

	GESTIÓN DE RECURSOS Y SERVICIOS BIBLIOTECARIOS	Código	FO-SB- 12/v0
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN	Página	1/1

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES):

NOMBRE(S): JHON VAIRO APELLIDOS: GALLO SILVA

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA PECUARIA

DIRECTOR:

NOMBRE(S): LEONARDO APELLIDOS: HERNANDEZ CORREDOR

CODIRECTOR:

NOMBRE(S): _____ APELLIDOS: _____

TÍTULO DEL TRABAJO (TESIS): IMPLEMENTACION DEL TRIPLE TEST ESPERMÁTICO EN SEMEN OVINO REFRIGERADO EN EL TROPICO BAJO

RESUMEN

Este proyecto trata acerca de la implementación del triple test espermático en semen ovino refrigerado en el trópico bajo. Para ello, se realizó una investigación tipo experimental, donde se evaluaron las tres pruebas (estado del acrosoma, test hiposmotico y vitalidad). A su vez se implementó la metodología llamada triple test que consiste en una medida adimensional. La recolección de información se obtuvo mediante los ensayos de campo y laboratorio; ya que se comprobó la hipótesis con base en la medición numérica y de análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento. La población, corresponde a la finca 7 colores que cuenta con una población de 400 hembras ovinas mestizas y 16 reproductores. El muestreo, esta conformado por 4 machos Dorper bajo el mismo régimen de alimentación (pasto fresco ad libitum, heno y concentrado). Se logró, implementar el triple test seminal (Vitalidad, Test Hiposmótico e Integridad del acrosoma) en la valoración del semen ovino refrigerado en diferentes horas de almacenamiento (0 horas, 24 horas y 48 horas). Se determinó, la vitalidad espermática en semen ovino refrigerado mediante la técnica de tinción espermática Eosina Nigrosina. Seguidamente, se evaluó la integridad funcional de la membrana plasmática en semen ovino refrigerado mediante la prueba de endósmosis (HOST). Posteriormente, se valoró la integridad estructural del espermatozoide en semen ovino refrigerado mediante la técnica de tinción espermática Diff Quick. Finalmente, se correlacionaron los valores del triple test (Vitalidad, HOST, NAR) con la motilidad espermática en semen ovino fresco almacenado durante 48 horas.

PALABRAS CLAVE: triple test, tropico bajo, semen ovino, eosina nigrosina

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 69 **PLANOS:** _____ **ILUSTRACIONES:** _____ **CD ROOM:** 1

Elaboró		Revisó		Aprobó	
Equipo Operativo del Proceso		Comité de Calidad		Comité de Calidad	
Fecha	24/10/2014	Fecha	05/12/2014	Fecha	05/12/2014

COPIA NO CONTROLADA

IMPLEMENTACION DEL TRIPLE TEST ESPERMÁTICO EN SEMEN OVINO
REFRIGERADO EN EL TROPICO BAJO

JHON VAIRO GALLO SILVA

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA PECUARIA
SAN JOSE DE CUCUTA

2020

IMPLEMENTACION DEL TRIPLE TEST ESPERMÁTICO EN SEMEN OVINO
REFRIGERADO EN EL TROPICO BAJO

JHON VAIRO GALLO SILVA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniero Pecuario

Director:

LEONARDO HERNANDEZ CORREDOR, Ph.D.

Ingeniero de Producción Animal-Médico Veterinario

UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PLAN DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA PECUARIA
SAN JOSE DE CUCUTA

2020

**ACTA DE SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO
MODALIDAD INVESTIGACIÓN**

FECHA: 28 de abril de 2020

HORA: 14:00 p.m.

LUGAR: Sesión virtual (Videoconferencia por plataforma Google meet)

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA PECUARIA

TITULO DEL TRABAJO DE GRADO: "IMPLEMENTACIÓN DEL TRIPLE TEST
ESPERMÁTICO EN SEMEN OVINO REFRIGERADO EN EL TROPICO BAJO"

JURADOS: GIOVANNI MAURICIO BÁEZ SANDOVAL
JORGE ALEXANDER RUBIO PARADA
RUBEN DARIO CARREÑO CORREA

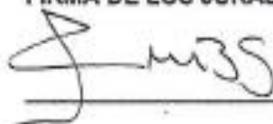
DIRECTOR: LEONARDO HERNÁNDEZ CORREDOR

NOMBRE DEL ESTUDIANTE	CÓDIGO	CALIFICACIÓN
JHON VAIRO GALLO SILVA	1630454	4.2

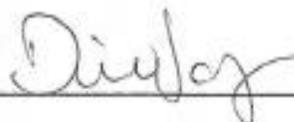
OBSERVACIONES:

APROBADO

FIRMA DE LOS JURADOS:

VoBo. Coordinador Comité Curricular





**CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES PARA
LA CONSULTA, LA REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y LA PUBLICACIÓN
ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO**

Cúcuta,

Señores
BIBLIOTECA EDUARDO COTE LAMUS
Ciudad

Cordial saludo:

JHON VAIRO GALLO SILVA, identificado con la C.C. N° 1090498858, autor(es) de la tesis o trabajo de grado titulado **IMPLEMENTACION DEL TRIPLE TEST ESPERMÁTICO EN SEMEN OVINO REFRIGERADO EN EL TROPICO BAJO**. Presentado y aprobado en el año 2020 como requisito para optar al título de Ingeniero pecuario; autorizo a la biblioteca de la Universidad Francisco de Paula Santander, Eduardo Cote Lamus, para que con fines académicos, muestre a la comunidad en general a la producción intelectual de esta institución educativa, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo de grado en la página web de la Biblioteca Eduardo Cote Lamus y en las redes de información del país y el exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Francisco de Paula Santander.
- Permita la consulta, la reproducción, a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato CD-ROM o digital desde Internet, Intranet etc.; y en general para cualquier formato conocido o por conocer.

Lo anterior, de conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la ley 1982 y el artículo 11 de la decisión andina 351 de 1993, que establece que **“los derechos morales del trabajo son propiedad de los autores”**, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

JHON GALLO; 1090498858
FIRMA Y CEDULA

Dedicatoria

El presente trabajo de investigación es dedicado a Dios, por ser el motivador y compañero de este proceso.

A mis padres, que son el motor en mi vida, gracias por tanto amor, paciencia y sacrificio, Para cumplir mis sueños.

A todas aquellas personas que siempre me apoyaron, que estuvieron en momentos buenos y no tan buenos.

Agradecimientos

Agradecerle al Dr. Leonardo Hernández Corredor, que confió en mí desde el primer momento y fue guía importante en el trabajo realizado para culminar este trabajo. A los docentes que me brindaron todo su conocimiento durante todos estos años transcurridos.

Quiero agradecer a mi familia que son pilar importante en mi vida, mis padres, mis hermanos y mi novia gracias por todos sus consejos de vida , por tanta lucha y colaboración, en especial a mi hermano mayor que me ha abierto las puertas en todo momento.

Quiero agradecer a la Universidad Francisco de Paula Santander, por la disposición de los equipos y uso del laboratorio y al programa de Ingeniería Pecuaria por mostrarme el camino de la investigación y la ciencia

Contenido

	pág.
Introducción	15
1. Problema	17
1.1 Título	17
1.2 Planteamiento del Problema	17
1.3 Formulación del Problema	18
1.4 Objetivos	18
1.4.1 Objetivo general	18
1.4.2 Objetivos específicos	18
1.5 Justificación	19
2. Marco Referencial	21
2.1 Antecedentes	21
2.1.1 Antecedentes bibliográficos	21
2.1.1.1 Nacionales	21
2.1.1.2 Internacionales	22
2.2 Marco Teórico	25
2.2.1 Valoración de la calidad espermática	25
2.2.2 Pruebas de funcionalidad espermática	25
2.2.2.1 Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos	27
2.2.2.2 Test de endósmosis (HOST)	29
2.2.2.3 Estado del Acrosoma	30
2.3 Marco Conceptual	32
2.4 Marco Contextual	35

2.5 Marco Legal	37
3. Diseño Metodológico	38
3.1 Tipo de Investigación	38
3.2 Población y Muestra	38
3.2.1 Población	38
3.2.2 Muestra	38
3.2.3 Valoración del triple test	39
3.2.4 Modelo estadístico	44
4. Resultados	45
4.1 Vitalidad	45
4.2 Test Hiposmótico (HOST)	46
4.3 Evaluación de la Integridad del Acrosoma (NAR)	48
4.4 Triple Test	48
4.5 Porcentaje de Motilidad	50
4.6 Correlación Lineal	51
5. Discusión	52
6. Conclusiones	56
7. Recomendaciones	58
Referencias Bibliográficas	59
Anexos	65

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. (Tinción de eosina-nigrosina en espermatozoides de toros) Espermatozoide sin coloración (vivo); Espermatozoide con coloración (muerto)	28
Figura 2. Esquema de la morfología del espermatozoide mediante el test hiposmotico	29
Figura 3. Ubicación geográfica del municipio de Los Patios; Norte de Santander; Republica de Colombia	36
Figura 4. Vagina artificial Walmur®	40
Figura 5. Diluyente Andromed®	40
Figura 6. NAR, Capuchón Apical Normal; Espermatozoide con el acrosoma intacto Tinción Spermac®	43

Lista de Tablas

	pág.
Tabla 1. Variable de vitalidad de espermatozoides (en porcentaje) a las diferentes horas en la investigación	45
Tabla 2. Índice de pérdidas de la vitalidad de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación.	46
Tabla 3. Evaluación del Test Hiposmotico (HOST) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación manejar un solo dialogo, usa palabras diferentes a la figura	47
Tabla 4. Índice de pérdidas de funcionalidad de la membrana (HOST) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación	47
Tabla 5. Variable de la evaluación del estado del acrosoma (NAR) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación	48
Tabla 6. Variable de la evaluación del Triple Test (TT) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación	49
Tabla 7. Índice de Perdidas de valores de la evaluación del Triple Test (TT) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación	49
Tabla 8. Porcentaje de motilidad de los espermatozoides a las diferentes horas en la investigación	50
Tabla 9. Correlación entre la variable de la evaluación del Triple Test (TT) y la motilidad de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación	51

Lista de Anexos

	pág.
Anexo 1. Registro fotográfico	66

Resumen

Este proyecto trata acerca de la implementación del triple test espermático en semen ovino refrigerado en el trópico bajo. Para ello, se realizó una investigación tipo experimental, donde se evaluaron las tres pruebas (estado del acrosoma, test hiposmótico y vitalidad). A su vez se implementó la metodología llamada triple test que consiste en una medida adimensional. La recolección de información se obtuvo mediante los ensayos de campo y laboratorio; ya que se comprobó la hipótesis con base en la medición numérica y de análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento. La población, corresponde a la finca 7 colores que cuenta con una población de 400 hembras ovinas mestizas y 16 reproductores. El muestreo, está conformado por 4 machos Dorper bajo el mismo régimen de alimentación (pasto fresco ad libitum, heno y concentrado). Se logró, implementar el triple test seminal (Vitalidad, Test Hiposmótico e Integridad del acrosoma) en la valoración del semen ovino refrigerado en diferentes horas de almacenamiento (0 horas, 24 horas y 48 horas). Se determinó, la vitalidad espermática en semen ovino refrigerado mediante la técnica de tinción espermática Eosina Nigrosina. Seguidamente, se evaluó la integridad funcional de la membrana plasmática en semen ovino refrigerado mediante la prueba de endósmosis (HOST). Posteriormente, se valoró la integridad estructural del espermatozoide en semen ovino refrigerado mediante la técnica de tinción espermática Diff Quick. Finalmente, se correlacionaron los valores del triple test (Vitalidad, HOST, NAR) con la motilidad espermática en semen ovino fresco almacenado durante 48 horas.

Abstract

This project deals with the implementation of the triple sperm test in refrigerated sheep semen in the low tropics. For this, an experimental type investigation was carried out, where the three tests (acrosome status, hyposmotic test and vitality) were evaluated. In turn, the methodology called triple test was implemented, which consists of a dimensionless measurement. Information collection was obtained through field and laboratory tests; since the hypothesis was verified based on numerical measurement and statistical analysis, to establish behavior patterns. The population, corresponds to the farm 7 colors that has a population of 400 female mestizo sheep and 16 breeders. The sampling is made up of 4 Dorper males under the same feeding regime (fresh grass ad libitum, hay and concentrate). It was possible to implement the triple seminal test (Vitality, Hyposmotic Test and Integrity of the acrosome) in the evaluation of refrigerated sheep semen at different storage hours (0 hours, 24 hours and 48 hours). Sperm vitality was determined in refrigerated sheep semen using the Eosina Nigrosina sperm staining technique. Next, the functional integrity of the plasma membrane in refrigerated sheep semen was evaluated using the endosmosis test (HOST). Subsequently, the structural integrity of the sperm was evaluated in refrigerated sheep semen using the Diff Quick sperm staining technique. Finally, the triple test values (Vitality, HOST, NAR) were correlated with sperm motility in fresh sheep semen stored for 48 hours.

Introducción

La inseminación artificial (IA) es una técnica que tiene como fin potencializar el mejoramiento genético en la creciente industria ovina de Colombia (Carrillo & Hernández, 2016). Por esta razón La calidad seminal es un factor muy importante en el ámbito productivo y reproductivo, es por lo que se debe garantizar un excelente material seminal para obtener un producto óptimo para el proceso biotecnológico (dilución, refrigeración y conservación). El uso de semen congelado ovino 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 a nivel internacional. Su utilización permite así mismo 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. Por último, conservar la variabilidad genética de aquéllas que se ven sujetas a un continuo proceso de mejoramiento de sus características productivas, al permitir el almacenamiento de semen fértil sin limitaciones de tiempo (Rubio; 2017; Sepúlveda; 2018).

La aplicación de la IA implica un desarrollo mediante el uso de la técnica en ovinos, como tal uno de los objetivos es tener una extensión hacia el campo; con el fin enseñar las técnicas como procesamiento y conservación de semen. (Grajales, Tovia & Duica, 2011) en Colombia los materiales para pruebas de laboratorio son de alto costo, debido a las políticas de importación declaradas por el Departamento de Impuestos y Aduanas Nacional (DIAN), las pruebas de laboratorio en el área de reproducción animal económicas pueden ser una ayuda para evaluar el estado funcional de los espermatozoides, destinados a los procesos de mejoramiento animal, parámetros como la vitalidad espermática y el estado de la célula espermática en cuanto a la

forma y el daño o no de sus membranas, puede ser una técnica, sencilla y de fácil valoración, en los centros de andrología animal.

Un problema en la evaluación de los parámetros de calidad seminal en función de la cinemática espermática y demás variables funcionales del semen ovino es que no se ha encontrado un patrón para las producciones ubicadas en el trópico (Rubio, 2017).

Por tanto, una solución a toda esta problemática se puede dar mediante el uso de unas técnicas a realizar que nos pueden dar resultados óptimos de una manera sencilla y económica, llamado triple test espermático que consiste en hacer tres pruebas que irán ligados unos a otros.

La utilización de estas tres pruebas espermáticas: vitalidad, estado del acrosoma y test hiposmótico; se vienen aplicando por separado, en las pruebas seminales de los diferentes centros de andrología a nivel mundial, la idea del proyecto es hacer una valoración de estas técnicas juntas y sus mostrar sus resultados en el estudio In Vitro en semen ovino refrigerado.

1. Problema

1.1 Título

IMPLEMENTACION DEL TRIPLE TEST ESPERMÁTICO EN SEMEN OVINO REFRIGERADO EN EL TROPICO BAJO.

1.2 Planteamiento del Problema

En la producción animal, la evaluación de machos destinados a la reproducción, debe ser una labor constante, por lo que se debe evaluar la calidad seminal desde el punto de vista morfológico (para determinar su forma), motil (determinar su velocidad), funcional (que sean células que sirvan), fisiológico (espermatozoides en perfecto estado) y bioquímico, entre otro. Muchos laboratorios al no contar con los medios adecuados para estas evaluaciones por costos, acceso a equipos de laboratorio o por desconocimiento de las técnicas, no se realiza este tipo de protocolos, dando una subjetividad a las evaluaciones seminales, donde solo tienen en cuenta la motilidad masal y la individual.

La dificultad está en las diferentes técnicas y procedimientos empleados por los diversos laboratorios y técnicos encargados que puede afectar la repetibilidad de los resultados; sin olvidar que la mayoría de las pruebas utilizan técnicas de evaluación visual, que generan gran subjetividad y una alta variabilidad entre laboratorios y entre operadores (Gravance & Davis, 1995; Foxcroft, Dyck, Ruiz, Novak & Dixon, 2008; Hernández, Dorado, Quintero, Ortiz, Buzón, Corzo & Hidalgo, 2014).

Todos los medios y herramientas para la congelación seminal elevan los costos de producción debido que todos estos implementos deben ser importados del exterior, por lo que se observa la posibilidad en Colombia de evaluar el semen en fresco. Ya que con un eyaculado de un macho podemos inseminar 30 hembras. (Rubio 2017)

Con base, en lo anterior, la investigación busca aplicar una técnica económica, sencilla y útil en la valoración de muestras seminales y hacerla practica en las pruebas de evaluación Andrológica en los machos de las diferentes especies domesticas en la producción animal.

1.3 Formulación del Problema

¿Es posible validar una prueba funcional en campo con las tinciones para evaluar vitalidad, integridad de la membrana e integridad de acrosoma de las células espermáticas ovinas mantenidas en refrigeración?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general. Implementar el triple test seminal (Vitalidad, Test Hiposmótico e Integridad del acrosoma) en la valoración del semen ovino refrigerado en diferentes horas de almacenamiento (0 horas, 24 horas y 48 horas).

1.4.2 Objetivos específicos. Determinar la vitalidad espermática en semen ovino refrigerado mediante la técnica de tinción espermática Eosina Nigrosina.

Evaluar la integridad funcional de la membrana plasmática en semen ovino refrigerado mediante la prueba de endósmosis (HOST).

Valorar la integridad estructural del espermatozoide en semen ovino refrigerado mediante la técnica de tinción espermática Diff Quick.

Correlacionar los valores del triple test (Vitalidad, HOST, NAR) con la motilidad espermática en semen ovino fresco almacenado durante 48 horas.

1.5 Justificación

Las técnicas de tinción espermáticas tienen las características de ser sencillas o complejas y dependen de la especificidad de la prueba y la función que se piensa evaluar, éstas se encuentran desde aplicar glutaraldehído al 2 % para fijar muestras hasta el uso de fitocromos específicos a partes determinadas de la célula espermática. Estas pruebas permiten la valoración de los espermatozoides a nivel funcional, para predecir el desempeño reproductivo de la muestra seminal obtenida de un macho con características deseables para una población de hembras determinadas.

Así, el análisis de semen ideal sería aquel que, de forma sencilla y eficaz, permitiera conocer de manera predictiva la capacidad fecundante de un eyaculado concreto. Sin embargo, este análisis integral es muy difícil de desarrollar, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática. No hay que olvidar que el objetivo del examen cualitativo seminal es asegurar que la fertilidad subsiguiente de dicho semen sea el óptimo. El problema está en las diferentes técnicas y procedimientos empleados por los laboratorios, lo que afecta la repetibilidad de los resultados, entendiéndose que la mayoría de las pruebas utilizan técnicas de evaluación visual de gran subjetividad, generando una alta variabilidad entre laboratorios y entre operadores (Hidalgo, *et al.*, 2005)

La idea del proyecto fue hacer una valoración adimensional bajo la figura que definimos como triple test a diferentes horas de almacenamiento a 5°C de manera a realizar una prueba económica, sencilla y verídica. Lo que nos permitirá al momento de investigar tener herramientas de bajo costo que serán útiles tanto en academia y en campo. Otra de las ventajas de implementar el triple test espermático es que nos brinda una oportunidad de ampliar las investigaciones andrológicas, por lo tanto, una de las ideas principales de esta investigación es obtener un material seminal en óptimas condiciones para una excelente genética en la industria ovina colombiana.

2. Marco Referencial

2.1 Antecedentes

En Norte de Santander, se encuentra poca información que evalué el triple test en semen ovino refrigerado. Sin embargo, a nivel empírico, nacional e internacional, se encuentran fuentes de información científicas relacionadas con el tema.

2.1.1 Antecedentes bibliográficos. Como se muestra a continuación:

2.1.1.1 Nacionales. Osorio (2013) Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, motilidad y morfología espermática en semen criopreservado de Búfalo.

Se realizó una investigación con el propósito de caracterizar la motilidad (ME) y la morfometría espermática (MORE), además de la integridad funcional de la membrana plasmática (IFMP) para establecer su asociación con otros parámetros [vitalidad (VE), anomalías morfológicas (AM) e integridad del acrosoma (IAE)] útiles para valorar la calidad en semen criopreservado de cinco búfalos Murrah. El procedimiento consistió en tomar tres fracciones del semen descongelado. La primera fue utilizada para la evaluación del ME mediante el Análisis Computarizado de la Motilidad Espermática (CASA). La segunda fracción se utilizó para realizar diferentes frotis seminales, los cuales se tiñeron con Eosina-Nigrosina para visualizar la VE y AM, Blue Stain® para valorar la IA y Hemacolor® para visualizar la MORE asistido mediante el Análisis Computarizado de la Morfología Espermática (ASMA). Con la tercera fracción se realizaron dos pruebas de endósmosis celular (HOST), para valorar la IFMP del espermatozoide, una a 102 mOsm/L-1 y otra a 154 mOsm/L-1. Se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los búfalos evaluados en cuanto a la ME, VE, AM, MORE y HOST, sin embargo, no se

detectaron diferencias en cuanto a la IAE. Tres de los 5 butoros presentaron una motilidad progresiva adecuada y superior al 25% y uno de ellos con una rapidez del 57% y un porcentaje de espermios estáticos alrededor del 3%, los otros cuatro restantes presentaron porcentaje de espermios estáticos superior al 20% y una rapidez que oscila entre el 20 y 30%. La medición de la MORE en cuanto a longitud, ancho, área y perímetro fue de 8,08 μm ; 4,29 μm ; 29,24 μm^2 y 22,25 μl , respectivamente, destacando dos butoros con dimensiones más pequeñas.

El HOST alcanzó resultados muy favorables en todos los animales, indistintamente de la condición osmolar (102/154 mOsm/L-1) destacando especialmente el mismo butoro que Destacó en las pruebas anteriores, alcanzando una respuesta al test del 80%. Se consiguieron varias correlaciones interesantes al enfrentar cada uno de los parámetros, destacando las correlaciones entre el HOST con parámetros como la VE (0,49, $P < 0,05$), los espermios rápidos (0,58, $P < 0,01$) y los estáticos (-0,58, $P < 0,01$); también destaca la asociación entre VE y espermios estáticos (-0,56, $P < 0,01$). La escala numérica desarrollada para diferenciar cada uno de los butoros logro discriminar cada uno de ellos en función de su capacidad para lograr una dosis seminal apta para ser sometida a la criopreservación, además de constatar la importancia de usar los métodos computarizados de análisis como herramienta de evaluación objetiva.

2.1.1.2 Internacionales. Como se muestra a continuación:

Alierta, Losinno, Aguilar, Gil & Moschetti (1999). Correlaciones entre el test hiposmótico y otros parámetros utilizados en la evaluación de semen equino criopreservado.

El estudio se realizó en la Universidad Nacional de Río Cuarto (ARGENTINA) en cooperación con la Yeguada General Lavalle del Ejército Argentino. Se seleccionaron 3 sementales de raza Silla Argentino, de edades comprendidas entre los 4 y 9 años, fértiles y con

una producción espermática estabilizada (D.S.O). Previo al proceso de criopreservación, se realizó una evaluación "in vitro" del semen fresco, midiendo en cada eyaculado su MP y realizando el test hipoosmótico. Se congelaron 17 eyaculados a cada semental, obteniendo 100 macropajuelas de cada uno. Posteriormente, se evaluó la calidad del semen postdescongelado realizándose las siguientes pruebas: MP, microscopía de fluorescencia, HOST y morfología. Finalmente se realizó la prueba "in vivo" asignando a cada semental tres yeguas de la raza Silla Argentina, con edades comprendidas entre los 3 y 15 años, condición corporal mínima grado 3 (G-1: mala; G-4: óptima), ausencia de fluido uterino en diestro por ultrasonografía, y ciclo reproductivo regular. La evaluación "in vitro" de semen fresco se realizó en cada eyaculado justo antes del proceso de criopreservación, midiendo visualmente motilidad progresiva siempre por el mismo operador con un microscopio óptico a 400X. Así mismo se realizó el test hipoosmótico incubando 100 microlitros de semen en una solución hipoosmótica a 37°C durante 30 min. La lectura se hizo observando al microscopio óptico 400X el porcentaje de espermatozoides que reaccionaron al estrés osmótico con una hinchazón en la cola indicativo de la integridad y funcionalidad de la estructura de la membrana. El proceso de criopreservación, se realizó según el protocolo de criopreservación de curva rápida de enfriamiento descrito por Burns et al. en 1992 para la evaluación "in vitro" de semen postdescongelado, se descongeló el 10% de macropajuelas de cada semental. Se realizó un estudio utilizando BFS (buffer formol salino) como fijador y coloreando con azul de metileno. En la lectura se observó con microscopio de contraste de fase el porcentaje de espermatozoides con morfología normal Se evaluó daño de membrana mediante tinciones supra vitales de fluorescencia. Se utilizó como colorantes SYBR-14° (fluorescencia verde, identifica espermatozoides con integridad de membrana) y Yoduro de Propidium (fluorescencia roja, identifica espermatozoides con daño de membrana) y se calculó el porcentaje de espermatozoides viables (fluorescencia verde). Se repitió el HOST en cada una. Para la

evaluación "in vivo" del semen post descongelado, se inseminó postovulación controlando las yeguas ecográficamente cada 6 horas. La dosis inseminante fue de 3 macro pajuelas/inseminación (400 millones de espermatozoides con membrana plasmática), en un máximo de 2 ciclos consecutivos por yegua. El diagnóstico de gestación se realizó por ultrasonografía los días 15 y 25 postinseminación. En el estudio estadístico se realizó un análisis de correlación paramétrico y no paramétrico entre las variables. Se calcularon las correlaciones para cada semental entre las variables HOSTfresco, morfología, fluorescencia y HOST-postdescongelado, observándose correlación estadística en el semental 1 entre HOST-postdescongelado y fluorescencia postdescongelado (n=10) ($r=0.683$; $p=0.0293$) y en el semental 2 entre el HOST-fresco y morfología postdescongelado (n=10) ($r=0.724$; $p=0.042$). Al repetir el mismo análisis considerando los datos de los tres sementales conjuntamente (n=30), se observó correlación estadística entre HOST postdescongelado y fluorescencia postdescongelado (n=30) ($r=0.423$; $p=0.024$). En la evaluación "in vivo", los porcentajes de preñez fueron: semental 1, 33.3% (1/3); semental 2, 33.3% (1/3); semental 3, 0% (0/3). Los resultados analizados indican una baja correlación entre el HOST y los otros parámetros ya estandarizados para la evaluación de semen. Actualmente continuamos realizando las evaluaciones postdescongelado in vitro e in vivo. Probablemente al aumentar tanto el número de muestras procesadas "in vitro" como el número de yeguas estos resultados se vean modificados. Sin embargo, la alta correlación existente entre HOST-postdescongelado y fluorescencia post-descongelado observada tanto en el semental 1 (n=10), ($r=0.683$; $p=0.0293$) como en el análisis conjunto de los datos (n=30), ($r=0.423$; $p=0.024$), sugieren que el HOST es un buen estimador del daño de membrana, siendo una técnica más sencilla y económica que la fluorescencia. La variabilidad de los resultados del HOST en los distintos sementales sugiere la posibilidad de una resistencia individual al estrés osmótico. La continuación de este estudio nos permitirá, demostrar una asociación entre la

resistencia al HOST y la congelabilidad del semen equino.

2.2 Marco Teórico

2.2.1 Valoración de la calidad espermática. El análisis seminal abarca una importante serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática. Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para su uso en IA (Vera, 2001). Al realizar la evaluación del semen ovino es importante tomar en cuenta la edad, raza, estado nutricional, condición corporal, actividad sexual, método de colección, época y estado de salud del animal (Rubio, 2017). Entre todas las pruebas disponibles detallaremos las siguientes:

El espermograma ha sido usado para calificar una muestra de semen, midiendo el volumen, la concentración espermática, de la motilidad (masal, individual y calidad de movimiento), la viabilidad, el estado del acrosoma y la evaluación de las morfo-anomalías espermáticas. Diariamente se hacen en laboratorio (Hernández, 2017).

La fertilidad es una prueba complementaria definitivamente válida de la calidad real de una muestra de semen, siendo más precisa cuando es analizada bajo la fertilidad de las hembras nulíparas inseminadas, disminuyendo el factor hembra al eliminar el estrés de parto anteriores, así como el de la lactación (Rubio, 2006).

2.2.2 Pruebas de funcionalidad espermática. Para cumplir con la funcionalidad espermática, en una muestra de semen fresca, refrigerada y criopreservada el grupo de espermatozoides debe cumplir con ciertos factores para la fertilización, como motilidad progresiva, morfología aceptable, metabolismo para la producción de energía, capacidad para una motilidad hiperactividad, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas

asociadas con la fecundación, integridad de la función acrosómica, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético (Lozano, 2013). Cumplir con todos estos parámetros en una sola prueba podría anular los resultados, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática (Osorio-Serna; 2007), subestimando la capacidad fecundante de una muestra seminal. Así mismo, valorar esta función mediante una serie de pruebas. En los análisis completos es impráctico y antieconómico para los que tienen a cargo la labor de evaluar muestras seminales en los centros de IA o en los programas reproductivos (Evaluaciones de la Aptitud Reproductiva) de los machos reproductores usados periódicamente en montas controladas (Hernández, 2017).

La utilización de la IA en animales de interés zootécnico está cada vez más extendida, lo cual nos obliga a evaluar eficientemente la calidad y funcionalidad espermática. El problema radica en que actualmente las pruebas de laboratorio destinadas a tal fin no aportan una información precisa, veraz y repetible sobre la capacidad fecundante del espermatozoide, obteniéndose correlaciones con la fertilidad que reflejan muy poco la verdadera calidad seminal. Esta problemática nos conduce a buscar pruebas alternativas que evalúen más objetivamente la capacidad de los espermatozoides criopreservados para fertilizar exitosamente un ovocito. Es así como, en las últimas décadas han surgido algunas pruebas que valoran la capacidad de adaptación del espermatozoide a los cambios osmóticos, basándose en la capacidad de respuesta a medios hiposmóticos; sin embargo, poco se ha estudiado sobre la capacidad de adaptación a medios hiperosmóticos, a sabiendas que el proceso de criopreservación espermática se hace con soluciones de osmolaridad elevada (Rubio, 2017).

Estas pruebas no convencionales y alternativas de valoración de la funcionalidad del espermatozoide incluyen, el estado del acrosoma, la movilidad y viabilidad, la resistencia de la

membrana espermática a cambios súbitos de osmolaridad. Siendo esto último, importante estudiarlo debido a que el estrés osmótico es un notorio mecanismo que involucra aspectos de resistencia espermática al proceso de criopreservación (Varisli & Agca 2009).

2.2.2.1 Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. La prueba de vitalidad es una técnica muy sencilla en la que utilizamos la tinción como la eosina-nigrosina (EN). En donde podemos identificar el daño estructural en la membrana celular del espermatozoide lo que nos muestra si la célula está viva o muerta (Figura 2). Son numerosos los trabajos de investigación que determinan las diferencias entre los espermatozoides viables y no viables dentro de un eyaculado utilizando esta tinción, juntamente con otras técnicas (Losada, 2013).

Por todo esto, resulta muy importante evaluar la vitalidad celular del espermatozoide exteriorizado, debido a que se ha señalado que decrece rápido y substancialmente luego de la eyaculación (Rodríguez-Martínez, 2000). Así mismo, la función de la crio preservación, ya que su objetivo es permitir la supervivencia de los espermatozoides, ocasionando daños irreversibles a las membranas plasmáticas causando muerte celular rápida o una muerte lenta en un fenómeno dividido en tres fases: inducción, programación y degradación (Buzón, 2014).

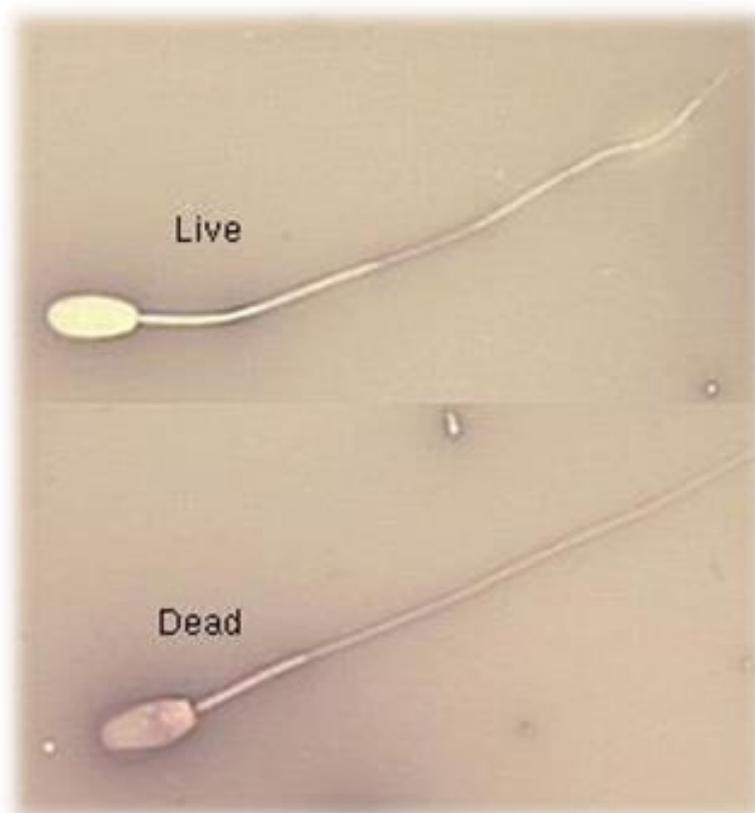


Figura 1. (Tinción de eosina-nigrosina en espermatozoides de toros) Espermatozoide sin coloración (vivo); Espermatozoide con coloración (muerto)

Fuente: Lossada, 2013.

El examen a través de la microscopía electrónica de transmisión o de barrido ha sido valioso para determinar aspectos de integridad espermática (Rodríguez, 2000). Quedando estas pruebas para la investigación en laboratorios, ya que sus altos costos y la baja relación precio-beneficio limita su uso en Centro destinados a colección y congelación de semen de animales domésticos utilizados como mejoradores de parámetros reproductivos a través de la IA.

2.2.2.2 Test de endósmosis (HOST). En condiciones fisiológicas normales, la fecundación no ocurre si la MP del espermatozoide está bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta; por lo tanto, la prueba hiposmótica es un buen indicador del funcionamiento de la membrana espermática (Tamuli & Watson, 1992).

Jeyendran-et al (1984) demostraron en semen humano cómo una prueba sencilla y rápida como el HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*) presentaba una alta correlación con el test de penetración en ovocito de hámster en semen humano, dicha relación puede ser explicada debido la incubación en un medio hiposmótico causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica intracelular con la del medio extracelular (Rota et al., 2000). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en los espermatozoides un hinchamiento y enrollamiento del flagelo En ovinos. Como se plasma en el esquema de la morfología del espermatozoide durante el test hiposmotico (Figura 1), se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L para realizar este test (Rubio, 2017).

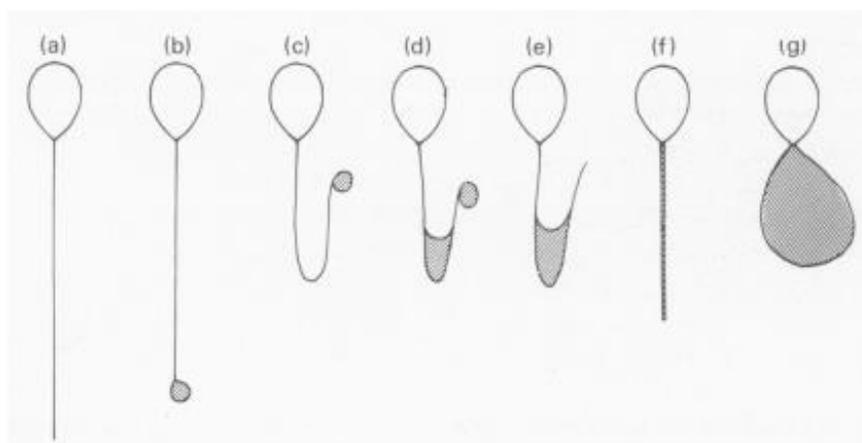


Figura 2. Esquema de la morfología del espermatozoide mediante el test hiposmotico.

Cada especie en particular tiene sus propiedades coloidosmóticas, referidas a la incubación en medios anisosmóticos. De acuerdo con este patrón de incubación hiposmótica se puede relacionar idóneamente los resultados de este test HOST con otros parámetros de calidad espermática. En rumiantes, como en otros animales domésticos, se han señalado correlaciones altas y positivas entre el HOST y el porcentaje de espermatozoides vivos, la motilidad espermática, el porcentaje de espermatozoides normales y la fertilidad *in vivo* e *in vitro*, tanto del semen fresco, como para el semen descongelado (Rubio, 2007). Así mismo, en rumiantes, se ha sugerido el uso de fructosa o citrato de sodio diluido en agua destilada a 100 mOsm/L (Correa & Zavos, 1994). Aunque algunos autores prefieren trabajar a una presión osmótica de 150 mOsm/L (Quintero-Moreno et al., 2003) para evitar falsos negativos producto de la disrupción de la MP a causa del estrés hipotónico severo.

2.2.2.3 Estado del Acrosoma. El papel principal del acrosoma es la fecundación por eso la importancia de la valoración específica del mismo, tanto para material seminal refrigerado o congelado (Rubio, 2007). En estos momentos se conoce que, un espermatozoide fértil de ovino debe tener un acrosoma en perfecta condición, donde podemos identificar tres regiones diferenciadas: la zona acrosomal, con su borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas (Hafez, 2003).

La forma más fácil de determinar el estado acrosomal en las especies donde el espermatozoide de diferencia claramente para observarlo es fijar la muestra en una solución de 1.77 g de sacarosa diluida en 100 ml de agua destilada y observar inmediatamente de forma directa la estructura acrosomal en un microscopio de luz blanca (Lozano, 2013). En el caso de ovinos y caprinos, con frotis teñidos de EN (Rubio-Guillén et al., 2014) Las cabezas espermáticas tanto ovinos y caprinos son las más grandes de las especies, esto nos facilita observarlas en el

objetivo de 100X con aceite de inmersión (Hernández, 2017).

La metodología descrita por Pursel & Johnson (1972) se evaluó el estado del acrosoma y se distinguen: borde apical normal (NAR) correspondiente a espermatozoides con acrosoma intacto, borde apical dañado (DAR), borde apical perdido (MAR) y borde apical suelto (LAC). Por otro lado, Fiser et al., (1981) únicamente diferencian entre acrosomas intactos (PIA) y alterados.

Una integridad estructural y funcional del acrosoma *in vivo*, ya cuando el espermatozoide se encuentra ubicado en el oviducto tiene como respuesta un número mayor de células con membrana acrosomal reactiva capaces de penetrar en el oocito (Osorio et al., 2007) y normalmente la reacción acrosomal es inducida por la zona pelúcida (ZP₃) en el momento en que el espermatozoide se adhiere al oocito, por lo tanto, la habilidad del espermatozoide para realizar la reacción del acrosoma, en respuesta al contacto con la zona pelúcida, puede ser utilizada como un indicativo de fertilidad del espermatozoide (Osorio, 2013). En espermatozoides de mamíferos euterianos se postuló que, la pérdida muy temprana del acrosoma evita la unión del espermatozoide con el ovocito (Osorio, et al., 2007). Sólo los espermatozoides que pueden realizar la reacción acrosomal de manera sincronizada con la fase de penetración del ovocito, tienen la habilidad de pasar a través de la zona pelúcida y, como consecuencia, fusionarse con este, para formar un embrión (Osorio, 2013). Aunque en ratones, se ha demostrado, como espermatozoides con reacción acrosomal previa al contacto con la ZP₃ presentan afinidad por penetración a esta membrana glicoprotéica, junto con una adecuada fusión de gametos en FIV con numerosos espermatozoides con reacción acrosomal previa al contacto con el ovocito (Jin, Fujiwara, Kakiuchi, Okabed, Satouh, Baba, Chiba & Hirohashia, 2011).

A la luz de los hallazgos hechos en esta especie animal (Ovinos), se sigue manteniendo la idea que, cualquier daño en el acrosoma provocaría que se liberen sus enzimas contentivas (acrosina, proteasas, esterases e hialuronidasa), impidiendo la fecundación, de forma que, como se mencionó anteriormente, si el porcentaje de estas alteraciones es elevado, puede provocar un descenso de la fertilidad (Rubio, 2007). Es bueno recalcar que al mirar la estructura celular mediante microscopia de luz blanca se evalúa el nivel de integridad funcional si lo evaluamos con otros métodos de tinción (Osorio, 2007).

Los espermatozoides con algún daño que semejen un desarrollo prematuro, como sucede en la crio preservación son células consideradas con menos fertilidad (Hernández-Corredor; 2017). Igualmente, los eyaculados en los que gran parte de los espermatozoides han perdido sus acrosomas mostraran menor fertilidad (Rubio, 2007).

2.3 Marco Conceptual

Volumen: El volumen es una magnitud métrica de tipo escalar definida como la extensión en tres dimensiones de una región del espacio. Es una magnitud derivada de la longitud, ya que en un ortoedro se halla multiplicando tres longitudes: el largo, el ancho y la altura.

Concentración Espermática: es el número de espermatozoides por mililitro y se espera que haya 15 millones o más en cada mililitro. Número total de espermatozoides: en una muestra normal hay por lo menos 39 millones de espermatozoides.

Motilidad Masal: Es una medida rápida y fácil que necesita de un examen microscópico del semen, desde el momento que es recogido.

Motilidad Individual: Es un test que juzga si el eyaculado se debe aceptar o no en función del porcentaje de espermatozoides móviles o no.

Motilidad Progresiva: Capaces de progresar en su avance y, por lo tanto, de recorrer las trompas de Falopio y llegar hasta el óvulo.

Viabilidad: Nos permite saber el número de espermatozoides vivos, aunque estos no se muevan. Se utiliza una tinción que tiñe los espermatozoides muertos.

Estado Acrosomal: La reacción Acrosomal es un proceso especializado de fusión de la membrana citoplasmática con la membrana Acrosomal externa en la zona apical de la cabeza espermática originando la liberación de las enzimas almacenadas en el Acrosoma y la exposición de la membrana acrosomal interna.

Morfo-Anomalías: Son alteraciones estructurales o funcionales, visibles o no.

Integridad Estructural: La integridad estructural es fundamental para el metabolismo espermático e imprescindible para la fecundación (Rubio et al., 2009). Esta participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, con funciones que permiten la adaptación metabólica del espermatozoide al medio circulante, proporcionándole, un sistema molecular para el reconocimiento del oocito. De aquí deriva que la evaluación estructural del espermatozoide hace énfasis en la valoración de la integridad de su MP, así como también la membrana acrosomal (MA); pudiendo en algunos casos evaluarlas juntas o por separado mediante tinciones sencillas en microscopio óptico (Zhu y Liu, 2000).

Morfología Espermática: La morfología de los espermatozoides es una característica que se estudia en el seminograma para ver si en el semen hay espermatozoides anormales, en qué

cantidad se encuentran y qué alteraciones tienen estas células.

Andromed ®: Es un concentrado estéril que se usa para la preparación de un diluyente libre de yema de huevo para eyaculados. Es apropiado para la congelación de semen y para la conservación de semen en fresco. Contiene fosfolípidos, TRIS, ácido cítrico, azúcares, antioxidantes, tampones, glicerina, agua de altísima pureza y antibióticos (Gonzales & Martínez; 2016).

Diluyente: El diluyente es un agente que sirve para diluir sustancias que no son solubles en agua. Las propiedades que debe tener un diluyente para semen es ser isotónico con respecto al semen, tener capacidad buffer, proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento desde temperatura corporal a 5°C (Gonzales & Martínez, 2016).

Test de vitalidad: El test de vitalidad del espermatozoide es una prueba realizada durante el seminograma en la que se calcula el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos de una muestra de semen. (Reproducción asistida ORG; 2019)

HOST: Una prueba hipoosmótica es un test utilizado para estudiar la vitalidad de una muestra de semen, Se evalúa el estado anatómico-funcional de la membrana plasmática del espermatozoide (Quintero, 2003).

Vagina Artificial: provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir la eyaculación. Consiste en un tubo externo rígido, por ej. Caño de polipropileno térmico (17 cm x 5.5 cm) y una camisa interna de látex. La misma se repliega y asegura sobre los extremos del tubo mediante bandas elásticas formando, entre el tubo y la camisa, un compartimento hermético para el agua. A uno de los extremos de la vagina, se adosa un tubo

colector (Cueto, Gibbons, Garcia, Wolff & Arrigo, 2010).

Volumen del semen: El volumen del semen se mide utilizando un tubo de recolección graduado (Cueto, Gibbons, Garcia, Wolff & Arrigo, 2010).

2.4 Marco Contextual

El estudio fue realizado en la unidad de producción siete colores, sector “anillo vial occidental” justo en la vía que conduce del municipio de los patios al municipio del Zulia (Norte de Santander) (Figura 3) ubicada en el municipio los patios, en una zona agro ecológicamente caracterizada como bosque seco tropical, aproximadamente a 300 msnm y posee una temperatura anual entre 29,5 y 34 °C, con precipitaciones medias por año entre 560 y 810 mm, repartidas en dos picos de lluvias bajo un patrón de estructura bimodal, siendo realizada la parte experimental de este ensayo durante la época de lluvia en un periodo comprendido de septiembre y octubre de 2019.



Figura 3. Ubicación geográfica del municipio de Los Patios; Norte de Santander; Republica de Colombia

Fuente: Alcaldía del municipio Los Patios, 2019.

El proyecto ovino cuenta con un área aproximada de 24 hectáreas divididos en 14 potreros para el pastoreo **Guinea** (*Megathyrus maximus*) y **Estrella** (*Cynodon plectostachius*)

2.5 Marco Legal

Ley 1774 de 2016 o ley contra el maltrato animal, modifica el artículo 655 del Código Civil y de esta forma los animales recibirán especial protección contra el sufrimiento y el dolor, en especial, el causado directa o indirectamente por los humanos. Multas de 5 a 50 salarios mínimos legales vigentes mensuales para quienes incurran en actos dañinos y de crueldad en contra de los animales.

De igual forma, se establece una pena de 12 a 36 meses de prisión e inhabilidad especial de uno a tres años, y multa de 5 a 60 salarios mínimos legales vigentes mensuales (smlmv), para quien cause la muerte o lesione gravemente la salud o integridad física de los animales silvestres, domésticos y amansados. La ley también permite que la Policía Nacional retenga a los animales que estén siendo víctimas de maltratos.

Registro Sanitario de Predios Pecuarios. Resolución 9810 de 2017.

Ley 1252 de 2008 Por la cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los residuos y desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones Administrativa.

3. Diseño Metodológico

3.1 Tipo de Investigación

El tipo de investigación es de carácter experimental, donde se evaluaron las tres pruebas (estado del acrosoma, test hiposmótico y vitalidad) a diferentes horas (0h-24h-48h), en semen ovino refrigerado.

A su vez se implementó la metodología llamada triple test que consiste en una medida adimensional que toma en cuenta los datos de:

Triple Test: Vitalidad + Test Hiposmótico + Integridad del Acrosoma

La investigación experimental aplicada se hizo en campo y laboratorio; ya que se comprobó la hipótesis con base en la medición numérica y de análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento (aplicación del triple test) (Hernández, Fernández & Baptista, 2012).

3.2 Población y Muestra

3.2.1 Población. La finca 7 colores cuenta con una población de 400 hembras ovinas mestizas y 16 reproductores de las razas Kathadin, Dorper y Dorper White; cuenta actualmente con un área aproximada de 7 hectáreas divididos en 12 potreros para el pastoreo, encontrando, pasto estrella africana (*Cynodon plectostachyus*) y guinea (*Megathyrus maximus*).

3.2.2 Muestra. Durante dos meses se trabajó con 4 machos Dorper bajo el mismo régimen de alimentación (pasto fresco *ad libitum*, heno y concentrado). Los animales permanecieron en cubículos individuales en las noches, después de las siete de la mañana salían a pastoreo hasta medio día, en corrales individuales, luego volvían a los cubículos. Los animales no entraron en

monta directa durante el periodo experimental, A cada macho se le realizaron 2 colectas de semen por semana.

3.2.3 Valoración del triple test. Dentro de la investigación se evaluó vitalidad, test hiposmotico, integridad del acrosoma. Teniendo en cuenta que las tres pruebas evalúan en valores porcentuales, se decide generar un índice aditivo con valores que oscilan entre 0 y 300 para clasificar la evaluación integral de cada muestra:

270-300 (Excelente).

240-270 (Bueno).

210-240 (Aceptable).

180-210 (Regular).

Menor de 180 (Malo).

Fases del proyecto: Fase 1: Colecta del semen. Las muestras fueron colectadas los días miércoles y sábado entre las 6:00 y 9:00 de la mañana. Un mes antes de comenzar el experimento, los machos fueron separados de las hembras y se comenzó la colecta bisemanal con el fin de propiciar una calidad seminal óptima y evitar la presencia de espermatozoides envejecidos debido a tiempos largos de descanso. Al término del experimento se obtuvieron 32 eyaculados producto de 8 eyaculados de los 4 machos dorper, se utilizaros de señuelo hembras dorper en periodo de celo. Se realizó la colecta seminal con una vagina artificial (Walmur[®], Porto Alegre, RS, Brasil, Figura 4)



Figura 4. Vagina artificial Walmur®

Fuente: Implegan, 2020.

Fase 2: Manejo seminal. Una vez se recolectó el semen se llevó a los viales donde se preservaron con el diluyente (Andromed, Figura 5), fracción en dilución (1:1), (Dorado et al., 2009), a una temperatura de 37 °C, hasta llegar al laboratorio (UFPS Campos Elíseos, los Patios Norte de Santander) para su evaluación.



Figura 5. Diluyente Andromed®

Fuente: Biotay, 2020.

Fase 3: Laboratorio. Se hicieron diferentes extendidos (portaobjetos) para las muestras en semen fresco y refrigerado para evaluar la vitalidad, la integridad del acrosoma las cuales se describen a continuación:

Vitalidad:

Se realizó con una gota de 10 μL de semen fresco diluido (3:1) en un portaobjeto a 38°C (precalentado), mezclando inmediatamente sobre esta gota de semen, 15 μL del colorante supravital Eosina-Nigrosina, se homogeniza suavemente la gota de semen con la gota del colorante y se hace un frotis, se hace el secado por 15 minutos. Las muestras se evalúan en el microscopio óptico de luz con el objetivo de inmersión de 40X, cuantificando un total de 100 espermatozoides para la evaluación de la vitalidad espermática. Al igual que lo reportado por Rubio (2017) resultaba importante diluir las muestras por la alta concentración espermática en las láminas portaobjetos que sin diluir serían sumamente difíciles de contabilizar e identificar anomalías espermáticas en el detalle de cada parte. Los resultados son expresados en porcentaje (%). Esta prueba también fue realizada al semen refrigerado, mediante la misma metodología descrita anteriormente.

Integridad funcional de la membrana plasmática (HOST):

La tinción HOST se usó para valorar la parte apical del acrosoma en espermatozoides: Integridad funcional de la membrana plasmática. Bajo la metodología de Quintero y et al., (2014): se prepararon en viales (cada vial de 1,5 mL); se vertió en cada uno de los viales 1000 μL de la solución a 154 mOsm y 100 μL del semen y se mantuvieron por 30 min a baño María a 37°C. Al término del tiempo, se preparó 10 μL de la solución (semen + medio) agregamos los 10 μL de semen y 10 μL de la solución preparada con 0,9g de sacarosa y 100 ml de agua a lo que

llamaríamos HOST y se realizaron los frotis a los portaobjetos y se observaron las muestras a 400X Se contaron 100 espermatozoides por muestra, observando la reacción positiva de los mismos (flagelos doblados o enrollados.) Osorio (2013) describe que el resultado de la prueba HOST es evaluar los flagelos fletados, enrollados o reaccionados al test son aquellos que alguna porción de la cola espermática se enrollaba parcial, total o inclusive tenuemente (Torsión helicoidal del flagelo).

Evaluación de la integridad del acrosoma:

El criterio de evaluación del acrosoma fue el empleado por Pursel et al. (1972). La prueba se realizó tiñendo muestras con la tinción Diff Quick que contiene las siguientes soluciones: contiene una solución de Fijación; verde rápido (0,002 g / l) en metanol; la solución de tinción I que contiene Eosina Y (1,22 g / l) en tampón de fosfato (pH 6,6) y 0,1% (w / v) de ácido sódico como conservante; y la tinción solución II que contiene tiazina (1,1 g / l) en tampón de fosfato (pH 6,6). Por breves inmersiones consecutivas en las soluciones, las muestras de semen en el portaobjetos previamente secadas al aire se fijaron y se tiñeron en sólo 15 segundos, variando el número de inmersiones en la solución de tinción apropiada. Una vez listas las muestras (secas y fijadas) se usó aceite de inmersión, con el objetivo de 100X con un microscopio óptico. Esta técnica sencilla permitió identificar la silueta del acrosoma usando un microscopio de luz a 100x de aumento con ayuda de aceite de inmersión. (Figura 5)



Figura 6. NAR, Capuchón Apical Normal; Espermatozoide con el acrosoma intacto Tinción Spermac®

Fuente: Hernández, 2017.

Motilidad espermática. Una vez en el laboratorio de reproducción animal de la UFPS, sede CAMPOS ELISEOS, Se realizó con el análisis de movilidad espermática, por el software CASA (ISAS, Valencia, España). El análisis se realizó sobre alícuotas de semen de 5 μ L de semen fresco a 37°C. Las alícuotas se colocaron en la cámara SpermTrack® especiales para la medición de la movilidad por el CASA. Posteriormente se capturaron los espermatozoides en movimiento con un microscopio de contraste de fases a 200X de aumento, con el fin de guardar las imágenes

digitalizadas. El parámetro evaluado fue: motilidad espermática.

3.2.4 Modelo estadístico. El modelo estadístico se comprendió de un análisis factorial, donde: A: Son los machos y B: Las horas de refrigeración a su vez las variables vitalidad, test hiposmotico y integridad del acrosoma, se tuvieron en cuenta para realizar el análisis de correlación lineal donde se observó que homogeneidad existen entre las variables. Una vez se obtuvo los datos se plasmaron en un Excel donde se llevaron al software: R función (R Commander) se hizo la prueba de normalidad bajo el Test de (Kolmogorov-smirnov) se determinó que el diseño experimental a establecer fue:

$$Y_{ij} = U (\text{Media}) + H_i (\text{Horas}) + M_j (\text{Macho}) + C (\text{Efecto de Machos}) + E_{ij} (\text{Error Experimental})$$

Y_{ij} : Respuesta Traducida en las variables de Horas y Machos.

U: Media General.

H_i : Hora (0h, 24h, 48h).

C: Efecto de Machos (M1, M2, M3, M4)

E_{ij} : Error Experimental.

Las medias se le aplico el test de Duncan ($P \leq 0,05$) con la que se observó las diferencias entre machos y las diferentes horas de almacenamiento y se le aplico la correlación a los datos de motilidad espermática.

4. Resultados

En la investigación se evaluaron parámetros como: Vitalidad, Test Hiposmótico, Daño de la membrana acrosomal, Triple test y motilidad espermática. Los valores se expresaron en porcentaje (\pm) la desviación estándar (Para evitar trabajar con porcentajes se utilizó la función arcsin (Arcoseno))

4.1 Vitalidad

En la tabla 1 se observa los datos de la vitalidad espermática, se observa que no existieron diferencias significativas entre los machos mientras que a medida que pasaron las horas, empieza la mortalidad; en la tabla 2 se observa como en las primeras 24 Horas el porcentaje de disminución de la vitalidad es del 12 %, entre las 24 y 48 Horas se promedia un 15.75 % y para ser un semen que permaneció en un medio con glicerol para esta variable al pasar 48 horas la vitalidad se pierde un 27.75 %, por lo tanto, se observa una pérdida promedio de un 0.57% por hora.

Tabla 1. Variable de vitalidad de espermatozoides (en porcentaje) a las diferentes horas en la investigación

Machos	Horas		
	H0	H24	H48
M1	89.80A ^a \pm 4.70	78.3B ^b \pm 7.04	63.6C ^c \pm 10.42
M2	88.80A ^a \pm 4.84	77.9B ^b \pm 7.15	60.4C ^c \pm 10.62
M3	89.95A ^a \pm 7.03	76.7B ^b \pm 9.81	60.7C ^c \pm 11.9
M4	91.80A ^a \pm 6.65	79.4B ^b \pm 9.07	64.6C ^c \pm 13.81

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.: letras diferentes en minúscula (a,b) en las filas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre las horas de la investigación; letras diferentes en mayúscula (A,B) en las columnas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre los machos evaluados.

Tabla 2. Índice de pérdidas de la vitalidad de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación.

Horas			
Machos	H0-H24	H24-H48	H0-H48
M1	11.5 %	14.7 %	26.2 %
M2	10.9 %	17.5 %	28.4 %
M3	13.2 %	16 %	29.2 %
M4	12.4 %	14.8 %	27.2 %
Promedio	12.0 %	15.75 %	27.75 %

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.

4.2 Test Hiposmótico (HOST)

Los resultados de la variable de HOST se observan en la tabla 3. Se observó que existieron diferencias significativas para las horas de evaluación ($P \geq 0.05$) Sin embargo, en los machos se obtuvieron diferencias estadísticas a las 24 horas en la investigación ($P \leq 0.05$). El macho 4 en el intervalo 0 horas y 24 horas se observa que el HOST pierde el 31% donde se daña la membrana, presento una perdida mayor a diferencia de las otras células espermáticas. Por lo tanto, este macho por recomendación se debe dejar para monta natural (Tabla 4).

Tabla 3. Evaluación del Test Hiposmotico (HOST) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación manejar un solo dialogo, usa palabras diferentes a la figura

Machos	Horas		
	H0	H24	H48
M1	83.9A ^a ±9.21	69.6B ^b ±11.97	56.9D ^c ±11.82
M2	84.4A ^a ±14.10	70.6B ^b ±15.61	61.0D ^c ±17.96
M3	85.2A ^a ±9.60	70.8B ^b ±8.57	53.9D ^c ±9.15
M4	88.8A ^a ±7.58	57.8C ^b ±17.91	53.9D ^b ±14.73

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.: letras diferentes en minúscula (a.b) en las filas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre las horas de la investigación; letras diferentes en mayúscula (A.B) en las columnas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre los machos evaluados.

Tabla 4. Índice de pérdidas de funcionalidad de la membrana (HOST) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación

Machos	Horas		
	H0-H24	H24-H48	H0-H48
M1	14.3 %	12.7 %	27 %
M2	13.8 %	9.6 %	23.4 %
M3	14.4 %	16.9 %	31.3 %
M4	31 %	3.9 %	34.9 %
Promedio	19.35 %	10.77 %	28.17 %

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.

4.3 Evaluación de la Integridad del Acrosoma (NAR)

Los resultados de la variable de NAR se observan en la tabla 5. Se observó que existieron diferencias significativas para las horas de evaluación ($P \geq 0.05$) Sin embargo, en los machos no se observaron diferencias estadísticas en la investigación ($P \geq 0.05$). El macho 4 en el intervalo 0 horas y 24 horas se observa que el HOST pierde el 31% donde se daña la membrana, presento una perdida mayor a diferencia de las otras células espermáticas. Por lo tanto, este macho por recomendación se debe dejar para monta natural (Tabla 4).

Tabla 5. Variable de la evaluación del estado del acrosoma (NAR) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación

Machos	Horas		
	H0	H24	H48
M1	85.60A ^a ± 9.63	71.06B ^b ± 12.57	55.33C ^c ± 12.98
M2	86.86A ^a ± 8.70	71.26B ^b ± 12.96	56.86C ^c ± 14.30
M3	84.53A ^a ± 12.82	77.33B ^b ± 7.44	59.26C ^c ± 10.85
M4	86.93A ^a ± 7.11	72.66B ^b ± 7.70	56.93C ^c ± 11.56

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.: letras diferentes en minúscula (a,b) en las filas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre las horas de la investigación; letras diferentes en mayúscula (A,B) en las columnas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre los machos evaluados.

4.4 Triple Test

Al evaluar el test, se tiene en cuenta la suma de las tres técnicas. Vitalidad, la prueba HOST y NAR (Tabla 6), donde los valores más cercanos a 300 son los más deseables y los menores de

180 como descartables.

En la tabla 7, se observaron los mejores valores del TT y a medida que pasan las horas se observa como disminuyen estas cifras. A medida que pasan las primeras 24 horas en 14.88% en las segundas 24 horas se pierden el 20,55% y durante la investigación se pierde el 32,38%

Tabla 6. Variable de la evaluación del Triple Test (TT) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación

Machos	Horas		
	H0	H24	H48
M1	259.3A ^a ±12.88	219.06B ^b ±19.27	175.93C ^c ±20.44
M2	260.13A ^a ±18.10	219.80B ^b ±23.69	178.40C ^c ±32.31
M3	259.73A ^a ±18.33	224.86B ^b ±18.25	173.93C ^c ±19.09
M4	267.53A ^a ±8.28	227.26B ^b ±18.52	179.46C ^c ±23.24

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.: letras diferentes en minúscula (a.b) en las filas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre las horas de la investigación; letras diferentes en mayúscula (A.B) en las columnas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre los machos evaluados.

Tabla 7. Índice de Perdidas de valores de la evaluación del Triple Test (TT) de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación

Machos	Horas		
	H0-H24	H24-H48	H0-H48
M1	15.52%	19.69%	32.15%
M2	15.50%	18.84%	31.42%
M3	13.43%	22.65%	33.03%
M4	15.05%	21.03%	32.92%
Promedio	14.88%	20.55%	32.38%

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.

4.5 Porcentaje de Motilidad

Se tiene en cuenta el porcentaje de espermatozoides tomados a través de software CASA (ISAS V1.2, Proiser, España).

En la tabla 8, se observan los valores de motilidad (%) y a medida que pasan las horas se observa como disminuyen estas cifras. A medida que pasan las primeras 24 horas en 39.59% en las segundas 24 horas se pierden el 14.96% y durante la investigación se pierde el 54,55%

Tabla 8. Porcentaje de motilidad de los espermatozoides a las diferentes horas en la investigación

Machos	Horas		
	H0	H24	H48
M1	60.63B ^b ±26.64	24.29C ^c ±21.64	12.63D ^e ±7.96
M2	66.17B ^{ab} ±25.60	36.89C ^b ±22.95	14.95D ^d ±15.12
M3	69.23B ^{ab} ±24.60	26.48C ^c ±10.44	11.80D ^e ±11.05
M4	78.88A ^a ±16.38	28.88C ^{cb} ±19.65	17.32D ^d ±7.08

M1: Macho 1; M2: Macho 2; M3: Macho 3; M4: Macho 4; H0: Hora cero de la investigación; H24: Hora veinticuatro de la investigación; H48: Hora cuarenta y ocho de la investigación.: letras diferentes en minúscula (a.b) en las filas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre las horas de la investigación; letras diferentes en mayúscula (A.B) en las columnas, denotan diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0,05$) entre los machos evaluados.

4.6 Correlación Lineal

Al observar la tabla 9. Se observaron unas altas correlaciones entre las tres variables que componen el triple test (r : mayor 0.80) y se observa una leve tendencia entre la movilidad espermática y el triple test ($r=0.51$). La variable de vitalidad espermática es la de mejor resultado (0.86), seguida del HOST (0.83), Y por último el NAR (0.82) luego de hacer la correlación se observó que la motilidad tuvo una leve relación (0.51).

Tabla 9. Correlación entre la variable de la evaluación del Triple Test (TT) y la motilidad de espermatozoides a las diferentes horas en la investigación

	Vitalidad	HOST	NAR	TT	Móviles
Vitalidad	1				
HOST	0.5955188	1			
NAR	0.6129186	0.4809126	1		
TT	0.86113036	0.8355537	0.82779306	1	
Móviles	0.42910343	0.45755876	0.39848522	0.51032184	1

HOST= Test hiposmótico, NAR = Integridad del Acrosoma, TT= Triple Test

5. Discusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se pueden evidenciar que las células espermáticas ovinas son especialmente sensibles al daño por frío y toxicidad al glicerol, factor que observó en el tiempo de la investigación (Hammerstedt, Gram. & Nolan, 1990, Rubio, 2017); así como la conservación a 5 °C causó un marcado deterioro en la membrana plasmática y acrosomal de los espermatozoides ovinos (Zhu & Liu, 2000), esto se observó en los parámetros de la motilidad individual y vitalidad que se van disminuyendo a medida que pasaron las horas de Evaluación (Foote & Parks 1993; Guillaume, Sabido, Durand & Levy, 2004).

Los cambios que ocurrieron durante el almacenamiento que se hace a 5°C incluyeron la reducción en el parámetro de motilidad de integridad morfológica del espermatozoide esto lo podemos observar cuando miramos las tres variables evaluadas vitalidad, integridad de la membrana y integridad del acrosoma estos cambios se debieron a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo principalmente de especies reactivas de oxígeno (ros) que formaron una peroxidación de las membranas tanto la membrana acrosómica, como la membrana espermática de la célula ovina. (Córdova & Guerra, 2008; Hernández, 2017)

A medida que las horas pasan en la investigación como se menciona anteriormente (h0) y al paso de la investigación (48h) se ven aumentados por el deterioro de la membrana debido a la separación de las fases lipídicas en esta membrana estos daños son irreversibles generando radicales libres de oxígeno (ROS) y a su vez estos ROS hacen las injurias a la membranas de la célula espermática, llegando a la muerte de la célula (Osorio, Giraldo, Mesa, Gómez & Henao, 2007).

El objetivo de la investigación es generar una técnica que de manera rápida determine el estado del acrosoma y se corrija desde el momento en que está fresco, hasta el momento que se refrigera para evaluar su uso en proceso de inseminación o de monta artificial. (Dorado, 2003)

Sin embargo, autores como Quintero (2003) y Osorio et al., (2007) determinan que cuando un semen posee más del 80% de normozoospermia (Espermatozoides normales) se consiguen las más altas tasas de fertilidad. Es por ello que autores como Rodríguez (2000) y Rubio et al., (2007) mencionan la importancia de las características seminales clásicas y en el estudio se valida el uso de una técnica rápida y de gran importancia por ello se debe correlacionar esta nueva técnica con estudios in vivo de la fertilidad en semen ovino.

En la investigación el macho cuatro demostró diferencias significativas al aplicar el test hiposmótico. Estando de acuerdo con lo que dice Osorio (2013), define que la presión osmótica (150 mOsm/L) cuando se usa el test hiposmótico que no es lo suficientemente baja para inducir que los espermatozoides a que reaccionen adecuadamente, las variaciones de cada macho se deben desde la formación por el líquido testicular hasta la eyaculación por el plasma seminal estos cambios se puede deber a la bioquímica particular de cada macho debido a alimentación, manejo, temperatura o condiciones anatómicas (Rubio 2017). Los mismos resultados los obtiene Carrillo & Hernández (2016) en semen de ovejo criollo donde se observa las diferencias entre los machos debido a la disparidad o a la ubicación de esos machos en diferentes zonas de estudio durante la investigación.

Cuando aplicamos el triple test in vivo observamos la correlación positiva entre las tres variables (vitalidad, integridad funciona, integridad acrosomal) más sin embargo en la investigación de Borreto et al (2002) ellos obtienen en los porcentajes de HOST con la motilidad

progresiva y la vitalidad no tiene una correlación con la preñez. Pero en el estudio de Carrillo y Hernández (2016), presentaron una correlación positiva entre las variables estudiadas y la preñez, lo anterior se puede explicar a la presencia de cambios morfológicos en la cola de los espermatozoides que es un indicador de la integridad funcional de la membrana acrosomal externa y la cabeza de los espermatozoides la cual es imprescindible para la reacción acrosómica y la penetración del ovocito en el momento de la fecundación.

Además, estudio realizados por Tartaglione & Ritta, (2004) y Hernández et al, (2018) observaron el efecto detrimental de la refrigeración y el glicerol a medida que pasan las horas, estos daños ocasionan un hinchamiento en la membrana por el cambio de la fluidez del contenido citoplasmático de la célula espermática, alteraciones en el flujo de calcio y cambios de la actividad enzimática que puede inducir a la capacitación espermática o a la no reacción acrosómica efectos que se observaron durante esta investigación.

Una de las discusiones importantes que se dio en la sustentación fue la tabla de correlaciones, como cada una de las pruebas aporta a la evaluación de la calidad, pero se cuestionó para que hacer las tres si una sola podría ser indicadora ya que todas guardan correlación, discutimos que aunque esto es así, la correlación es mas alta entre el triple test y las demás, de manera que el triple test puede ser considerado una evaluación integral que da un porcentaje de confiabilidad mayor al establecer la calidad de una muestra.

El presente trabajo enfrente a las células espermáticas ovinas a un medio diluyente con glicerol y a una disminución de temperatura. Este almacenamiento conllevó un detrimento bioquímico, funcional y ultra estructural del espermatozoide Montoya, (2016) recuerda que la conservación espermática es una técnica que consiste en mantener gran variedad de células a baja

temperatura sin perder su viabilidad y utilidad en el proceso de la fertilidad y que tiene como objetivo inhibir la actividad metabólica de la célula seminal, garantizando su vitalidad y funcionalidad a través del tiempo, para permitir su motilidad por el tracto uterino y lograr su reacción acrosómica antes de su encuentro con el ovocito para poder atravesar la corona radiada y la zona pelúcida para empezar la singamia que dará origen a un nuevo cigoto (Cruz et al , 2006).

6. Conclusiones

La aplicación del Test de vitalidad se realizó con éxito, donde la respuesta del material seminal en las primeras horas de colecta (0h) fue óptima. Sin embargo, se observó un descenso progresivo en esta variable durante las siguientes horas de evaluación (24h y 48h).

El test hiposmotico aplicado al material seminal ovino presentaron diferencias estadísticas significativas entre los machos, y se observaron diferencias significativas al momento que pasan las horas de investigación (0h, 24h, 48h).

La evaluación de la integridad acrosomica de los espermatozoides ovino, no mostro diferencias estadísticas significativas para los machos, mientras si se observaron diferencias significativas al momento que pasan las horas en el proceso investigativo (0h, 24h, 48h).

El triple test demostró ser una escala de valores (adimensional) que puede ser utilizada para futuras investigaciones en el segmento andrológico. También se evidencio que se puede emplear en evaluaciones seminales para el control de calidad seminal en los laboratorios comerciales.

Al correlacionar estadísticamente las variables que componen el triple test se observó una correlación positiva sobre la variable de triple test, de igual manera el triple test se correlaciona con la motilidad espermática, razón por la cual se debe seguir investigando en este nuevo parámetro.

La evaluación del triple test en semen ovino es una prueba especializada de control de calidad seminal y complementa de manera sustancial las pruebas de evaluación seminal existentes en laboratorio; además, permitirá conocer más sobre la calidad de un eyaculado.

La fórmula escalar con relación a las variables estudiadas, puede clasificar la muestra seminal según pasan las horas y la toxicidad del glicerol, exponiendo la capacidad al lograr una buena refrigeración, pudiéndose usar para pronosticar el potencial reproductivo de un macho reproductor.

Sin embargo, la estimación real de la evaluación seminal de un macho se podrá obtener sólo mediante la comparación de los resultados de fertilidad obtenidos en campo

7. Recomendaciones

Realizar la validación del Triple Test, con herramientas estadísticas que permitan hacer un referente tanto bibliográfico como en la práctica a nivel de campo y de laboratorios; teniendo en cuenta las otras células espermáticas de las especies domésticas de carácter zootécnico.

Efectuar un nuevo estudio, con células espermáticas ovinas cambiando el medio de dilución seminal (yema de huevo o lipoproteína de lecitina de soya) y sin la inclusión del crioprotector (glicerol), para tener un referido de comparación, con las mismas tinciones y procesos usados en esta investigación.

Evaluar los datos del Triple Test, en la especie ovina, con la variable de fertilidad para evaluar su efectividad In Vivo, de manera que se genere una confirmación con los parámetros evaluados In Vitro.

Referencias Bibliográficas

- Aisen, E. (2004). Reproducción ovina y caprina. 1 ed. Intermédica, Buenos Aires, 216 p.
- Borroto, J; Gibbones, A; Bunge, M; Cueto, M. & Bidinost, F. (2002). Calidad seminal post-desco gelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos. *Revista Medicina Veterinaria* 83:185-188.
- Buzón, A. (2014). Análisis cinético del espermatozoide del caballo bajo el sistema Sperm Class Analyzer. Tesis Doctoral. Universidad de Córdoba.
- Carrillo, D. & Hernández, D. (2016). Caracterización seminal de individuos ovinos criollos colombianos de pelo en el departamento de Sucre. *Rev Colombiana Cienc Anim* 2016; 8(2):197-203.
- Córdova, A., Córdova, M., Córdova, C. & Guerra, J. (2008). Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras *Rev. Vet.* 19 (1): 67–79.
- Correa, J. & Zavos, P. (1994). The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 42, pp.: 351-360.
- Cruz, P., Medina, V., Robles, C. & Velasco, Y. (2006). Evaluación de diferentes crioprotectores para la crioconservación de espermatozoides de yamú (*Brycon amazonicus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias.* 19(2):153-159.
- Cueto, M.; Gibbons, A.; Garcia, J.; Wolff, M. & Arrigo, J. (2010). Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Instituto Nacional de Tecnología

Agropecuaria. Gobierno de Argentina. Buenos Aires, Argentina.

Dorado, J. (2003). Respuesta a la congelación-descongelación del esperma de macho cabrío.

Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. Facultad de Veterinaria.

Dorado, J., Hidalgo, M., Muñoz, A. & Rodríguez, I. (2009). Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples.

Animal Reproduction Science 112 : 150–157.

Fiser, P., Ainsworth, L. & Lanoford, G. (1981). Effect of osmolarity of skim milk diluents and thawing rate on cryosurvival of ram spermatozoa. *Rybiology*. 18: 399-403.

Foote, R. & Parks, J. (1993). Factors affecting preservation and fertility of bull semen: A brief review. *Reprod Fert Dev* 5: 665-673.

Foxcroft, G., Dyck, M., Ruiz, A., Novak, S. & Dixon W. (2008). Identifying useable semen. *Theriogenology* 70(8):1324-36.

Gonzales, O. & Martinez J. (2016). Evaluacion del pocentaje de preñez en ovejas por inseminacion con semen congelado y semen congelado diluido con tcm 199. Tesis UNISALLE, 56 p.

Grajales, H; Tovio, N. & Duica A. (2011). Guía técnica de producción ovina y caprina: Manejo y control reproductivo. Bogotá: Corpoica.

Gravance, C. & Davis, R. (1995). Automated Sperm Morphometry Analysis (ASMA) in the Rabbit. *Journal Andrology*. 16:88-93

- Guillaume, M; Sabido, O; Durand, P. & Levy, R. (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol Reprod* 71: 28-37.
- Hafez, B. (2003). *Reproduction in farm animals*. USA: Baltimore.
- Hammerstedt, R., Graham, J. & Nolan, J. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88.
- Hernández, A. (2011). Valoración funcional de semen criopreservado de toros mediante análisis computarizado e integridad de la cromatina espermática. Tesis Doctoral, UCV. Maracay.
- Hernández, C., Fernández, C. & Baptista, P. (2012). *Metodología de la investigación*. México: Mcgraw-hill interamericana.
- Hernández, L. (2017). Efecto de la criopreservación sobre los parámetros de calidad espermática en semen caprino. *Rev. investig. vet.* 29(3), 1.
- Hernández, L., Dorado, J., Quintero, A., Ortiz, I., Buzón A., Corzo, M. & Hidalgo, M. (2014). Efecto de dos diluyentes a base de lecitina de soya sobre parámetros morfométricos en semen caprino. *Revista Sennova*. Vol. 1, No. 1. 30-43
- Hernandez, L., Paez, J., Quintero, A. & Rubio, J. (2017). Efecto de diferentes niveles de prostfector de diferentes niveles de prostaglandina (Dinoprost y Cloprostenol) y glicosaminoglicanos (ácido hialurónico) en la motilidad, postdescongelación de espermatozoides bovinos. *Rev Agrop. Y Agroindustrial la Angostura*. 3(3)1.

Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sanz, J., Soler, C., (2005). Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med –Czech.* 50, 24-32.

Jin M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabed, M., Satouh, Y., Baba, S., Chiba, K. & Hirohashia, N. (2011). Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zone pellucida during in vitro fertilization. *PNAS* 108 (12): 48924896.

Lossano, M. (2014). Evaluacion Funcional de espermatozoides porcinos preservados bajo condiciones de refrigeracion mediante el diseño de diluyentes alternativos. Proyecto de tesis maestria. Universidad del zulua.

Montoya, J. (2016). Congelación de semen de asnos criollos colombianos empleando diferentes alternativas de suplementación en los diluyentes. Tesis maestría. Universidad Nacional de Colombia.

Oliveira, L.; Corona, M. & Das Neves, P. (2010). Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria* 32:146-150.

Osorio, C. (2013). Valoración computarizada de la integridad funcional de la membrana plasmática, movilidad y morfología espermática en semen criopreservado de Búfalo. Tesis maestría. Universidad del Zulua. 106 p.

Osorio, R., Giraldo, J., Mesa, H., Gómez, G. & Henao, F. (2007). Evaluación de la integridad acrosómica en semen de verraco. *vet.zootec.* 1(1): 41-47 Recuperado de: http://vetzootec.ucaldas.edu.co/downloads/Revista1_7.pdf.

Pursel, V., Jhonson, A. & Rampacek, B. (1972) Acrosome Morphology of boar spermatozoa

incubated before cold shock. *Journal of Animal science*. 34:2;278-283.

Quintero, A. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de veterinaria (Tesis Doctoral). 164 pp.

Quintero, A., Miró, J., Rigau, T. & Rodríguez, J. (2003). Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology*. 59, 1973-1990.

Reproducción Asistida. (2019). Reproducción asistida. Recuperado de:
<https://www.reproduccionasistida.org/>

Rodríguez, H. (2000). Evaluación de semen congelado: Métodos Tradicionales y de Actualidad. Internacional Veterinary Information Service (www.ivis.org). Ithaca, New York, USA.

Rota, A., Penzo, N., Vicenti, L., & Mantovani, R. (2000) Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*.53: 1415-1420.

Rubio, J. (2017). Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de espermatozoides ovinos bajo condiciones tropicales. Tesis Doctoral. Universidad del Zulia. 153 p.

Rubio, J; González, D; Garde, J; Esteso, M; Fernández, M; Rodríguez, J; Madrid, N. & Quintero, A. (2007). Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Dom Ani*, 42: 354-357

Santiago, J., Coloma, M., Dorado, J., Pulido, A., Gómez, F. & Salas, R. (2009). Cryopreservation

of Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) sperm obtained by electroejaculation outside the rutting season. *Theriogenology*; 17: 1253–60.

Senger, P. (2003). The organization and function of the male reproductive system; pathways to pregnancy and Parturition. 4th. 44-79.

Tamuli, M. & Watson P. (1992). Effects of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress and hypoosmotic stresses in boar spermatozoa incubated for up 24 hours. Proc. 12th ICAR Congress. The Hague. Pp 1484-1486.

Tartaglione, C. & Ritta, N. (2004). Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 62(7): 1245-1252.

Varisli, O; Uguz, C. & Agca C. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisosmotic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction science* 110: 256-268.

Zhu, W. & Liu, X. (2000). Cryodamage to plasma integrity in head and tail region human sperm. *Asian J Androl* 2: 135-138.

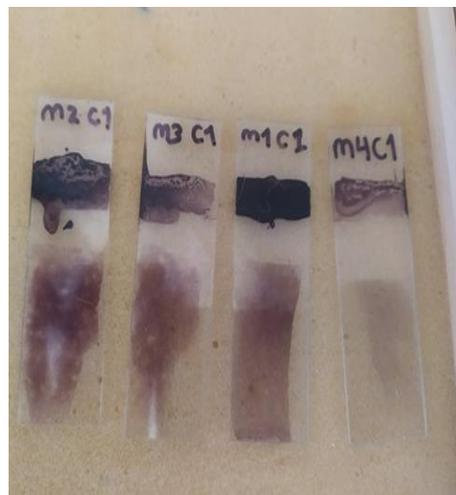
ANEXOS

Anexo 1. Registro fotográfico

Prueba de Vitalidad



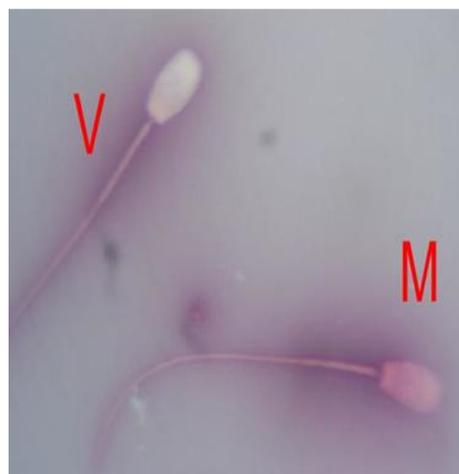
15 μ L de semen y 15 μ L de Eosina Nigrosina



Barrido en la placa



Microscopio de luz blanca a 400X



Espermatozoide vivo (V) y muerto (M)

Integridad funcional de la membrana plasmática (HOST)



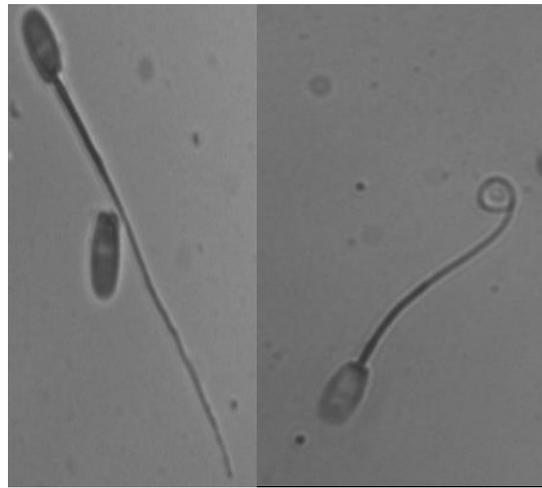
Sacarosa en 100 ml de Agua



Preparación del HOST: 0,9 g de
15 μ L de semen y 15 μ L de HOST



Microscopio de luz blanca a 400x.



Espermatozoide con la cola lineal: No funcional.
Espermatozoide con la cola curva: Funcional.

Evaluación de la integridad del Acrosoma



Tinción Diff-Quick



NAR, Capuchón Apical Normal

Motilidad Espermática



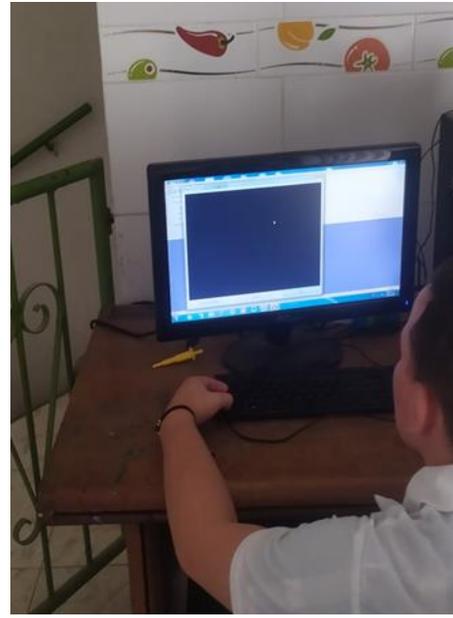
Software: ISAS



Cámara Spermatrack



Microscopio De Campo Oscuro



Lectura en el Software: ISAS