del semen se realizó manualmente, con el método de congelado a vapor de nitrógeno controlado, en una cámara criogénica desarrollada. Inicialmente se vertió un kg de Nitrógeno líquido en la cámara criogénica que contiene una rejilla, las pajuelas de semen se distribuyeron sobre la rejilla, seguidamente se cerró la cámara criogénica. Los tiempos de exposición al vapor de nitrógenos fueron 5 minutos (tratamiento 1), 10 minutos (tratamiento 2) y 15 minutos (tratamiento 3) a razón de 6 litros/minuto de aire mediante el sistema de ingreso de la cámara criogénica generándose vapor de nitrógeno, finalmente las pajuelas de semen se sumergieron en nitrógeno líquido y fueron trasladados a las canastillas del termo criogénico a -196 °C.

3.4.8 Evaluación de semen post descongelado

La evaluación microscópica post descongelado se realizó como lo descrito anteriormente.

Después de la criopreservación se procedió con la evaluación del semen para ver las características de vitalidad, motilidad, con el FOTOMETRO sdm1 y un microscopio electrónico.

3.4.9 Inseminación con semen criopreservadas

Para acelerar el proceso de mejora genética en los rebaños de los productores de ovinos de Collpajawa, se procedió a realizar la inseminación artificial con el semen congelado, utilizando el Kit de Inseminación Artificial, para ello se seleccionaron 50 borregas a las cuales se sincronizó el celo.

3.4.10 Variables de respuesta

Para el primer objetivo específico, la variable de respuesta fue:

- la vitalidad espermática (%)

Para el segundo objetivo específico, la variable de respuesta fue:

- la motilidad espermática (%)

Para el tercer objetivo específico, la variable de respuesta fue:

- el porcentaje (%) preñez

3.4.11 Evaluación estadística del estudio

Para el primer y segundo objetivo específico se utilizó un diseño completamente al azar, con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Una observación (vitalidad y motilidad espermática).

μ = Media general del experimento.

α_i = Efecto de la i - ésima Tratamiento (vapores de nitrógeno controlado)

ϵ_{ij} = Error del experimento.

El nivel de significancia con la que se trabajó fue al 5 %, para evaluar las diferencias estadísticas en el análisis de varianza, asimismo, se procedió a realizar la comparación de medias Tukey.

Para el tercer objetivo específico se utilizó la prueba estadística de Chi cuadrado (X^2); con la siguiente fórmula:

$$\chi^2_{calc} = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

Dónde:

X^2 = valor estadístico de ji cuadrada.

f_o = frecuencia observada

f_e = frecuencia esperada.

4. RESULTADOS

4.1 Determinación de la vitalidad espermática post congelado

Cuadro 1. Determinación de la vitalidad espermática post descongelado a efecto de la vaporización controlada de nitrógeno

Variable dependiente: VITALIDAD					
Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-Valor	Pr > F
Tiempo de vaporización	2	2891.088889	1445.544444	243.71	<.0001***
Error	87	516.033333	5.931418		
Total corregido	89	3407.122222			

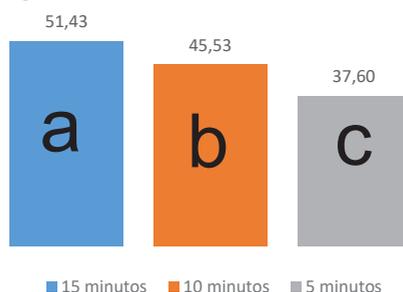
*** Muestra diferencias altamente significativas

CV.: 5.43

El análisis de varianza, indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas de la vitalidad espermática a efecto de los tiempos de vaporización controlada de nitrógeno ($Pr. < 0.05$).

El Coeficiente de Variación, 5.43 % indica que los datos obtenidos y analizados son confiables.

Figura 1. Comparación de medias en la vitalidad espermática post descongelado a efecto de la vaporización controlada de nitrógeno



La Figura 1, de comparación de medias Tukey ($\alpha = 0.05$), muestra que la vitalidad espermática post descongelado es estadísticamente diferente y superior (50.03 %) con 15 minutos de vaporización controlada de nitrógeno respecto a los demás tiempos de vaporización de nitrógeno; la vitalidad espermática post descongelado fue de 45.53 % con 10 minutos de vaporización de nitrógeno, siendo estadísticamente diferente y superior a la motilidad espermática post descongelado 37.60 % con 5 minutos de vaporización controlada.

Castillo, Páucar & Alvarado (2019), realizaron la congelación de semen de carneros utilizando el dilutor comercial Andromed (minitube), se inició el descenso de la temperatura de las pajillas en una refrigeradora, llevando el semen desde 22 °C hasta 5 °C en 2 horas, aproximadamente, y se estabilizó en la refrigeradora a 5 °C durante 18 horas, posteriormente, las pajillas se congelaron en vapores de nitrógeno líquido a -120 °C, en un tiempo de 4 minutos y luego se sumergieron directamente en el nitrógeno líquido. El descongelamiento de las pajillas se realizó a una temperatura de 38 °C en un termo descongelador por 20-30 segundos. La vitalidad reportada fue de 56.59 ± 7.3 , siendo superior al encontrado en nuestro trabajo de investigación, la mejor vitalidad (51.43%) con 15 minutos de vaporización controlada de nitrógeno.

Pérez & Mellisho (2011), en un experimento realizado en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, Universidad Nacional del Altiplano, Melgar, Puno (3970 m.s.n.m). Utilizaron 5 carneros adultos, 2 de raza merino y 3 criollo-mejorado, siendo estos mantenidos en un sistema mixto de pastoreo/estabulado. Se realizaron 5 colectas a cada carnero con una vagina artificial. Se utilizó el dilutor tris-yema-glicerol a una concentración final de 160 millones/ml, en dos etapas, primero a 15 °C dilutor sin glicerol y segunda a 5 °C dilutor con glicerol. Posteriormente, se realizó el envasado de las pajillas (0.25ml) y se dejaron 1 hora en tiempo de equilibrio, luego se procedió a congelar. Las pajillas de semen del tratamiento controlado fueron expuestas a una tasa de congelación de -20 °C/minuto por 6 minutos (-120 °C) y, posteriormente, sumergidas en nitrógeno líquido (NL; -196 °C). En el método sin control, las pajillas fueron colocadas en rejillas a 6 cm sobre el nivel de NL, dentro de una caja de tecnopor cerrada herméticamente por 10 minutos, siendo luego sumergidas en NL. Las muestras fueron evaluadas reportándose una vitalidad espermática de $54.65 \pm 4.43a$ $45.00 \pm 11.10b$ % para tratamiento controlado y sin control respectivamente.

4.2. Determinación el porcentaje de movilidad individual de los espermatozoides post – descongelación utilizando vapores controlados de nitrógeno líquido.

Cuadro 2. Determinación el porcentaje de movilidad individual de los espermatozoides

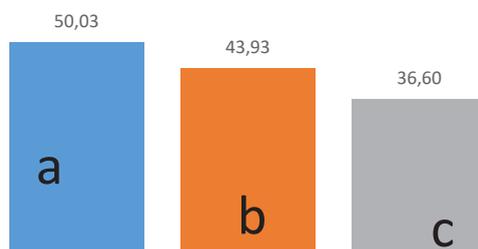
Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-Valor	Pr > F
Tiempo de vaporización	2	2714.422222	1357.211111	290.81	<.0001***
Error	87	406.033333	4.667050		
Total corregido	89	3120.455556			

*** Muestra diferencias altamente significativas

CV: 4.96

En análisis de varianza, indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas de la movilidad individual de los espermatozoides a efecto de los tiempos de vaporización de nitrógeno (Pr. < 0.05). El Coeficiente de Variación, 4.96 % indica que los datos obtenidos y analizados son confiables.

Figura 2. Comparación de medias de la movilidad individual de los espermatozoides



La Figura 2, comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$) de la movilidad espermática post descongelado, se evidencia que la vaporización por 15 minutos es estadísticamente diferente y superior (50.03 % motilidad) respecto a los demás tiempos de vaporización; la motilidad espermática post descongelado fue de 43.93 % y 36.60 para 10 y 5 minutos de vaporización con nitrógeno respectivamente.

Cabrera, Ayulo, Pantoja (2011), congelaron semen de carneros utilizando las pajillas sobre una rejilla metálica, a 2 cm de la superficie (5 °C) del tanque de nitrógeno líquido, generándose vapores de

nitrógeno líquido durante 2 minutos (-92 °C), y luego fueron sumergidas en nitrógeno líquido (-196 °C). La descongelación a 38 °C, por 15 segundos, evaluándose la motilidad individual progresiva del 62.0 y de 56.8 % para los dilutores Tris y Citrato, respectivamente. Respecto al trabajo realizado y los resultados obtenidos, la motilidad espermática es relativamente menor, esta diferencia podría atribuirse a las propiedades propias de los dilutores, el tiempo de equilibrio y las condiciones de manejo del semen desde la colección hasta la congelación.

Mex, López, & Mena (2009), utilizando triladyl como dilutor, realizaron el enfriamiento de las muestras de semen de carnero, de 37° C a 5° C en un lapso de 2 horas; luego envasaron el semen en pajillas de 0.25 ml, teniendo mucha precaución al momento de su manipulación, evitando que las muestras de semen suban a más de 5° C., seguidamente las pajillas se expusieron a los vapores de nitrógeno líquido, suspendidas horizontalmente sobre una rampa a 5 cm sobre la superficie del nitrógeno, los vapores de nitrógeno duraron 7 minutos, luego las pajillas se sumergieron dentro del nitrógeno líquido (-196° C), posteriormente se embalaron y se guardaron en un termo de nitrógeno líquido hasta su evaluación. La descongelación de las pajillas se efectuó a 37°C durante 30 segundos, a la evaluación se evidenció 60.12 % de motilidad espermática. Por lo que la motilidad encontrada en nuestro trabajo de investigación es inferior al reportado por los autores mencionados, pudiéndose atribuir al uso de los dilutores (comerciales), y los cuidados exhaustivos en el proceso de la dilución hasta la congelación.

4.3 Evaluación de la preñez en ovinos inseminados con semen fresco y congelado

La evaluación de la preñez, con semen fresco y congelado, mostro los siguientes datos:

Cuadro 4. Preñez en ovinos inseminados con semen fresco y congelado

Tipo de semen	Borregas sincronizadas	Borregas con manifestación de celo	% Celos	Borregas inseminadas	Borregas preñadas	% Preñez
IA semen fresco	22	18	81.82	18	7	38.89 ^a
IA semen congelado	13	10	76.92	10	1	10.00 ^a
Total	35	28	79.37	28	8	24.44

^a muestra la no asociación de la variable con el tipo de semen (ji cuadrado)

El Cuadro 4, muestra los resultados de preñez con semen fresco y semen congelado, en la que las borregas inseminadas con semen fresco alcanzaron un porcentaje de preñez de 38.89 %; mientras las borregas inseminadas con semen congelado, fue del 10 %.

De un total de 35 hembras, 28 entraron en celo, representando el 79.37 %, de este número, 18 hembras fueron destinados para la inseminación con semen fresco, y 10 para inseminar con semen congelado.

Hernández-Hernández, Martínez-González, Ibarra-Hinojosa, Briones-Encinia, & Saldaña-Campos (2014), realizaron la inseminación artificial intra cervical y por laparoscopia en ovinos con celo sincronizado, protocolo de sincronización (CIDR + P4 + Cloprostenol + 200 UI de eCG), utilizando semen fresco, reportando el porcentaje de gestación a primer servicio de 51.5 %, sin que se encontraran diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto a las ovejas que se inseminaron por laparoscopia quienes presentaron 55 % de gestación. En el presente trabajo de investigación se encontró 38.89 % de gestación, siendo inferior al reporte de los autores anteriores. Estas diferencias pudieran atribuirse

a las condiciones de manejo y alimentación con las cuales son criadas los ovinos en la comunidad Collpajawa del Municipio de Laja.

Pérez, Quispe, Malaga, Quispe, & Perez (2011), en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla) colectaron semen de 2 carneros de tres años de edad de la raza Criolla y congelaron en un dilutor modificado (leche, yema de huevo, fructosa y glicerol y antibióticos). Las inseminaciones fueron ejecutadas por los propios dueños de los rebaños en la época reproductiva en celo natural, posterior a un entrenamiento sobre la técnica de inseminación, donde lograron del 50.2 al 71.0 % de pariciones. Los resultados encontrados en el presente trabajo de investigación alcanzo al 10 %, este dato es menor a los reportados por los autores mencionados, pudiendo atribuirse estas diferencias a la época en la que se realizó el trabajo de investigación (agosto – septiembre). Si bien el protocolo de sincronización hizo que las borregas manifesten celo, pudiera ser que no se logró la ovulación esperada, lo que incidió en la fertilidad baja.

5. CONCLUSIONES

El mejor tiempo de vaporización controlada para lograr una motilidad y vitalidad espermática aceptables es a los 15 minutos, la cual consiste en que los primeros 5 minutos sin vapor de nitrógeno, los siguientes 5 minutos ingresándose aire a razón de 3 litros/minuto mediante el sistema de ingreso de la cámara criogénica generándose vapor de nitrógeno, finalmente durante los últimos 5 minutos ingresando aire a razón de 6 litros/minuto, hasta que finalmente las pajuelas de semen se sumergen en nitrógeno líquido y sean trasladadas a las canastillas del termo criogénico.

La congelación espermática a menor tiempo implica una velocidad de descenso de temperatura muy acelerada, siendo perjudicial para la motilidad y vitalidad espermática post descongelado.

La inseminación artificial con semen congelado en ovinos, no es la más apropiada para realizarla a nivel de campo bajo condiciones de manejo tradicional de los rebaños de ovinos, mucho más si se está fuera de su época reproductiva, posiblemente el sitio de deposición de semen (intravaginal) sea uno de los factores que afecta a la fertilidad por esta técnica reproductiva.

6. RECOMENDACIONES

Realizar trabajos de inseminación artificial con semen fresco y congelado, en época reproductiva en ganado ovino, aprovechando el celo natural. Lo que abarataría los costos de sincronización de celo, además de incrementar las tasas de fertilidad.

El bajo porcentaje de preñez logrado con inseminación artificial con semen congelado criopreservado, datos que se corroboran con otros estudios sobre el tema, muestra que es necesario realizar trabajos de inseminación con semen congelado utilizando otras técnicas de inseminación, como es la inseminación laparoscópica, para incrementar los porcentajes de preñes.

Proponer programas de inseminación artificial y monta controlada con carneros de diferentes razas, diversificando el sistema productivo del ganado ovino en el altiplano.

Finalmente se recomienda que las instituciones dependientes de los municipios, gobernaciones, estado y las universidades, deben implementar planes, programas y proyectos que apoyen a los productores de ovinos.

7. BIBLIOGRAFÍA

Cabrera, P., Ayulo, A., & Pantoja, C. (2011). Efecto del dilutor tris y citrato con yema de huevo de cordón sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 22(2), 105-113.

Camara, D R y Guerra, MMP. 2011. *Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática.* [En línea] 2011. [Citado el: 22 de Marzo de 2012.] <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n1/pag33-40.pdf>.

Cardozo A. y Rodriguez T. , 1989, "Situación actual de la producción ganadera en la zona andina" ; PROCAD- UNITAS, La Paz, Bolivia.

Castillo Cevallos, L. A., Páucar Espinoza, E., & Alvarado Malca, E. (2019). Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(4), 1637-1644.

Cáceres, 2013. *Evaluación espermática de semen de ovino por la técnica de gradiente de densidad.* Tesis. Lima, Perú.

Cueto, M. Garcia Vinent, J ;A. Wolff, (1993) . *Obtención procesamiento y conservación del semen del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción animal del INTA, Bariloche N° 200 pap. 34, Pagina web: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/07-manual_ia.pdf*

Clifton. G.1993. *Evaluación de las ovejas ionseminadas por vía intrauterina con semen congelado/descongelado de diferentes calidades.* Tesis. Balcarce, Argentina.

https://repositorio.inta.gob.ar/xmlui/bitstream/handle/20.500.12123/6922/INTA_CRPatagoniaSur_EEASantaCruz_Clifton_GR_Evaluaci%C3%B3n_de_la_fertilidad_de_ovejas_inseminadas.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Evans, G., Maxwell, W., & Illera del Portal, J. (1990). *Inseminación artificial de ovejas y cabras.* Acribia. Zaragoza.

Galina, Carlos y Valencia, Javier. 2009. *Reproducción de Animales Domésticos.* México: Limusa S.A., 2009. ISBN: 978-968-18-7132-1

Gadea, J. 2003. *Los diluyentes de inseminación artificial porcina. Revisión.* [En línea] *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2003. [Citado el: 3 de junio de 2012.] <http://www.agrodigital.com/upload/gadea%20sjar2003espa%C3%B1ol.pdf>

Gibbons, A., & Cueto, M. (1995). *Manual de inseminación artificial en la especie ovina.* INTA Bariloche.

Gómez Vargas, JC (2019). *Evaluación de espermatozoides criopreservados de ovinos de pelo en el trópico de Guerrero en el laprosem-UAGro (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma de Guerrero (México)).*

Hernández-Hernández, N., Martínez-González, J. C., Ibarra-Hinojosa, M. A., Briones-Encina, F., & Saldaña-Campos, P. (2014) *Eficiencia reproductiva en ovejas de lana inseminadas artificialmente por el método cervical e intrauterino con semen fresco.* Disponible en: [Ovejas_de_lana_inseminadas_](#)

artificialmente_por_el_metodo_cervical_e_intrauterino.pdf (d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net).

Herrera, E, Castro, L y Chacón, J. 2012. Evaluación del efecto del glicerol en el congelamiento de semen canino. [En línea] 2012. [Citado el: 15 de Marzo de 2013.] <http://revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/4681> . ISSN Impreso: 0250-5649.

Instituto Nacional de Estadística, Censo Agropecuario, 2013, p.72, https://www.sudamericarural.org/images/en_papel/archivos/CENSO-AGROPECUARIO-BOLIVIA_final.pdf

Illera, Mariano. 1994. Reproducción de los animales domésticos. Madrid: AEDOS, 1994. ISBN: 84-7003-339-5.

Laskutoff, Naida M; Rohr, Jennifer; Lomneth, Richard B.; Wood, David G.; Crichton, Elizabeth 2010. Semen Extender Composition and Methods for Manufacturing and Using . US 7,674,576 B2 United States, 09 de Marzo de 2010.

Mex, J. E., López, J. A., & Mena, C. S. (2009). Efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen congelado de ovinos de pelo. *Bioagrobiencias*, 2, 4-12.

Plan Desarrollo Territorial de Laja-2016.

Perez¹², M. G., Quispe¹², T. L., Malaga, J., Quispe, Y., & Perez, U. H. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CON SEMEN CONGELADO EN OVEJAS POR VÍA VAGINAL Y CERVICAL EN EL ALTIPLANO PERUANO.

Ramos Zarate, L., Rojas Pardo, A., & Martínez Flores, Z. (2017). Efecto de dilutores y tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino (*Ovis aries*). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 4(2), 63-71.

Ramos, L. 2017. Efecto de dilutores y tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino (*Ovis aries*). *La Paz*, vol.4, n°2, pág. 63-71, Diciembre 2017. ISSN: 2518-6868.

Rubio, Jorge L. 2009. Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. [En línea] Agosto de 2009. [Citado el: 19 de Enero de 2012.]. ISSN: 0798-2259.

Silva, G., & Vairo J. (2020), Implementación de Triple test espermático en semen ovino refrigerado en el trópico bajo.

Stornelli, MC; Tittarelli, CM ; Savignone, CA ; Stornelli, MA; 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. [En línea] 2005. [Citado el: 25 de Enero de 2012.]. ISSN 1514259-0.

U.H. Perez , M. Perez , E.A. Mellisho (2011) DE CONGELACION, T. Y. T. VIABILIDAD ESPERMÁTICA EN SEMEN DE CARNERO CONGELADO POR DOS METODOS. *Revista SPERMOVA* (2011) 1(1): 127-128, disponible en: *Revista SPERMOVA* (d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net)

Valdez J. D. 2013. Efecto del dodecil sulfato iónico adicionado a un diluyente libre de yema de huevo sobre la calidad del semen ovino congelado. Tesis. Cuenca, Ecuador. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=3359640&pid=S0188-88972

AneXos

Anexo 1. Socialización del convenio con los productores de ovinos del municipio de Laja, para la ejecución del proyecto de investigación.





Anexo 2. Firma del convenio para la ejecución del trabajo de investigación con las autoridades de la comunidad de Collpajawa y las autoridades del municipio de Laja.



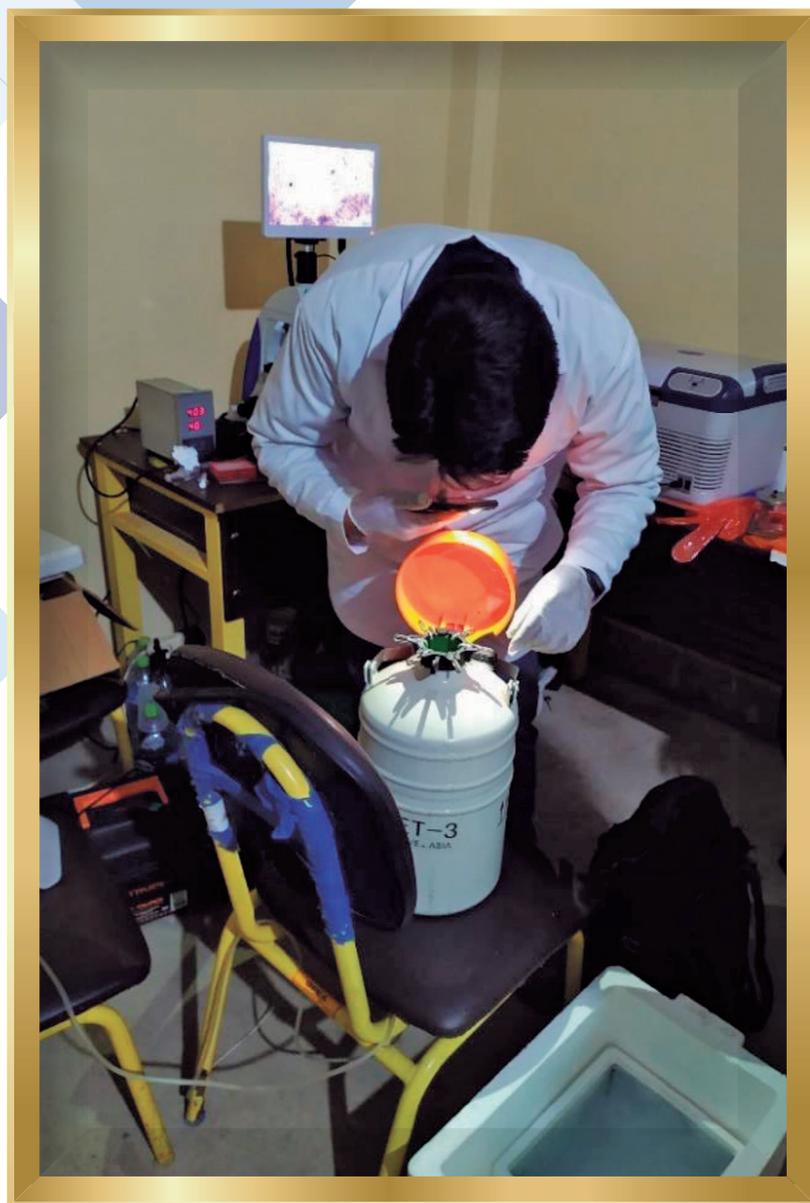
Anexo 3. Proceso de recolección del semen del reproductor ovino de la raza Hampshire Down.

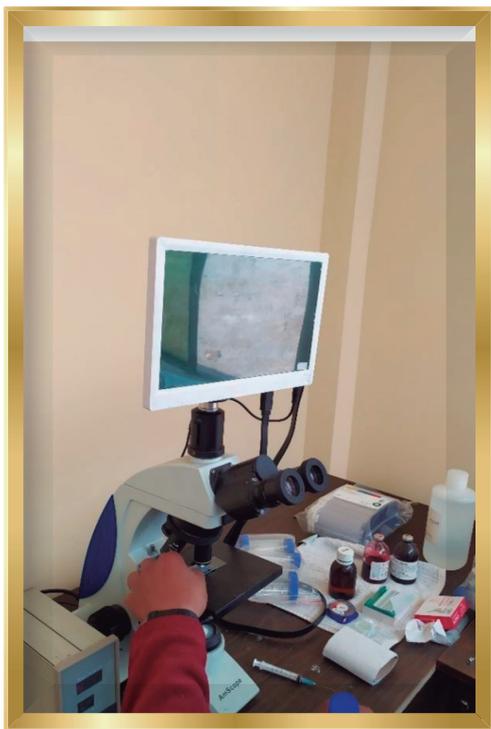


Anexo 4. Llenado de pajuelas con el semen de del reproductor ovino de la raza Hampshire Down, para su criopreservación.



Anexo 5. Proceso de congelación del semen del reproductor ovino de la raza Hampshire Down.





Anexo 7. Proceso de inseminación con semen criopreservado.

