

## Preñez en ovejas Dohne Merino por inseminación artificial con dos dilutores y tiempos de refrigeración

Pregnancy in Dohne merino sheeps for artificial insemination with two diluters and refrigeration times

<sup>1</sup>Miguel Guillén Portugal

### RESUMEN

En la Estación Experimental Agraria Illpa, propiedad del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), se evaluó la preñez resultante de la inseminación artificial (IA) cervical con semen ovino, diluido y refrigerado a 5 °C con dos tipos de dilutores A (Tris) y B (Triladyl) a 0, 24 y 48 horas en una dilución de 1:2 (semen/dilutor), y con dosis de 250 x 10<sup>6</sup> millones de espermatozoides por inseminación. Asimismo, se determinó las características seminales antes de cada inseminación. Ciento diecisiete ovejas primíparas y múltíparas de la raza Dohne Merino fueron separados al azar en tres grupos de 39 individuos cada uno, a su vez por cada horario establecido (0, 24 y 48 horas) se utilizó 13 animales. Todas fueron inseminadas de la siguiente manera: T1: semen fresco sin diluir (solo a 13 animales, ya que la mortalidad espermática era total a las 9 horas), T2: semen diluido en Triladyl (39 animales) y T3: semen diluido en Tris (39 animales). Los resultados de preñez y características seminales fueron analizados mediante la prueba de Chi-cuadrada y Tuckey, respectivamente. La preñez a 24 horas fue B= 69.2 % (9/13) y con dilutor A= 46.2 % (6/13). La preñez a 48 horas fue de B= 30.8 % (4/13) y A= 46.2 % (6/13). Los resultados evidenciaron que la preñez se ve afectada por el dilutor y tiempo de refrigeración a 5 °C, mediante inseminación artificial con dosis de 250 millones de espermatozoides.

**Palabras clave:** Inseminación, motilidad, oveja, temperatura, viabilidad.

### ABSTRACT

In the Agricultural Experimental Station "ILLPA", property of the National Institute of Agrarian Research (INIA), the pregnancy resulting from cervical artificial insemination (AI) with sheep semen, diluted and refrigerated at 5°C was evaluated with two types of diluents A (Tris) and B (Triladyl) at 0, 24 and 48 hours, in a dilution of 1:2 (semen / dilutor), and doses of 250 x 10<sup>6</sup> million sperm by insemination. Likewise, the seminal characteristics were determined before each insemination. One hundred and seventeen primiparous and multiparous sheep of the Dohne Merino breed were randomly separated into three groups of 39 individuals each. Moreover, 13 animals were used for each established schedule (0, 24 and 48 hours). Each sheep was inseminated, as follows: T1: undiluted fresh semen (only 13 animals, since sperm mortality was total at 9 o'clock), T2: semen diluted in Triladyl (39 animals) and T3: semen diluted in Tris (39 animals). The results of pregnancy and seminal characteristics were analyzed by the Chi-square test and Tuckey, respectively. The pregnancy at 24 hours was B = 69.2% (9/13) and with dilutor A = 46.2% (6/13); and the pregnancy at 48 hours was B = 30.8% (4/13) and A = 46.2% (6/13). The results showed that the pregnancy was affected by the dilutor and cooling time at 5°C, by artificial insemination with doses of 250 million sperm.

**Keywords:** Viability, temperature, insemination, motility, sheep.

<sup>1</sup>Maestrante en Producción Animal y Reproducción Animal. Programa de Pós - Graduação em Zootecnia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Estado de Paraná-Brasil. E-mail: miguelguillenportugalvet@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es un método importante en la producción ganadera, que permite difundir en la descendencia buenas características fenotípicas y genotípicas de un macho reproductor.

Las ovejas son poliéstricas estacionales. El ciclo estral es determinado por la estación del año y es influenciado por el fotoperiodo corto (otoño, invierno) (Gibbons, Cueto y García, 2007). En la región sur, el porcentaje de parición anual en ovinos fue de 41.4 % en el año 2013, alcanzando la mayor actividad reproductiva en los meses de mayo – julio (MINAGRI, 2013).

Durante estos meses, los carneros utilizados como reproductores se ven sometidos a periodos de intensa actividad física, tolerando movimientos a diferentes predios y otras condiciones de estrés (transporte, cambios de ambiente y alimentación, etc.). Por otro lado, existen riesgos físicos y sanitarios, que afectan la calidad seminal y ocasionan un bajo poder fecundante (Olivera, Gil, Gamarra y Fierro, 2011). Además, se pierde gran cantidad de espermatozoides en la monta natural, ya que la carga espermática excede la cantidad necesaria de espermios que se requiere para que la hembra quede preñada. Inclusive el carnero, en cada cubrición disminuye la cantidad del eyaculado y concentración espermática, provocando la reducción del porcentaje de fertilidad (Sepulveda, 2012). Desde que se iniciaron los primeros experimentos de la I.A. en ovinos, se utilizó semen fresco con resultados satisfactorios. Sin embargo, se comenzó a utilizar dilutores que, aparte de proteger el semen sin alterar sus características, aumentaron la dosis por inseminación, logrando abarcar una mayor cantidad de hembras por majada e incrementar la viabilidad de los espermatozoides a bajas temperaturas (5 °C) (Aisen, 2009b).

Dado el avance del uso de los dilutores, se realizaron estudios para evaluar, analizar, seleccionar y conservar las mejores características del material espermático, haciendo uso de diferentes parámetros evaluativos (motilidad individual progresiva, concentración espermática, integridad de membrana y vitalidad espermática), asegurando su calidad para la inseminación.

Con base a lo descrito, el presente trabajo tuvo como finalidad determinar la preñez comparando dos dilutores, uno comercial (Triladyl) y otro elaborado por medios caseros (Tris), realizando la

inseminación en distintos horarios (24 y 48 horas), donde se evaluaron las características seminales a bajas temperaturas.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Estación Experimental Agraria Illpa – INIA, ubicada en el distrito de Paucarcolla de la provincia de Puno, Región Puno. A 15°40'37" latitud sur y 70°04'38" longitud oeste, a una altitud promedio de 3 815 m, donde la temperatura fluctúa entre 1.60 a 16.30 °C; con una media anual de 7 °C (CONCYTEC, 2007).

### Materiales

#### a. Material biológico

Se utilizó 117 ovejas y 1 carnero de la raza Dohne Merino, además de 1 macho vasectomizado (retajo). Los ovinos fueron debidamente desparasitados con ivermectina al 1 % (IBOMECL.A. ®), aplicada subcutáneamente (1 ml/animal).

Adicionalmente, se dosificó vía oral con albendazol al 12.5 %.

#### b. Material empleado para la colecta de semen

- Bolsitas de plástico en forma de cono para tubo colector.
- Tubo de metal para ovinos con escotilla de presión.
- Elásticos de jebe.
- Tubos Falcon (15 ml).
- Fundas de látex.
- Termo.
- Toalla para mantener la temperatura de vagina artificial.
- Cinta masking tape.
- Plumones de tinta indeleble.

#### c. Material de laboratorio

- Vórtex.
- Termómetro.
- Microscopio óptico.
- Platina calefactable.
- Láminas portaobjetos y cubreobjetos.
- Micropipeta graduada.
- Tubos de ensayo.
- Vaso de precipitado.
- Cámara Neubauer.

- Jeringas hipodérmicas # 21, 23.
- Jeringa tuberculina (1 ml).
- Calentador.
- Hervidor eléctrico.
- Refrigeradora.
- Equipo de proctoscopia (proctoscopio y fuente de luz).
- Fundas de inseminación tipo pico de pato.
- Papel toalla.
- Estufa.

### Dilutores

Se usó el dilutor Tris y Triladyl.

#### a. Tris

- Tris (hydroxymethyl aminomethano).
- Fructosa.
- Ácido cítrico 1-hidrato.
- Gentamicina-Estreptomycin.
- Yema de huevo.
- Agua bidestilada.

#### b. Triladyl

- Tris (hydroxymethyl aminomethano).
- Agua bidestilada.
- Glicerol.
- Ácido cítrico.
- Fructosa.
- Por cada 100 ml, se añadió los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomisina 15 mg. Los reactivos utilizados en la tinción eosina-nigrosina fueron:
- Eosina (soluble en agua).
- Nigrosina (soluble en agua).
- Tricitrato de sodio.
- Agua bidestilada.

### Método

- Por cada 100 ml, se añadió los siguientes antibióticos: tilosina 5 mg, gentamicina 25 mg, espectinomicina 30 mg y lincomisina 15 mg. Los reactivos utilizados en la tinción eosina-nigrosina fueron:

El método descrito respetó el código de ética aprobado para el uso de animales en experimentos científicos. En ese sentido, se seleccionaron 39 ovejas por cada tratamiento (T1, T2 y T3), las

mismas fueron repartidas a su vez en grupos de 13 animales por cada horario (0, 24 y 48 horas).

• **Tratamiento 1 (T1):** Fue el grupo control (semen fresco sin diluir). Se inseminó a las 0 horas y solo a 13 ovejas de las 39, ya que hubo una mortalidad total de la muestra seminal a las 9 horas post colecta.

• **Tratamiento 2 (T2):** En este grupo se usó el dilutor Tris, inseminando 39 ovejas, las que fueron divididas en 3 horarios (0, 24 y 48 horas). Fueron utilizados 13 animales por cada horario.

• **Tratamiento 3 (T3):** El semen fue diluido con el dilutor comercial Triladyl, inseminando 39 ovejas en celo, las cuales se distribuyeron en grupos de 13 por cada horario (0, 24 y 48 horas).

### Preparación de los dilutores

La preparación del dilutor Tris se realizó en forma mecánica con ayuda de una balanza digital previamente calibrada, y en el caso del dilutor Triladyl se realizó según las especificaciones del laboratorio (Minitube, 2010).

#### d. Diluyente TRIS

Para 10 ml de dilutor:

- Tris buffer 0.36 g
- Ácido cítrico 0.19 g
- Fructosa 0.50 g
- Yema de huevo 14 %
- Gentamicina 0.1 ml
- Agua bidestilada 7 ml

#### e. Diluyente TRILADYL

Para 10 ml de dilutor:

- Dilutor Triladyl 1 porción
- Yema de huevo 1 porción
- Agua bidestilada 3 porciones

Se diluye por unos minutos en el vórtex homogenizando la dilución.

### Colección de semen

Se utilizó una hembra en celo para estimular la libido y la monta del carnero. El semen se colectó mediante la vagina artificial, ajustada a una temperatura de 55-60 °C y buena presión para el característico “golpe de riñón”.

### Dilución de semen

La dilución de semen se realizó en relación 1:2 (semen/dilutor) (Da Silva Maia, 2014). Se hizo de manera rápida para evitar el shock térmico. El dilutor, previamente preparado, fue puesto en un termo a baño maría a una temperatura de 37 °C aproximadamente. Luego del eyaculado, fue extraído con una jeringa y añadido por la pared del tubo colector de acuerdo con el volumen de semen.

### Evaluación microscópica del semen a las 0, 24 y 48 horas

#### Motilidad individual progresiva

Se calculó con un valor subjetivo mayor a 4 (con escala de 0 – 6).

Tabla 1. Calidad de movimientos: Tipos

| ESCALA | OBSERVACIÓN (DESCRIPCIÓN)   |
|--------|---|
| 1      | Espermatozoides sin movimiento  |
| 2      | Espermatozoides con movimiento pobre. Las cabezas de los espermatozoides quedan fijas y solo se mueven las colas, pudiendo girar sobre sí mismos. Espermatozoides sin movimiento. |
| 3      | Espermatozoides con desplazamiento en círculos y algunos progresivos.   |
| 4      | Movimientos progresivos sinuosos.   |
| 5      | Movimientos progresivos rápidos.  |
| 6      | Movimientos progresivos muy rápidos.  |

Fuente: Manual práctico para profesionales – Biotecnología reproductiva – Inseminación artificial porcina (2007)

### Concentración espermática

Se determinó mediante una fórmula validada (Hafez, 2000) el promedio del conteo de 5 cuadros que están ubicados en el centro de las dos retículas (superior/inferior) en la cámara de Neubauer, se multiplicó por 10 000 y después por el volumen de la dilución.

#### Concentración

= prom. x 10 000 = núm. de espermios por ml

#### Recuento espermático

= conc. x vol. de dilución= núm. total de esp. en eyaculado

### Evaluación de vitalidad espermática

Se colocó una gota de semen en una lámina portaobjeto y otra gota de coloración supravital eosina-nigrosina sobre la primera (Da Silva Maia, 2014). En un ángulo de 45°, se deslizó la muestra con otra lámina portaobjetos, procurando que la tinción sea uniforme y de película fina en toda la lámina. Se realizó el recuento de 200 espermatozoides, diferenciando vivos y muertos.

### Evaluación de integridad de membrana espermática (Hypoosmotic swelling Test)

En un tubo de ensayo, se colocó 900 µl de solución hiposmótica y 0.1 ml de semen a una temperatura de 37 °C por 1 hora para que ocurra la reacción (hinchazón de la cola); seguidamente, se le agregó 900 µl de formol para detener la reacción (Aisen, 2009a). Se extrajo una gota que fue colocada en una lámina portaobjetos y visualizada en el microscopio óptico; se cuentan 100 espermatozoides.

### Refrigeración de semen

La refrigeración se realizó en el tubo colector, descendiendo de una temperatura ambiente de 35 °C a 25-30 °C, y posteriormente se bajó gradualmente en un refrigerador a 5 °C (Gibbons et al., 2007).

La dosis por inseminación se realizó de la siguiente manera:

$$\# \text{ Ovejas a I.A.} = \frac{\text{Conc. esp.} \times \text{esp.vivos} \times \text{esp.normales}}{250\ 000\ 000}$$

$$\text{Dosis/I.A.} = \frac{\text{Vol.total}}{\# \text{ de ovejas}}$$

### Inseminación artificial

Para realizar la inseminación artificial, se apartó a las hembras en celo marcadas en la grupa por el retajo. Con ayuda de un operario, se suspendió a la

hembra en forma adecuada. Una vez en posición, se limpió la vulva con papel toalla y se introdujo el proctoscopio en la vagina en un ángulo de 45°. Seguidamente, se adaptó la fuente de luz para la visualización de la cervix y se introdujo la funda de inseminación con el semen ya cargado dentro de esta, procurando pasar la mayor cantidad de anillos cervicales (inseminación artificial vía cervical) depositando el semen en su interior.

### Determinación de fertilidad mediante ecografía a los 40 días

Se utilizó un ecógrafo modelo ALOKA (5 mhz) vía transrectal para el diagnóstico de preñez a los 40 días post-inseminación, en este periodo el diagnóstico de gestación tiene una certeza muy alta (95 – 100 %).

### Análisis estadístico

Los resultados de fertilidad y características seminales fueron analizados mediante la prueba de Chi-cuadrada en el programa SPSS V.19 y la prueba de Tuckey en el programa SAS (Statistical Analysis System) V.1999, respectivamente.

## RESULTADOS

Tabla 2. Porcentaje de concentración espermática según dilutor y hora

| Dilutor  | Hora de análisis | N  | ml±SD  | C.V     |
|----------|------------------|----|--|---------|
| Tris     | 0                | 10 | 3 700 X 10 <sup>6</sup> ± 767 028 900 <sup>a</sup>   | 28.92 % |
| Triladyl | 0                | 10 | 3 863 X 10 <sup>6</sup> ± 1 117 259 047 <sup>a</sup> | 20.73 % |

En la Tabla 2 se observa que la concentración espermática de la muestra seminal, es de 3 863 x 10<sup>6</sup> para el dilutor Triladyl y 3.7 x 10<sup>6</sup> para el dilutor Tris, no existe diferencia estadística entre ambos dilutores (p>0.05).

Tabla 3. Porcentaje de motilidad individual progresiva, según dilutor y hora

| Dilutor  | Hora de análisis | N  | Prom. %                | CV %  |
|----------|------------------|----|------------------------|-------|
| Tris     | 0                | 10 | 5.20±0.79 <sup>a</sup> | 15.17 |
|          | 24               | 10 | 3.60±0.99 <sup>b</sup> | 27.62 |
|          | 48               | 10 | 2.55±1.12 <sup>b</sup> | 43.80 |
| Triladyl | 0                | 10 | 5.40±0.52 <sup>a</sup> | 9.56  |
|          | 24               | 10 | 3.70±0.48 <sup>b</sup> | 13.06 |
|          | 48               | 10 | 2.80±0.48 <sup>c</sup> | 17.25 |

Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna, indican que hay diferencia significativa (p<0.05)

En la Tabla 3 se observa que la motilidad individual progresiva (MIP) con dilutor Tris yema de huevo descende por acción del tiempo de refrigeración. Donde a las 0 horas, se obtuvo el mayor porcentaje de MIP (5.20 %) a comparación del semen refrigerado a las 48 horas con un porcentaje de 2.55 %. El análisis estadístico indica que el factor tiempo de refrigeración ejerce una influencia significativa entre estos dos horarios (p<0.01). Resultados similares se obtuvieron con el dilutor Triladyl a las 0, 24 y 48 horas donde la motilidad individual progresiva descende en un mayor porcentaje a las 48 horas (2.80 %) respecto a las 24 horas de refrigeración (3.70 %) (p<0.01).

Tabla 4. Porcentaje de integridad de membrana por prueba de HOST, según dilutor y hora

| Dilutor  | Hora de análisis | Promedio %                | CV %  | Mínimo / Máximo |
|----------|------------------|---------------------------|-------|-----------------|
| Tris     | 0                | 71.50 ± 3.95 <sup>a</sup> | 5.53  | 65.00 77.00     |
|          | 24               | 60.80 ± 7.00 <sup>b</sup> | 11.52 | 52.00 70.00     |
|          | 48               | 50.78 ± 4.89 <sup>c</sup> | 9.64  | 45.00 60.00     |
| Triladyl | 0                | 72.80 ± 5.59 <sup>a</sup> | 7.68  | 64.00 82.00     |
|          | 24               | 60.40 ± 9.72 <sup>b</sup> | 16.09 | 43.00 75.00     |
|          | 48               | 37.80 ± 8.68 <sup>c</sup> | 22.95 | 23.00 52.00     |

En la Tabla 4 se observa que el porcentaje de integridad de membrana, según la prueba de HOST, tuvo una reacción positiva decreciente a las 0, 24 y 48 con el dilutor Tris siendo de 71.50 %, 60.80 % y 50.78 %, respectivamente. El análisis estadístico indica que el factor tiempo de refrigeración tiene influencia significativa sobre el porcentaje de integridad de membrana ( $p < 0.01$ ), siendo a las 0 horas de análisis donde se observó el mayor porcentaje de integridad de membrana. Resultados similares se obtuvieron con el dilutor Triladyl a las 0, 24 y 48 horas con 72.80 %, 60.40% y 37.80%, respectivamente; donde se evidencia que el tiempo de refrigeración a las 48 horas muestra el valor más bajo en comparación a las 24 horas de refrigeración ( $p < 0.01$ ).

Tabla 5. Porcentaje de vitalidad espermática, según dilutor y hora

| Dilutor  | Hora de análisis | N  | Promedio %                | CV %  | Mínimo |
|----------|------------------|----|---------------------------|-------|--------|
| Tris     | 0                | 10 | 64.25 ± 3.45 <sup>a</sup> | 5.37  | 59.62  |
|          | 24               | 10 | 53.45 ± 5.59 <sup>b</sup> | 10.46 | 39.42  |
|          | 48               | 10 | 45.84 ± 4.11 <sup>c</sup> | 8.98  | 39.00  |
| Triladyl | 0                | 10 | 65.11 ± 2.89 <sup>a</sup> | 4.44  | 60.00  |
|          | 24               | 10 | 56.52 ± 2.65 <sup>b</sup> | 4.69  | 53.85  |
|          | 48               | 10 | 37.23 ± 5.93 <sup>c</sup> | 15.92 | 25.74  |

La Tabla 5 muestra que la prueba de tinción supravital (eosina-nigrosina) en la vitalidad espermática, utilizando el dilutor elaborado a base de Tris-yema evaluado a las 0 horas, presenta el mayor porcentaje de espermatozoides vivos (64.25 %) en comparación con el semen refrigerado a las 24 (53.45 %) y 48 horas (45.84 %), es decir, existe una influencia significativa del tiempo de refrigeración ( $p < 0.01$ ). Un resultado similar se ha obtenido utilizando el dilutor comercial Triladyl; sin embargo, con este último, el porcentaje de vitalidad a las 48 horas de refrigeración fue mucho menor en comparación al dilutor Tris.

## Porcentaje de preñez

Tabla 6. Diagnóstico de preñez con semen fresco, Tris y Triladyl a las 0 horas

|                      |                      | Preñadas      | Vacías        | Total        |
|----------------------|----------------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>FRESCO 0 H.</b>   | Frecuencia observada | 10            | 3             | 13           |
|                      | Frecuencia esperada  | 8.5           | 4.5           | 13.0         |
|                      | <b>% de FERT.</b>    | <b>76.9 %</b> | <b>23.1 %</b> | <b>100 %</b> |
| <b>TRIS 0 H.</b>     | Frecuencia observada | 7             | 6             | 13           |
|                      | Frecuencia esperada  | 8.5           | 4.5           | 13.0         |
|                      | <b>% de FERT.</b>    | <b>53.8 %</b> | <b>46.2 %</b> | <b>100 %</b> |
| <b>TRILADYL 0 H.</b> | Frecuencia observada | 9             | 4             | 13           |
|                      | Frecuencia esperada  | 9.5           | 3.5           | 13.0         |
|                      | <b>% de FERT.</b>    | <b>69.2 %</b> | <b>30.8 %</b> | <b>100 %</b> |

En la Tabla 6 se observan los resultados del diagnóstico de preñez a los 40 días post inseminación artificial. A las 0 horas, con semen fresco, dilutor Tris y dilutor Triladyl, se observa un porcentaje de 76.9 %, 53.8 % y 69.2 %, respectivamente. La prueba de Chi-cuadrada, indica que no hay asociación estadística entre el porcentaje de preñez y los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Entonces, se puede entender que al añadir el dilutor Tris o dilutor Triladyl a un eyaculado e inseminar artificialmente por vía cervical a las 0 horas no incrementa significativamente el porcentaje de preñez en comparación con semen fresco sin diluir, al realizar el mismo método biotecnológico.

Tabla 7. Diagnóstico de preñez con semen diluido en Tris y Triladyl a las 0 horas

|                  |                      | Preñadas      | Vacías        | Total        |
|------------------|----------------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>TRIS 0 H.</b> | Frecuencia observada | 7             | 6             | 13           |
|                  | Frecuencia esperada  | 8.0           | 5.0           | 13.0         |
|                  | <b>% de FERT.</b>    | <b>53.8 %</b> | <b>46.2 %</b> | <b>100 %</b> |

|              |                      |                     |               |               |              |
|--------------|----------------------|---------------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>TRILA</b> | Frecuencia observada | 9                   | 4             | 13            |              |
|              | <b>DYL</b>           | Frecuencia esperada | 8.0           | 5.0           | 13.0         |
|              |                      | <b>% de FERT.</b>   | <b>69.2 %</b> | <b>30.8 %</b> | <b>100 %</b> |
| <b>TOTAL</b> | Frecuencia observada | 16                  | 10            | 26            |              |
|              | Frecuencia esperada  | 16.0                | 10.0          | 26.0          |              |
|              | <b>% de FERT.</b>    | <b>61.5 %</b>       | <b>38.5 %</b> | <b>100 %</b>  |              |

La Tabla 7 indica que los porcentajes de preñez obtenidos con el dilutor Tris yema de huevo y el dilutor comercial Triladyl, realizando inseminación artificial inmediatamente después de la dilución en las muestras colectadas a las 0 horas, fueron 53.8 % y 69.2 %, respectivamente. El análisis de Chi-cuadrado indica que no hay asociación estadística entre el porcentaje de preñez y los tratamientos.

Tabla 8. *Diagnóstico de preñez con semen diluido en Tris y Triladyl a las 24 horas*

|              |                      | Preñadas            | Vacías        | Total         |              |
|--------------|----------------------|---------------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>TRIS</b>  | Frecuencia observada | 6                   | 7             | 13            |              |
|              | <b>24 H.</b>         | Frecuencia esperada | 7.5           | 5.5           | 13.0         |
|              |                      | <b>% de FERT.</b>   | <b>46.2 %</b> | <b>53.8 %</b> | <b>100 %</b> |
| <b>TRILA</b> | Frecuencia observada | 9                   | 4             | 13            |              |
|              | <b>DYL</b>           | Frecuencia esperada | 7.5           | 5.5           | 13.0         |
|              |                      | <b>% de FERT.</b>   | <b>69.2 %</b> | <b>30.8 %</b> | <b>100 %</b> |
| <b>TOTAL</b> | Frecuencia observada | 15                  | 11            | 26            |              |
|              | Frecuencia esperada  | 15.0                | 11.0          | 26.0          |              |
|              | <b>% de FERT.</b>    | <b>57.7 %</b>       | <b>42.3 %</b> | <b>100 %</b>  |              |

La Tabla 8 indica, respectivamente, un 46.2 % y 69.2 % de preñez usando los dilutores Tris y Triladyl a la misma hora de refrigeración. El análisis de Chi-cuadrado indica que no hay asociación entre el porcentaje de preñez y los tratamientos utilizados.

Tabla 9. *Diagnóstico de preñez con semen diluido en Tris y Triladyl a las 48 horas*

|              |                      | Preñadas            | Vacías        | Total          |                |
|--------------|----------------------|---------------------|---------------|----------------|----------------|
| <b>TRIS</b>  | Frecuencia observada | 6                   | 7             | 13             |                |
|              | <b>48 H.</b>         | Frecuencia esperada | 5.0           | 8.0            | 13.0           |
|              |                      | <b>% de FERT.</b>   | <b>46.2 %</b> | <b>53.8 %</b>  | <b>100.0 %</b> |
| <b>TRILA</b> | Frecuencia observada | 4                   | 9             | 13             |                |
|              | <b>DYL</b>           | Frecuencia esperada | 5.0           | 8.0            | 13.0           |
|              |                      | <b>% de FERT.</b>   | <b>30.8 %</b> | <b>69.2 %</b>  | <b>100.0 %</b> |
| <b>TOTAL</b> | Frecuencia observada | 10                  | 16            | 26             |                |
|              | Frecuencia esperada  | 10.0                | 16.0          | 26.0           |                |
|              | <b>% de FERT.</b>    | <b>38.5 %</b>       | <b>61.5 %</b> | <b>100.0 %</b> |                |

La Tabla 9 revela un 46.2 % y 30.8 % de preñez a los 40 días post inseminación artificial con semen diluido con Tris yema de huevo y Triladyl a las 48 horas de refrigeración. El análisis de Chi-cuadrado indica que no hay asociación estadística entre la tasa de preñez y los horarios de refrigeración ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el grupo control con semen fresco sin diluir fue de 76.9 %; siendo superior a resultados de preñez hallados por Naim, Cueto y Gibbons (2004), con porcentajes de 58-65 %. Según Milczewski, Kozicki, Luz y Neves (2000), la reducción como el aumento de la  $T^{\circ}$  y la manipulación de semen promueven una disminución en la motilidad y daños estructurales bioquímicos y funcionales en los espermatozoides. Esto quedó confirmado al observar que las características seminales (MIP, HOST y vitalidad) descienden y se comportan de manera similar con ambos dilutores a 24 horas de refrigeración. Al mismo horario, la tasa de preñez con dilutor Tris es de 46.2 %, siendo superior a los resultados encontrados por Menchaca, Pinczak y Queirolo (2005) con 34.5 %. Tal descenso es ratificado por Evans y Maxwell (1990), quienes señalan que, durante el proceso de refrigeración, la fertilidad disminuye entre 10 % a 35 % por día de almacenamiento. Por otro lado, la tasa de preñez con dilutor comercial Triladyl no se ve

afectada a pesar del descenso de la calidad seminal; y esto posiblemente gracias al glicerol presente en su medio, que funciona como un protector eficiente hasta las 24 horas. A las 48 horas de refrigeración, se observa una caída altamente significativa tanto en la preñez (30.8 %) como en sus características evaluadas. Según Gao (1992), el proceso de congelación rápida y descongelación lenta implicaría daños causados por la formación de pequeños cristales de hielo, los cuales se pueden agrupar formando cristales grandes, que rompen la membrana espermática, esto también fue confirmado por Fahy Lilley, Linsdell y Douglas (1990), que indican, el efecto protector del glicerol de las membranas del espermatozoide durante la criopreservación, y su efecto tóxico sobre ellas.

## CONCLUSIONES

El dilutor y tiempo de refrigeración influyen en el porcentaje de fertilidad en ovejas Dohne Merino. Los dilutores Tris y Triladyl tienen diferentes efectos sobre las características seminales a 24 y 48 horas de conservación.

La utilización del semen hasta las 48 horas de refrigeración con dilutor Tris, tiene buenos índices de preñez.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisen, E. (2009a). *Reproducción ovina y caprina*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Inter-Médica.
- Aisen, E. (2009b). *Reproducción ovina y caprina, exploración clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Inter-Médica.
- CONCYTEC. (2007). CIT Illpa Estación Experimental Illpa - Puno.
- Da Silva Maia, M. (2014). Tecnología de semen e inseminación artificial em caprinos. *Acta Veterinaria Brasílica* 8 (suppl. 2), 389–95.
- Evans G. y Maxwell W. (1990). *Inseminación artificial en ovejas y cabras*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Fahy, G., Lilley, T., Linsdell, H. y Douglas, J. (1990). Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction. In search of molecular mechanisms. *Cryobiology*, 27(3), 247–68. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2199153>
- Gao, D. (1992). Glycerol permeability of human spermatozoa and its activation-energy. *Cryobiology*, 29(6), 657–67. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1478095>
- Gibbons, A., Cueto, M. y García, J. (2007). *Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino*. INTA - Bariloche.
- Hafez, E. (2000). *Reproducción e inseminación artificial de animales*. México: Interamericana - McGraw Hill.
- Menchaca, A., Pinczak, A. y Queirolo, D. (2005). Storage of ram semen at 5 °C : Effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim Reprod*, 2 (3), 195-198. Recuperado de <http://animal-reproduction.org/article/5b5a6088f7783717068b47fb>
- Milczewski, V., Kozicki, L., Luz, S. y Neves, P. (2000). Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. *Archives of veterinary science*, 5 (1), 35–39. Recuperado de <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/3883>
- MINAGRI. (2013). *Cadena productiva de ovinos*. Recuperado de [http://agroaldia.mina.gri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/agroeconomia\\_ovino.pdf](http://agroaldia.mina.gri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/agroeconomia/agroeconomia_ovino.pdf)
- Minitube. (2010). Manual Triladyl® diluyente de semen bovino. Minitube 49(0), 0–3. Recuperado de <http://www.perulactea.com/wpcontent/uploads/2012/09/DILUYENTE-DE-SEMEN-BOVINO-TRILADYL.pdf>
- Naim, P., Cueto, M. y Gibbons, A. (2004). Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Archivos de zootecnia*, 58 (223), 435-440. Recuperado de <https://docplayer.es/17794389-Inseminacion-artificial-a-tiempo-fijo-con-semen-ovino-refrigerado.html>
- Olivera, J., Gil, A., Gamarra, J. y Fierro, S. (2011). *Preservación seminal y su uso en programas de inseminación artificial a tiempo fijo en ovinos*. Seminario Internacional de Ovinos, Paysandú - Uruguay.
- Sepulveda, N. (2012). *Inseminación artificial en ovinos*. XVI congreso Venezolano de producción e industria animal. XVI Congreso. Venezuela.