

EFFECTO DE DILUTORES Y TIEMPOS DE EQUILIBRIO EN LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN OVINO (*Ovis aries*)

Effect of dilutors and times of equilibrium in the criopreservation of ovino semen (*Ovis aries*)

Lourdes Ramos Zarate¹; Abel Rojas Pardo²; Zenón Martínez Flores³

RESUMEN

La crianza y producción de ovinos en Bolivia es de importancia social y económica, la criopreservación y la inseminación artificial son técnicas reproductivas para el progreso genético. Sin embargo, la inseminación con semen congelado no es satisfactorio por la baja tasa de fertilidad, que puede ser prevenido con el uso de un dilutor adecuado. El objetivo de la investigación es evaluar y comparar el efecto de tres dilutores seminales en dos tiempos de equilibrio sobre la motilidad de espermatozoides ovinos para la criopreservación. El trabajo se desarrolló en el laboratorio de crioconservación de la Estación Experimental de Choqueñaíra, Universidad Mayor de San Andrés, el material biológico fue tres ovinos machos en edades reproductivas de 1.7, 2.7 y 4.5 años de la raza Corriedale, los dilutores utilizados fueron T-G-Y, TRILADYL y C-Y en los tiempos de equilibrio de cuatro y ocho horas. Se evaluó el efecto de la edad sobre las características macroscópicas, motilidad masal y espermática en el semen diluido y congelado, motilidad espermática al post-descongelamiento para dilutores y para tiempos de equilibrio. La motilidad masal fue de 55.55%, 38.89% y 5.55% para las escalas 5, 4 y 3 de Herman Swanson. Las edades no influenciaron en la motilidad individual, pero influyeron en el porcentaje de espermatozoides muertos con el 12.67%, 10.00% y 7.50% y porcentaje de espermatozoides anormales con 15.80%, 13.00% y 9.70% para las edades de 1.7, 4.5 y 2.7 años. La concentración de espermatozoides fue de 3.14×10^9 ml⁻¹, 3.12×10^9 ml⁻¹ y 2.86×10^9 ml⁻¹ y la motilidad espermática fue de 66.50, 66.33 y 64.50% para 2.7, 4.5 y 1.7 años, los dilutores mostraron una motilidad del 67.67% T-G-Y, 65.17% C-Y y 64.50% TRILADYL con influencia del 68.22% en cuatro horas y 63.33% en ocho horas de tiempos de equilibrio. La edad del ovino para obtener mejor calidad del semen es de 4.5 años y el dilutor T-G-Y es la mejor opción para obtener mayor motilidad espermática y prevenir daños en los espermatozoides durante su proceso de criopreservación, lográndose mayores tasas de fertilidad al momento de la inseminación artificial.

Palabras clave: *Ovis aries*, semen, dilutores, tiempos de equilibrio, criopreservación.

ABSTRACT

The breeding and production of sheep in Bolivia is important in social and economic aspects, cryopreservation and artificial insemination are reproductive techniques for genetic progress. However, insemination with frozen semen is not satisfactory because of the low fertility rate, which can be prevented with the use of an adequate dilutor. The objective of the research is to evaluate and compare the effect of three seminal diluters in two equilibrium times on ovum sperm motility for cryopreservation. The work was developed in the cryopreservation laboratory of the Experimental Station of Choqueñaíra, of the Major San Andrés University, the biological material was three male sheep in reproductive ages of 1.7, 2.7 and 4.5 years of the Corriedale breed. Used diluents were TGY, TRILADYL and CY at equilibrium times of four and eight hours. The effect of age on macroscopic characteristics, mass and sperm motility in the diluted and frozen semen, post-thaw sperm motility for diluents and for equilibrium times was evaluated. The mass motility was 55.55%, 38.89% and 5.55% for Scales 5, 4 and 3 of Herman Swanson. The ages did not influence the individual motility, but they influenced the percentage of dead sperm with 12.67%, 10.00% and 7.50% and percentage of abnormal sperm with 15.80%, 13.00% and 9.70% for the ages of 1.7, 4.5 and 2.7 years. The sperm concentration was 3.14×10^9 ml⁻¹, 3.12×10^9 ml⁻¹ and 2.86×10^9 ml⁻¹ and the sperm motility was 66.50%, 66.33% and 64.50% for 2.7, 4.5 and 1.7 years, the diluters showed a motility of 67.67 % TGY, 65.17% CY and 64.50% TRILADYL with influence of 68.22% in four hours and 63.33% in eight hours of equilibrium times. The age of the sheep to obtain better semen quality is 4.5 years and the TGY dilutor is the best option to obtain greater sperm motility and prevent sperm damage during its cryopreservation process, achieving higher fertility rates at the time of artificial insemination.

Keywords: *Ovis aries*, semen, dilutor, equilibrium times, cryopreservation.

¹ Docente, Instituto Tecnológico Charia, Ministerio de Educación, Bolivia. ramosz-lourdes@hotmail.com

² Coordinador, Alternativas Agropecuarias-ALTAGRO, Bolivia.

³ Docente Investigador, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.

INTRODUCCIÓN

La crianza y producción de ovinos (*Ovis aries*) en Bolivia es de importancia social y económica para numerosas familias campesinas, según el Censo Agropecuario (INE, 2013), la actividad ganadera de Bolivia se concentra en la producción de ganado bovino, ovino, porcino, caprino, camélido, equino y aves, siendo la producción de ovinos a nivel nacional de 6267743 cabezas, el mayor productor es el departamento de La Paz con 1799374 cabezas, seguido de Potosí con 1375349 cabezas, el menor productor es Pando con 2554 cabezas de este ganado. Actualmente existe alto interés económico en el ovino como fuente de carne y leche en el país, razón para impulsar la mejora genética ganadera ovina durante los próximos años.

En el ganado ovino, 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 (Aisen et al., 1995).

En este contexto, 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 (Aisen et al., 1995).

En consecuencia, el objetivo de la investigación fue evaluar y comparar el efecto de tres dilutores seminales en dos tiempos de equilibrio sobre la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos para la criopreservación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación de la zona de estudio

El trabajo se realizó en el laboratorio de crioconservación de la Estación Experimental de Choquenaira, dependiente de la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés (UMSA), situado en la provincia Ingavi, del departamento de La Paz. Se encuentra ubicado geográficamente entre los 16° 42' 5" de latitud sur y 68° 15' 15" de longitud oeste y una altitud de 3820 m s.n.m., a 32 km al sur-oeste de la ciudad de La Paz y a 6 km de la población de Viacha.

Metodología

El material biológico de estudio fueron tres ovinos machos en edad reproductiva de la raza Corriedale de edades de 1.7, 2.7 y 4.5 años respectivamente, su peso vivo fue entre 55 a 65 kg estos fueron seleccionados de acuerdo a su capacidad de servicio y su vigor sexual, determinado mediante la prueba de servicio, es decir, los que mostraron mayor interés por cubrir a una hembra en celo sujeta al brete.

Colección y evaluación del semen fresco

El semen fue colectado una vez por semana, empleando una vagina artificial de ovino, que simuló las condiciones naturales de temperatura y presión de las vías genitales en el momento del coito, lo que favoreció un eyaculado limpio.

Las muestras de semen fueron conservadas en baño María (Figura 1) a 37.5°C para su evaluación macroscópica (volumen, color y pH) y microscópica (motilidad masal, motilidad individual, porcentaje de espermatozoides vivos, muertos y concentración de espermatozoides).

Dilución del semen

Se prepararon los dilutores TRIS-GLUCOSA-YEMA (T-G-Y), TRILADYL y CITRATO-YEMA (C-Y) en tres probetas graduadas de 100 ml (Figura 1) en una proporción semen: diluyente de 1:8, las probetas fueron cubiertas con papel aluminio para el enfriamiento y procesamiento del semen.



Figura 1. Muestras de dilutores con semen.

Criopreservación

Fue por medio de los procesos de enfriamiento y congelamiento, el primero fue progresivo en la cámara de refrigeración con el descenso de la temperatura hasta llegar a 5°C, esto permitió el equilibrio de las células espermáticas con el dilutor, método recomendado por Hafez (1996), el segundo fue mediante la estabilización de la temperatura a 5°C durante los tiempos de equilibrio de cuatro y ocho horas, al término de este procedimiento las muestras fueron envasadas en pajillas.

Congelamiento

El método aplicado fue de Byrne et al. (2000), se congelaron nueve pajillas para cada tiempo de equilibrio y para cada dilutor sobre vapores de nitrógeno líquido colocándolas en una capa sobre la parrilla de congelamiento suspendida a una altura de 20 cm del nivel de nitrógeno sobre una caja de plastofomo, durante el proceso se disminuyó la temperatura de 5°C a -105°C almacenado durante 10 minutos (10°C por minuto) deslizándose poco a poco las pajuelas al contenido, hasta sumergirlas totalmente en el nitrógeno líquido.

Para el análisis de los valores resultantes del volumen (ml), pH, motilidad (%), anomalías (%), espermatozoides vivos y muertos (%) y concentración de espermatozoides, se aplicó el diseño completamente al azar, considerando para ello tres ovinos como tratamientos con seis repeticiones.

Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS, el modelo lineal aditivo para el citado diseño según Ochoa (2007) es la Ecuación 1.

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

Dónde: Y_{ij} = una observación cualquiera; μ = media poblacional; α_i = efecto del i -ésimo tratamiento de la edad del ovino ($i=3$: $1i = 1.7$ años; $2i = 2.7$ años; $3i = 4.5$ años); ε_{ij} = error experimental.

El porcentaje de motilidad espermática post-dilución fue evaluado mediante un diseño completamente al azar bi factorial, con seis repeticiones (Ochoa, 2007), considerando como variables de respuesta: a) motilidad individual, con estimación del porcentaje de motilidad progresiva de espermatozoides con movimiento lineal en los ovinos de las tres edades, b) motilidad individual, evaluado al término de 10 minutos con el objetivo de examinar la habilidad de cada diluyente (Ecuación 2).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (2)$$

Dónde: Y_{ijk} = una observación cualquiera; μ = media poblacional; α_i = efecto del i -ésimo nivel de la edad del ovino ($i=3$: $1i = 1.7$ años; $2i = 2.7$ años; $3i = 4.5$ años); β_j = efecto del j -ésimo nivel del dilutor ($j=3$: $1j = \text{TRILADYL}$; $2j = \text{T-G-Y}$; $3j = \text{C-Y}$); $\alpha\beta_{ij}$ = efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor de edades de los ovinos, con el j -ésimo nivel del factor del tipo de dilutor; ε_{ijk} = error experimental.

La motilidad espermática al descongelamiento fue evaluada considerando los tres dilutores y los dos tiempos de equilibrio, se aplicó el diseño bloques al azar con arreglo factorial (Ochoa, 2007), se aplicó la Ecuación 3.

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_k + \alpha_i + \gamma_j + \alpha\gamma_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (3)$$

Dónde: Y_{ijk} = una observación cualquiera, μ = media poblacional; β_k = efecto del k -ésimo bloque; α_i = efecto del i -ésimo nivel del dilutor ($j = 3$: $1j = \text{TRILADYL}$; $2j = \text{T-G-Y}$; $3j = \text{C-Y}$); γ_j = efecto del j -ésimo nivel de tiempo de equilibrio ($j = 2$: $1j = 4$ horas; $2j = 8$ horas); $\alpha\gamma_{ij}$ = efecto de la interacción del i -ésimo nivel del factor de edades de los ovinos, con j -ésimo nivel del factor del tipo de dilutor; ε_{ijk} = error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la edad en las características macroscópicas del semen ovino

El resultado del análisis de varianza indica que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) del volumen eyaculado en las edades de 1.7, 2.7 y 4.5 años, pero si existen diferencias significativas entre las edades y el pH del semen ovino. El promedio general del volumen eyaculado fue de 1.55 ml y el pH de 6.9, la desviación estándar para el volumen eyaculado fue de 0.13 ml y el pH de 0.044 (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la edad en las características macroscópicas del semen ovino.

Factor principal	Características macroscópicas	
	Volumen eyaculado (ml)	pH
Edad (años)	0.203 ns	0.0001*
Estadísticos generales		
n	6	6
$\bar{X} \pm S$	1.55 ± 0.13	6.9 ± 0.044
C.V. (%)	10.44	0.43
Rangos extremos	1.3 - 1.7	6.8 - 7.0

ns = no significativo; * = significativo; ml = mililitros; n = números de observaciones; \bar{X} = promedio general; S = desviación estándar; C.V.: = coeficiente de variación.

Volumen eyaculado

El volumen eyaculado para el ovino de 2.7 años fue de 1.7 ml, para el ovino de 4.5 años fue de 1.5 ml y para el ovino de 1.7 años fue de 1.4 ml, no existen diferencias significativas, posiblemente porque los ovinos se encontraban en una etapa de reproducción activa. Estos promedios de volumen de semen encontrados, están en los rangos obtenidos por Cosme (2005), que reporta un volumen eyaculado de 1.20 ml. Palacios (2005) encontró un volumen eyaculado de 1.25 ml para la raza Blackbelly de cuatro años de edad.

pH

La prueba de Duncan a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$ (Tabla 2), muestra que las medias de pH del semen ovino, pertenecen a grupos diferentes, el semen ovino con 1.7 años tiene pH de 7.0, el semen de los ovinos de 2.7 y 4.5 años, tienen pH de 6.9 y 6.8 respectivamente, esto se debe al efecto de la diferencia de edades, donde el semen de los ovinos

con mayor edad tiene mayor concentración de espermatozoides y en consecuencia mayor acidez.

Fraser et al. (1988), reportan valores de pH variantes entre 6.5 y 6.7 en ovinos de dos años de edad; Agraz (1989) obtuvo un pH comprendido entre 6.4 a 6.8 en ovinos de 2.5 años de edad. Estos autores indican que un semen de buena calidad, tiende a ser ligeramente ácido y que esta depende del número de células espermáticas, a mayor concentración de células se tiene mayor metabolismo y en consecuencia mayor producción de ácido láctico.

Tabla 2. Prueba de Duncan para el pH del semen por edad.

Edad (años)	Promedio	Signif.
1.7	7.0	a
2.7	6.9	b
4.5	6.8	c

Signif. = significancia; nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Color

Mediante la observación directa se tiene homogeneidad al color blanco-cremoso en el color del semen, características que coinciden con los resultados hallados por Pérez y Pérez (1985), ellos indican que el color debe ser entre blanquecino a blanco-cremosos y que esta puede variar ligeramente con la concentración.

Motilidad masal

La Tabla 3 muestra los valores porcentuales de motilidad masal, medidas en seis muestreos por ovino. La valoración de la motilidad masal varía entre tres y cinco, considerando la escala de Herman Swanson (1941), el ovino con 2.7 años obtuvo la valoración de cinco para el 83.33% y 50.00% para 4.5 años y 33.33% para el ovino más joven de 1.7 años.

Los resultados reportan que el mayor porcentaje promedio, correspondió al valor cinco con 55.55%; seguido por el valor cuatro y tres con 38.89% y 5.55% respectivamente. Estos valores coinciden con los encontrados por Palacios (2005), que muestra una motilidad masal de alto grado en la escala de Herman Swanson, entre cuatro y cinco, por la alta concentración espermática ovina.

Tabla 3. Motilidad Masal por edades según la escala Herman Swanson.

Edad (años)	Valoración		
	3	4	5
1.7	16.66%	50.00%	33.33%
2.7	0.00%	16.66%	83.33%
4.5	0.00%	50.00%	50.00%
Promedio	5.55%	38.89%	55.55%

El análisis estadístico muestra que no existieron diferencias significativas de la motilidad individual entre edades ($P>0.05$), pero se hallaron diferencias significativas entre las edades con relación a la concentración de espermatozoides vivos, muertos y anormales (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia de la edad en las características microscópicas del semen ovino.

Factor principal	Motilidad individual (%)	Características microscópicas			
		Concentración de espermatozoides (10^9 ml^{-1})	Vivos (%)	Espermatozoides Muertos (%)	Anormales (%)
Edad (años)	0.090 ns	0.009 *	0.015 *	0.015 *	0.0001 *
Estadísticos generales					
n	6	6	6	6	6
$\bar{X} \pm S$	80.83 \pm 3.13	3.04 \pm 0.15	89.94 \pm 2.66	10.05 \pm 2.66	12.61 \pm 0.44
C.V. (%)	3.96	4.93	2.96	26.54	9.03
Rangos extremos	78.33 - 85.00	2.80 - 3.22	84.00 - 95.00	5.00 - 16.00	8.00 - 17.67

Motilidad espermática individual

Los resultados obtenidos indican que el ovino de 2.7 años de edad tuvo una motilidad espermática de 82.75%, el ovino de 4.5 años obtuvo una motilidad del 80.22% y la motilidad espermática del ovino de 1.7 años fue de 79.90%, al respecto Palacios (2005), considera que una buena motilidad espermática es a partir de 90%.

Concentración de espermatozoides

La concentración de semen fue mayor para el ovino de 2.7 años con $3.14 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ en comparación a los ovinos de 4.5 y 1.7 años con valores de $3.12 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ y $2.86 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$ respectivamente (Tabla 5). Las variaciones encontradas en la concentración, se pueden atribuir a la edad reproductiva de los ovinos, puesto que la concentración aumenta con la edad y tamaño del animal (Salisbury et al., 1982).

Tabla 5. Prueba de Duncan de la concentración de espermatozoides por edad.

Edad (años)	Promedio ($\times 10^9 \text{ ml}^{-1}$)	Signif.
2.7	3.14	a
4.5	3.12	a
1.7	2.86	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Porcentaje de espermatozoides vivos

La prueba de Duncan (Tabla 6) establece que el ovino de 1.7 años presentó menor porcentaje de espermatozoides vivos con 87.33% frente al ovino de 2.7 años con 92.50%. Estos resultados pueden asociarse al eyaculado de espermatozoides maduros, que evitan dañar a las moléculas y membranas celulares, como resultado se obtiene mayor cantidad de espermatozoides viables en los ovinos. Palacios (2005) considera que los porcentajes óptimos de espermatozoides entre 91.20% y 92.50%.

Tabla 6. Prueba de Duncan para espermatozoides vivos por edad.

Edad (años)	Promedio (%)	Signif.
2.7	92.50	a
4.5	90.00	a b
1.7	87.33	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Porcentaje de espermatozoides muertos

El ovino de 1.7 años tiene mayor porcentaje de espermatozoides muertos con 12.67%, seguido de los ovinos de 4.5 y 2.7 años con 10.00% y 7.50% respectivamente (Tabla 7), esto se debe a que el semen ovino que es muy sensible a los cambios de temperatura que afecta la supervivencia de los espermatozoides, las temperaturas comprendidas

entre $\geq 45^{\circ}\text{C}$ y $\leq 10^{\circ}\text{C}$ matan a los espermatozoides (Figura 2). Al respecto, el porcentaje de espermatozoides muertos encontrados fue menor al 20% reportado por Derivaux (1982).

Tabla 7. Prueba de Duncan para espermatozoides muertos por edad.

Edad (años)	Promedio (%)	Signif.
1.7	12.67	a
4.5	10.00	a b
2.7	7.50	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.



Figura 2. Espermatozoides muertos.

Porcentaje de espermatozoides anormales

Los ovinos de 1.7 años tuvieron mayor porcentaje de anomalías (Figura 3) con 15.80%, el ovino de 4.5 años con 13.00% y el ovino de 2.7 años con 9.70% (Tabla 8), estas diferencias se atribuyen a las edades, las anomalías halladas fueron cabezas sueltas,

colas solas, colas dobladas y colas en gancho, que según Fraser et al. (1988), Derivaux (1982) y Arroyo (1998) son clasificadas como secundarias.

Tabla 8. Prueba de Duncan para anomalías espermáticas por edad.

Edad (años)	Promedio (%)	Signif.
1.7	15.80	a
4.5	13.00	b
2.7	9.70	c

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.



Figura 3. Espermatozoide anormal.

Motilidad espermática en el semen diluido

El análisis de varianza de la relación de la motilidad espermática en el semen diluido no tiene diferencias significativas con las edades y la interacción entre las edades y dilutores ($P > 0.05$), pero sí se observan efectos altamente significativos con el tipo de dilutor (Tabla 9).

Tabla 9. Motilidad espermática post-dilución.

Factor principal	Motilidad individual (%)		
Edades (años)		0.0796	ns
Dilutores		0.0001	*
Interacción entre las edades y dilutores		0.8409	ns
Estadísticos generales			
n	6	6	6
$\bar{X} \pm S$	73.56 \pm 3.33	77.22 \pm 4.94	75.33 \pm 5.57
C.V. (%)		6.3	
Rangos extremos		65.0 - 82.0	

Los mejores resultados se encontraron con el dilutor T-G-Y con 79.89% de motilidad progresiva, los dilutores TRILADYL y C-Y obtuvieron 74.33% y 71.89% de motilidad espermática (Tabla 10). En la mayoría de los tratamientos, se observó una disminución en la

motilidad entre el momento de la obtención del semen y de agregar el diluyente a 35°C , esto se atribuye al efecto del dilutor (Maxwell y Johnson, 1999) ya que los espermatozoides responden a la dilución con un aumento inicial de la actividad metabólica seguido por

una pérdida de la motilidad y un aumento en el daño de membrana (Johnson et al., 2000).

Tabla 10. Prueba de Duncan para motilidad espermática en el semen diluido.

Dilutores	Promedio (%)	Signif.
T-G-Y	79.89	a
TRILADYL	74.33	b
C-Y	71.89	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Tabla 11. Motilidad espermática para dos tiempos de equilibrio a 5°C.

Factor principal	Motilidad individual (%)		
Bloques (edad)		0.0019	*
Dilutores		0.0001	*
Tiempos de equilibrio		0.0001	*
Interacción del dilutor con el tiempo de equilibrio		0.1000	ns
Estadísticos generales			
n	6	6	6
$\bar{X} \pm S$	64.00 \pm 1.87	66.50 \pm 2.74	66.33 \pm 2.20
C.V. (%)		1.16	
Rangos extremos		58.0 - 70.0	

Motilidad espermática para bloques (ovinos)

La Tabla 12 muestra el porcentaje de motilidad espermática de los espermatozoides expuestos a dos tiempos de equilibrio, la motilidad espermática fue de 66.50% para el ovino de 2.7 años, 66.33% para el de 4.5 años y 64.00% para el ovino de 1.7 años. Los resultados fueron obtenidos a una temperatura de 5°C, se puede afirmar que esta diferencia se debe a la edad, debido a que las glándulas sexuales accesorias no se desarrollaron por completo, afectando la viabilidad y motilidad del espermatozoide (Corteel, 1980).

Tabla 12. Prueba de Duncan para motilidad espermática por edad.

Edad (años)	Promedio (%)	Signif.
2.7	66.50	a
4.5	66.33	a
1.7	64.00	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Motilidad espermática para dilutores

La prueba de Duncan para el dilutor T-G-Y tiene una motilidad espermática del 67.67% mayor al promedio de C-Y y TRILADYL que obtuvieron una motilidad espermática del 65.17% y 64.50% respectivamente (Tabla 13).

Motilidad espermática del semen refrigerado

Existen diferencias significativas ($P < 0.05$) para los bloques, dilutores y tiempos de equilibrio, mientras que la interacción del dilutor con el tiempo de equilibrio no mostró diferencias (Tablas 11).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que la variación se debe a los diferentes tipos de dilutores utilizados y a las características iniciales de semen fresco colectados, así como también al manejo del eyaculado y las técnicas de análisis que se utilizan para que la muestra presente un mejor comportamiento en la refrigeración de semen o posiblemente por el efecto protector del dilutor, que mejora las características de motilidad individual.

Tabla 13. Prueba de Duncan para motilidad espermática por dilutores.

Dilutores	Promedio (%)	Signif.
T-G-Y	67.67	a
C-Y	65.17	b
TRILADYL	64.50	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Motilidad espermática para tiempos de equilibrio

Los resultados expresan una disminución gradual en el porcentaje de motilidad espermática a medida que transcurre el tiempo de equilibrio, se encontró en promedio 68.22% y 63.33% para cuatro y ocho horas de equilibrio (Tabla 14). Estos resultados son superiores a los hallados por Cosme (2005), que indica 50.00% y 60.00% de motilidad progresiva, a un tiempo de equilibrio de tres horas, usando un diluyente no convencional de suero fetal bovino o aloe vera, después del enfriamiento.

Tabla 14. Prueba de Duncan para motilidad espermática para dos tiempos de equilibrio.

Tiempos de equilibrio (horas)	Promedio (%)	Signif.
4	68.22	a
8	63.33	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Motilidad espermática post-descongelamiento para dilutores

La prueba de Duncan (Tabla 15) muestra que el dilutor T-G-Y es el más eficiente por su mayor porcentaje de motilidad de 51.17%, superior al promedio de TRILADYL y C-Y que obtuvieron 44.17% y 40.83% respectivamente.

Tabla 15. Prueba de Duncan para motilidad espermática post-descongelamiento para dilutores.

Dilutores	Promedio (%)	Signif.
T-G-Y	51.17	a
TRILADYL	44.17	b
C-Y	40.83	c

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Motilidad espermática post-descongelamiento para tiempos de equilibrio

La motilidad espermática post-descongelamiento para cuatro horas de tiempo de equilibrio es de 47.22%, superior a 43.56% para ocho horas (Tabla 16), la reducida motilidad obtenida a las ocho horas de equilibrio, se atribuye al envejecimiento de los espermatozoides, a mayor tiempo de equilibrio, los espermatozoides disminuyen su metabolismo (Cortes et al., 1995).

Tabla 16. Prueba de Duncan para motilidad espermática post-descongelamiento para dos tiempos de equilibrio.

Tiempos de equilibrio (horas)	Promedio (%)	Signif.
4	47.22	a
8	43.56	b

Nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Los valores obtenidos fueron superiores a los hallados por Cosme (2005), de 38.84 % de motilidad progresiva para los tratamiento con base en agua de coco y su combinación con suero fetal bovino a tres horas de equilibrio.

CONCLUSIONES

La edad en ovinos no influye en el volumen de semen eyaculado, en la motilidad espermática del semen post-descongelado. Se encontró que a la edad mayor de 4.5 años el porcentaje de espermatozoides vivos es mayor, con menor porcentaje de espermatozoides anormales, mientras que a menor edad de 1.7 años se tiene menor porcentaje de espermatozoides vivos con mayor porcentaje de anormalidades. La concentración de espermatozoides entre las edades de 4.5 y 2.7 años, con menor concentración para la edad de 1.7 años. En ese sentido la edad del ovino para obtener mejor calidad del semen es de 4.5 años.

Los dilutores tuvieron una influencia significativa en la motilidad progresiva, durante los procesos de dilución del semen fresco, igualmente, la motilidad espermática estuvo influenciada significativamente por los tiempos de equilibrio.

El mejor tiempo de equilibrio es de cuatro horas con el dilutor T-G-Y que mostró mayor porcentaje de motilidad espermática en el semen diluido, por dilutores y post-descongelamiento en comparación con los dilutores TRILADYL y C-Y, en ese sentido el dilutor T-G-Y es la mejor opción para prevenir daños en los espermatozoides durante su proceso de criopreservación, lográndose mayores tasas de fertilidad al momento de realizar la inseminación artificial.

BIBLIOGRAFÍA

- Aisén, E., Álvarez, H., Venturina, A. 1995. Efecto comparativo de diluyoconservadores de diferente composición y tonicidad sobre la criopreservación del semen ovino. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal*. v. 10. n. 3. 223-231.
- Agraz, A. 1989. *Caprinotecnia*. 2da Edición. México. pp 46.
- Arroyo, O. 1998. *Producción de caprinos*. 1ra. Edición. Madrid, España. pp 46.
- Byrne, G., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J., Boland, M. 2000. Effect of freezing

rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*. v. 62. n. 4. 265-275.

Cortes, S., Montero, A., Tome, A., Vásquez, I. 1995. Viabilidad espermática de semen ovino durante 48 horas. VI Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza. España. pp. 422-424.

Corteel, J. 1980. Estés du plasma seminal sur la survie et la fertilité des spermatozoides conservés *in vitro*. *Reproduction Nutrition Développement*. v. 20. n. 4. 1111-1123.

Cosme, R. 2005. Agua de coco (*Cocus nucifera*), suero fetal bovino, aloe vera y sus combinaciones para la criopreservación de semen ovino. Tesis de Maestría. Chihuahua, México. Universidad Autónoma de Chihuahua. 65 pp.

Derivaux, J. 1982 Fisiología de la reproducción de los animales domésticos. Editorial Madrid. España. pp. 69-70.

Fraser, R., Huss, D., Irigoin, M., Ramos, F. 1988. Manual de auto-instrucción en producción de cabras FAO Oficina Regional para América Latina y El Caribe, Programa de Cooperación técnica. Santiago, Chile.

Hafez, E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en rumiantes. 6ta Edición. Edit. McGraw-Hill. p. 80-83.

Herman, A., Swanson, E. 1941. Variations in dairy bull semen with respect to its use in artificial insemination. Columbia, MO: University of Missouri Agriculture Experiment Station. Research Bulletin, n. 325. 78 p.

INE (Instituto Nacional de Estadística). 2013. Censo Agropecuario. La Paz, Bolivia. 215 p.

Johnson, L., Varner, D., Roberts, M., Smith, T., Keillor, G., Scrutchfield, W. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science*. v. 60-61. 471-480.

Maxwell, W., Johnson, L. 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: influence of seminal plasma. *Theriogenology*. v. 52. n. 8. 1353-1362.

Ochoa, T. 2007. Diseños experimentales. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia. 154 p.

Palacios, M. 2005. Evaluación del agua de coco (*Cocus nucifera*), *opuntia spp*, leche y sus combinaciones para la criopreservación del semen ovino. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México. 72 pp.

Perez, A y Pérez F. 1985. Reproducción animal: inseminación artificial y trasplante de embriones. Edit., Científico Médica. Barcelona, España. pp. 105-108.

Salisbury, G., Demark, V., Lodge, J. 1982. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial Edit. Acribia. Zaragoza, España. pp 33-35.

Artículo recibido en: 29 de agosto 2017

Aceptado en: 18 de septiembre 2017