

ESCUELA POLITECNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

IASA I

**“IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL LAPAROSCÓPICA Y TRANSCERVICAL CON
SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN OVINOS DE LA HACIENDA
“AGRÍCOLA PURA VIDA” UBICADA EN LA PROVINCIA DE
SANTA ELENA”**

PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME

**INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGROPECUARIO**

SANGOLQUÍ- ECUADOR

2012

RESUMEN

En la Hda. “Agrícola Pura Vida”, ubicada en el cantón Santa Elena, Provincia de Santa Elena, se implementaron las técnicas de Inseminación Artificial Laparoscópica y Transcervical ovina con semen fresco y congelado, con la finalidad de comparar la efectividad de las mismas, expresada en el porcentaje de preñez obtenido en las hembras inseminadas. Así mismo, se realizó el análisis de calidad seminal de 3 reproductores, en el cual se midieron las variables: volumen, concentración, motilidad masal y aspecto. Este análisis presentó diferencias estadísticas significativas, y demostró que el carnero 1 obtuvo la mejor calidad seminal con respecto a los carneros 2 y 3, por tal motivo éste semen fue utilizado en el programa de inseminación artificial. Las hembras seleccionadas, de raza Pelibuey y Dorper, fueron distribuidas en tres tratamientos, a razón de 13 animales por tratamiento: I.A Transcervical con semen fresco (T1), I.A Laparoscópica con semen fresco (T2) e I.A Laparoscópica con semen congelado (T3). Las hembras fueron incluidas en un protocolo de sincronización de celos, el cual tuvo un intervalo de dos días entre tratamientos para facilitar el manejo de las ovejas. La sincronización de celos se realizó con esponjas intravaginales y fueron colocadas durante un período de 12 días, a cuyo término, se aplicó vía intramuscular 250 U.I de eCG a cada hembra. La determinación de preñez se realizó mediante ecografía abdominal 45 días después de la inseminación. Los resultados de los porcentajes de preñez obtenidos no presentaron diferencias estadísticas significativas, y éstos fueron: 77% para T1, 62% para T2 y 54% para T3. Por lo expuesto, se concluye que las técnicas de Inseminación Artificial Ovina implementadas, mostraron una efectividad aceptable,

pudiendo ser empleadas en cualquier ganadería ovina con características similares a las descritas en la presente investigación.

SUMMARY

Techniques Laparoscopic and Transcervical Artificial Insemination of sheep with fresh and frozen semen were implemented at Hda. “Agrícola Pura Vida” located in canton Santa Elena, in order to compare its effectiveness, expressed in the pregnancy percentage obtained in inseminated females. Likewise, seminal quality analysis of 3 males was performed, in which the variables measured were volume, concentration, mass motility and appearance. This analysis showed statistically significant differences, and showed that ram number 1 had better seminal quality over rams 2 and 3; therefore this semen was used in the artificial insemination program. Selected females, Pelibuey and Dorper breeds, were distributed in three treatments, with 13 animals each: A.I. Transcervical with fresh semen (T1), A.I. Laparoscopic with fresh semen (T2) and A.I. Laparoscopic with frozen semen (T3). Females were included in an estrus synchronization protocol, which had an interval of two days between treatments to ease the handling of the sheep. Estrus synchronization used intravaginal sponges that were placed for 12 days. On 12th day, intramuscularly 250 IU eCG each female was applied. Pregnancy was determined by abdominal ultrasound 45 days after insemination. Results of pregnancy percentages obtained did not differ statistically significant, and these were: 77% for T1, 62% for T2 and 54% for T3.

For the above, concludes that techniques of Artificial Insemination implemented, showed an acceptable effectiveness, and may be used at any sheep flock with similar characteristics described in this investigation.

CERTIFICACIÓN

Ing. Diego Vela T.

Dr. Joar García F.

Certifican:

Que el presente trabajo titulado “IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL LAPAROSCÓPICA Y TRANSCERVICAL CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN OVINOS DE LA HACIENDA “AGRÍCOLA PURA VIDA” UBICADA EN LA PROVINCIA DE SANTA ELENA”, realizado por PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME que lo entregue a la Ing. PATRICIA FALCONÍ, en su calidad de Coordinadora de Carrera.

El Prado, 13 de Diciembre del 2012.

Ing. DIEGO VELA T.

DIRECTOR

Dr. JOAR GARCÍA F.

CODIRECTOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME

Declaro que:

El proyecto de grado denominado **“IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL LAPAROSCÓPICA Y TRANSCERVICAL CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN OVINOS DE LA HACIENDA “AGRÍCOLA PURA VIDA” UBICADA EN LA PROVINCIA DE SANTA ELENA”** ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía.

Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

El Prado, 13 de Diciembre del 2012.

PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME

AUTORIZACIÓN

Yo, PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo **“IMPLEMENTACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL LAPAROSCÓPICA Y TRANSCERVICAL CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO EN OVINOS DE LA HACIENDA “AGRÍCOLA PURA VIDA” UBICADA EN LA PROVINCIA DE SANTA ELENA”**, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

El Prado, 13 de Diciembre del 2012.

PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME

DEDICATORIA

A mi Madre, que desde el cielo se convirtió en mi ángel de la guarda, y ha guiado mi camino para convertirme en una mujer de bien.

A mi familia, por ser un ejemplo de unidad y amor y el motor que me impulsa a seguir día a día cumpliendo mis sueños.

Paulina Cevallos Jácome

AGRADECIMIENTO

A Dios, por bendecir cada uno de mis pasos y guiar mi camino y por quién es posible disfrutar el maravilloso don de la vida.

A la Hacienda Agrícola Pura Vida, y de manera especial al Ing. Javier Palacios y al Ing. Pablo Herrera, profesionales a cargo del Proyecto Ovino, quienes con su invaluable ayuda y calidad humana, hicieron posible la realización de este trabajo, que lo llevaré en el corazón como una gran experiencia personal y profesional.

A mis maestros, por sus enseñanzas, y de manera especial al Ing. Diego Vela, Dr. Joar García e Ing. Lenin Ron directores y colaborador de este trabajo de investigación.

A mis amigos, por su cariño y apoyo incondicional en los momentos más importantes de mi vida.

Paulina Cevallos Jácome

HOJA DE LEGALIZACIÓN

ELABORADO POR

PAULINA FERNANDA CEVALLOS JÁCOME

**DIRECTORA DE LA CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS**

Ing. PATRICIA FALCONÍ

DELEGADO UNIDAD DE ADMISIÓN Y REGISTRO

Abg. CARLOS OROZCO

El Prado, 13 de Diciembre del 2012.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	OBJETIVOS.....	2
III.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1	FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN OVEJAS.....	5
3.1.1	Proceso de maduración de los Folículos ováricos y de los Oocitos.....	5
3.1.2	Ciclo estral.....	7
3.1.2.1	Fase folicular.....	8
3.1.2.2	Fase luteal.....	9
3.1.2.3	Celo.....	10
3.1.3	Estación Reproductiva.....	10
3.2	MÉTODOS DE CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN.....	12
3.2.1	Nutrición (<i>flushing</i>).....	12
3.2.2	Sincronización de Celos.....	13
3.2.2.1	Métodos farmacológicos para sincronizar el celo.....	14
3.2.2.1.1	Métodos de los progestágenos.....	15
3.2.2.1.2	Métodos de prostaglandinas sintéticas.....	17
3.2.2.2	Método natural.....	19
3.2.3	Luminosidad.....	20
3.3	FISIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN CARNEROS.....	21
3.3.1	Producción de Esperma (Espermatogénesis).....	21
3.3.2	Control hormonal de la función testicular.....	21
3.3.3	Cubrición y Eyaculación.....	23
3.4	SELECCIÓN DE REPRODUCTORES.....	24
3.4.1	Selección de Ovejas para ser utilizadas en Programas de I.A.....	24
3.4.1.1	Preparación de las ovejas para I.A.....	26
3.4.1.2	Identificación de las hembras.....	27
3.5	EL SEMEN Y SUS COMPONENTES.....	29
3.5.1	Plasma Seminal.....	30
3.5.2	Espermatozoides.....	30
3.5.2.1	Composición espermática.....	31
		32

3.6	FACTORES QUE ALTERAN LA CALIDAD SEMINAL.....	32
3.6.1	Temperatura.....	32
3.6.2	pH.....	33
3.6.3	Presión Osmótica.....	33
3.6.4	Luz.....	33
		34
3.7	MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE SEMEN.....	34
3.7.1	Colecta de semen con vagina artificial.....	34
3.7.1.1	Entrenamiento de machos para recolección de semen.....	35
3.7.1.1.1	Aspectos a considerar.....	37
3.7.1.2	Frecuencias de colecta con vagina artificial.....	38
3.7.2	Colecta de semen con electroeyaculador.....	38
		40
3.8	MÉTODOS DE EVALUACIÓN SEMINAL.....	41
3.8.1	Valoración Macroscópica.....	41
3.8.1.1	Color o Aspecto.....	41
3.8.1.2	Volumen.....	42
3.8.1.3	pH.....	43
3.8.2	Valoración Microscópica.....	43
3.8.2.1	Motilidad.....	44
3.8.2.1.1	Motilidad masal.....	44
3.8.2.1.2	Motilidad individual.....	45
3.8.2.2	Concentración.....	46
3.8.2.2.1	Cámara de Neubauger.....	47
3.8.2.3	Morfología (anormalidades).....	48
3.8.2.4	Conteo de vivos y muertos.....	49
		50
3.9	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.....	50
3.9.1	Semen para I.A.....	50
3.9.1.1	Semen Fresco.....	50
3.9.1.1.1	Tasas de fertilización.....	52
3.9.1.2	Semen Congelado.....	53
3.9.2	Dosis de Inseminado.....	54
3.9.3	Manipulación y evaluación del semen.....	55
3.9.3.1	Diluyentes y dilución del semen.....	57
3.9.4	I.A Laparoscópica.....	57
3.9.5	I.A Transcervical.....	60
		62
3.10	DETECCIÓN DE PREÑEZ EN OVEJAS MEDIANTE ECOGRAFÍA.....	
3.10.1	Ecografía Transrectal.....	63
3.10.2	Ecografía Abdominal.....	64

IV.	METODOLOGÍA.....	65
	
4.1	UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	65
4.2	MATERIALES.....	66
4.3	MÉTODOS.....	68
4.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	81
4.5	VARIABLES A MEDIR.....	81
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	83
		100
V.I	CONCLUSIONES.....	
VII.	RECOMENDACIONES.....	102
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo hormonal de la hembra.....	4
Figura 2. Regulación hormonal de la hembra.....	5
Figura 3 Representación esquemática del crecimiento de los folículos ováricos.....	6
Figura 4. Alimentación del hato ovino.....	12
Figura 5. Distribución esquemática de la presentación de los estros según la dosis de PMSG en ovejas Merino tratadas con esponjas intravaginales con progestágenos.....	16
Figura 6. Inserción de la esponja dentro de la vagina con la ayuda de un aplicador.....	17
Figura 7. Distribución de la presencia de los estros retorno en ovejas merino tratadas con prostaglandinas.....	18
Figura 8. Macho estimulado por la presencia de una hembra en celo.....	24
Figura 9. Selección de ovejas para I.A.....	25
Figura 10. Conformación estructural del espermatozoide.....	31
Figura 11. Vagina artificial, camisa y copa de recolección para semen.....	35
Figura 12. Recolección de semen con vagina artificial.....	36
Figura 13. Volumen de eyaculado ovino.....	42
Figura 14. Cuadrícula de la Cámara de Neubauger.....	48
Figura 15. Esquema de I.A. Intrauterina vía Laparoscópica.....	58
Figura 16. I.A Laparoscópica.....	60
Figura 17. Esquema de I.A Transcervical.....	61
Figura 18. I.A Transcervical.....	62
Figura 19. Ecografía Adbominal.....	64
Figura 20. Materiales utilizados para extracción y evaluación seminal.....	68
	69

Figura 21. Prácticas en la fase de entrenamiento.....	71
Figura 22. Revisión de anemia y Condición Corporal.....	71
Figura 23. Identificación de las hembras con color rojo, amarillo y verde respectivamente de acuerdo a cada tratamiento.....	73
Figura 24. Colocación de esponjas vaginales.....	75
Figura 25. Retiro de esponjas vaginales.....	75
Figura 26. Extracción seminal.....	77
Figura 27. Detección de preñez mediante ecografía abdominal.....	80
Figura 28. Cotiledones de ovejas a los 50 días de gestación.....	80
Figura 29. Promedio de Volumen de Eyaculado.....	84
Figura 30. Valoración del Aspecto Seminal.....	86
Figura 31. Valoración de Motilidad Masal Seminal.....	87
Figura 32. Concentración espermática.....	89
Figura 33. Porcentaje de Preñez T1.....	92
Figura 34. Porcentaje de Preñez T2.....	93
Figura 35. Porcentaje de Preñez T3.....	94
Figura 36. Porcentaje de Preñez entre Tratamientos.....	95
Figura 37. Porcentaje de Preñez por Raza.....	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración espermática en base al color del semen.....	41
Tabla 2. Escala de valoración de motilidad masal.....	45
Tabla 3. Escala de valoración de motilidad individual.....	46
Tabla 4. Resultados obtenidos en la Inseminación Artificial utilizando semen fresco y congelado.....	54
Tabla 5. Volúmenes recomendados para Inseminación.....	55
Tabla 6. Número mínimo de seguridad de espermatozoides móviles en inseminado con diferentes técnicas (número expresado en millones).....	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación de medias de Volumen de eyaculado.....	83
Cuadro 2. Aspecto seminal.....	85
Cuadro 3. Motilidad masal.....	87
Cuadro 4. Concentración espermática.....	88
Cuadro 5. Porcentaje de preñez por Tratamiento.....	91
Cuadro 6. Comparación de Efectividad entre Tratamientos.....	94
Cuadro 7. Porcentaje de Preñez por Raza.....	96
Cuadro 8. Costos de Inseminación Artificial Transcervical con semen fresco.....	97
Cuadro 9. Costos de Inseminación Artificial Laparoscópica con semen fresco.....	97
Cuadro 10. Costos de Inseminación Artificial Laparoscópica con semen congelado.....	98

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la inseminación artificial ovina ha adquirido una amplia difusión, debido a que esta técnica se ha ido perfeccionando constantemente, su auge se debe, al aprovechamiento integral que se puede lograr de un buen carnero padre, y obtener del mismo, muchas más crías que las que se conseguirían mediante la monta natural (Sánchez, 2004).

Según el III Censo Nacional Agropecuario, publicado en el año 2002 por el Servicio de Información y Censo Agropecuario SICA, la población ovina del Ecuador estaba constituida por un total de 1,1 millones de animales en todo el país. Actualmente, los expertos en la crianza de ovinos calculan en 1,7 millones (Revista Líderes Emprendedores, 2011).

La inseminación artificial es la práctica de manejo más valiosa para el productor de ganado. En el procedimiento se hace uso eficaz de la generosa dotación de espermatozoides disponibles de un macho, de manera que se incrementa considerablemente el progreso genético y se mejora en muchas ocasiones la eficiencia de la reproducción (Foote, 2002).

Según la especialista Cecilia Alcocer (2012), entre el 80 y 90% de esa población está en manos de las comunidades campesinas e indígenas; el porcentaje restante, en

manos de criadores privados. Las provincias de mayor densidad de ganado ovino son Chimborazo y Cotopaxi.

La diferencia entre la producción comunitaria y privada es que en el área rural se crían ovejas de manera tradicional, es decir, pastoreo y venta en ferias de corderos (ovejas jóvenes) y animales de unos tres años de edad. La explotación privada tiene una producción más tecnificada y obtiene animales para pies de cría (animales para reproducción).

Por estas razones y a pesar de las reconocidas bondades de la inseminación artificial en ovejas, la técnica ha tenido una aplicación bastante limitada en el Ecuador debido a la falta de técnicos calificados y a la difusión inadecuada de sus ventajas; así como también por la falta de políticas gubernamentales en este campo productivo que impulsen a los ovinocultores a mejorar sus hatos ganaderos.

La presente investigación se basa en la implementación de dos técnicas de inseminación artificial ovina con semen fresco y congelado realizada en la provincia de Santa Elena en la Hacienda Agrícola “Pura Vida”, además involucra la evaluación y valoración de muestras seminales obtenidas con vagina artificial de machos reproductores de la misma localidad, con la finalidad de proporcionar bases científicas y técnicas orientadas al desarrollo reproductivo del sector ovino.

II. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar las técnicas de Inseminación Artificial Laparoscópica y Transcervical con semen fresco y congelado en Ovinos de la Hacienda Agrícola “Pura Vida” ubicada en la Provincia de Santa Elena.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar el protocolo de inseminación artificial laparoscópica y transcervical con semen fresco y congelado previa sincronización de celo con progestágenos.

Determinar la calidad del semen ovino con pruebas macro y microscópicas para establecer el número de dosis por eyaculado.

Comparar el porcentaje de efectividad de las dos técnicas reproductivas utilizadas mediante ecografía abdominal.

Difundir los resultados y la metodología a los interesados para su conocimiento y aplicación mediante la elaboración de un artículo científico y la elaboración de un video demostrativo.

III. REVISION BIBLIOGRÁFICA

3.1 FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN OVEJAS

En las hembras ovinas la fisiología reproductiva se caracteriza por sufrir modificaciones cíclicas. Estos cambios cíclicos se denominan ciclo estral. La secreción cíclica de las hormonas en el ovario está regulada por las gonadotropinas de la adenohipofisis (FSH y LH), las cuales, a su vez, están controladas por GnRH sintetizada en el hipotálamo (Redondo, 2002).

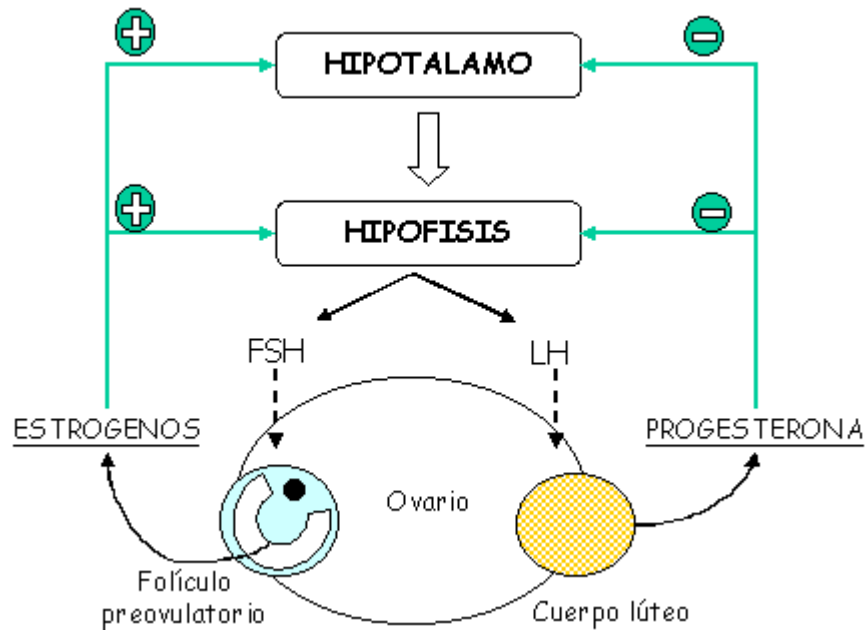


Figura 1. Ciclo hormonal en la hembra.

Fuente: Redondo, 2002.

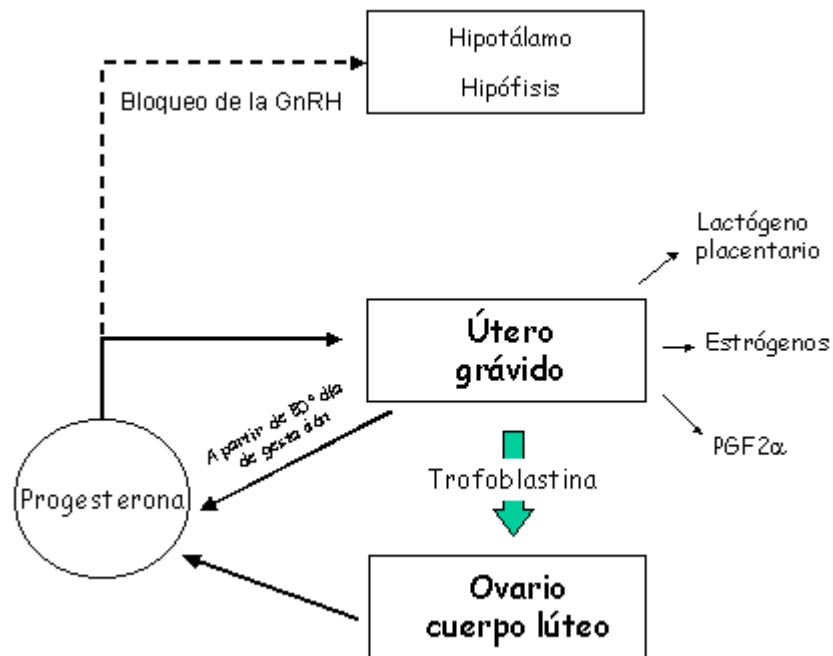


Figura 2. Regulación hormonal en la hembra.

Fuente: Redondo, 2002.

3.1.1 Proceso de Maduración de los Folículos Ováricos y de los Oocitos

Los ovarios de las hembras contienen, desde el nacimiento todos los huevos necesarios para su vida reproductiva, por tanto después del nacimiento no se producen más huevos. Lo contrario sucede en el macho, éste produce nuevos espermatozoides a lo largo del ciclo espermático, durante toda la vida de adulto (Durán, *et al.*, 2008).

Aún cuando sólo unas pocas docenas de huevos lleguen a ovular, los ovarios inicialmente contienen varios cientos de miles de huevos, muchos de ellos se

deterioran, particularmente en la edad temprana del animal, pero otros crecen y maduran después de la pubertad. Los pequeños huevos, llamados oogonias, situados en los ovarios de los fetos hembras son células diploides; en el periodo de crecimiento se los conoce como oocitos primarios. Cada oocito primario se encuentra rodeado por una delgada capa de células planas que juntas forman un folículo primario (Hafez, 2000).

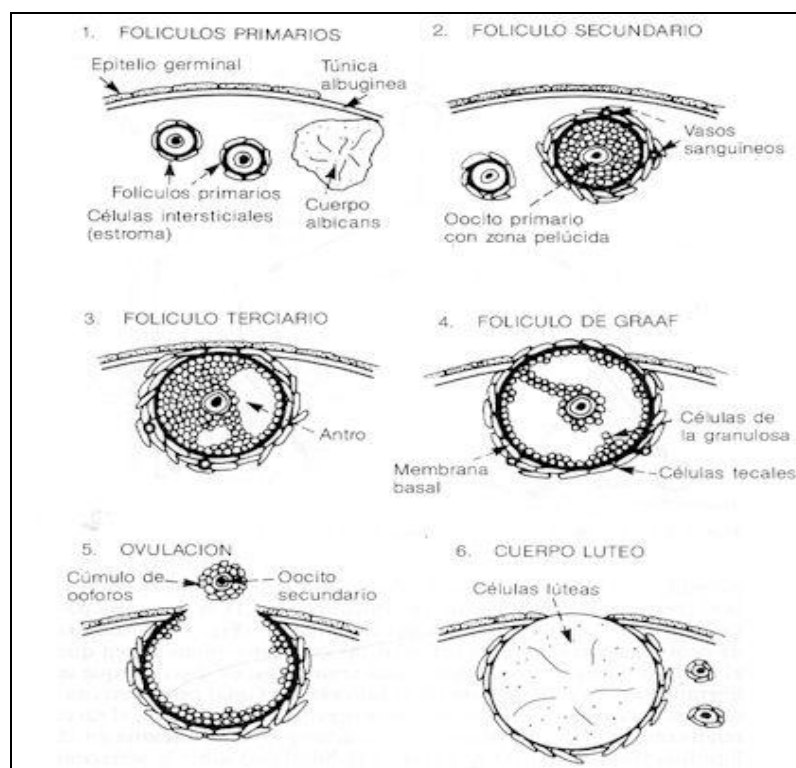


Figura 3. Representación esquemática del crecimiento, desarrollo y luteinización de los folículos ováricos.

Fuente: Durán, *et al.*, (2008)

Los folículos primarios permanecen inactivos hasta la madurez sexual de la hembra, tiempo en el que alguno de ellos comienza a crecer. Este folículo aumenta

su tamaño y llega a convertirse en folículo secundario y consecuentemente en folículo terciario, provisto de antro. A medida que va madurando se convierte en folículo de Graaf. Durante la maduración final del folículo se completa la división meiótica extrayéndose el primer cuerpo polar. El oocito es ahora conocido con el nombre de oocito secundario, siendo en este estado cuando se rompe y libera el huevo en el proceso llamado ovulación. La segunda división meiótica sólo se completa cuando el huevo se activa después de ser penetrado por el espermatozoide y se extruye el segundo cuerpo polar (Durán, *et al.*, 2008).

3.1.2 Ciclo Estral

Se denomina ciclo estral al periodo transcurrido entre celos y en la oveja se presenta en intervalos regulares de 17 ± 1 día, a menos que haya quedado preñada (Hafez, 2002).

El ciclo estral se divide en 2 fases: folicular y luteal. La fase folicular es relativamente corta (3-4 días) y en ella se produce el crecimiento de los folículos; mientras que la fase luteal ocupa el resto del ciclo (14 días) y proporciona funcionalidad al cuerpo lúteo (Durán, *et al.*, 2008).

3.1.2.1 Fase folicular

El crecimiento folicular está regulado por dos hormonas, las gonadotropinas, que liberadas en el torrente sanguíneo por la glándula hipofisiaria, ejercen su acción en el ovario. Estas hormonas son la folículo estimulante (FSH) y la luteinizante (LH). La FSH estimula el crecimiento temprano de los folículos, mientras que la LH es necesaria para completar la fase final de su crecimiento (Gibbons y Cueto, 2004).

Durán, *et al.*, (2008) afirman que las gonadotropinas, además de provocar el crecimiento folicular, estimulan a los folículos en la secreción de estrógenos. Al principio, el nivel relativamente bajo de estrógenos en la sangre repercute en la hipófisis teniendo un efecto negativo (inhibitorio) sobre la secreción de gonadotropina. Esto evita un estímulo excesivo a los ovarios; sin embargo cuando el nivel de estrógenos es lo suficientemente alto se dispara la oleada de LH a partir de la hipófisis. Este llamado pico pre-ovulatorio de LH, provoca cambios en las paredes del folículo, determinando su ruptura y consiguiente liberación del óvulo, 18-24 horas más tarde.

El celo se presenta durante la última mitad de la fase folicular; los folículos maduros de Graaf son responsables de la producción de estrógenos que determinan los cambios anatómicos y de comportamiento asociados con el estro (Gibbons y Cueto, 2004).

3.1.2.2 Fase luteal

Después de la ovulación, el folículo de Graaf roto se llena por un coágulo de sangre constituyendo lo que se conoce con el nombre de cuerpo hemorrágico (Durán, *et al.*, 2008). Las células de la granulosa en la pared rota del folículo proliferan y se transforman en células luteínicas que llenan el antro del folículo. Al cabo de 4-5 días, se habrá formado un cuerpo sólido y amarillo, denominado cuerpo lúteo, responsable de la secreción de progesterona. Esta hormona prepara al útero para la anidación del embrión (Gibbons y Cueto, 2004).

El nivel de progesterona en la corriente sanguínea alcanza un máximo después de unos 6 días y permanece alto durante la gestación en caso de que la hembra haya concebido. Si la hembra no es capaz de concebir, transcurridos unos 11-12 días en la oveja, el cuerpo lúteo disminuye de tamaño, empalidece (cuerpo albicans) y comienza a descender la secreción de progesterona (Hafez, 2002). Con el decaimiento del nivel de progesterona sanguínea al final de la fase luteal, se inicia el crecimiento de nuevos folículos (Gibbons y Cueto, 2004).

La secreción de un agente luteolítico producido por el útero, denominada prostaglandina $F_2\alpha$, determina la pérdida de actividad biológica del cuerpo lúteo en las ovejas no preñadas. Esto es muy importante puesto que la administración

exógena de prostaglandinas sintéticas puede ser utilizada para sincronizar celos durante la estación reproductiva (Gibbons y Cueto, 2004).

3.1.2.3 Celo

El celo o estro es el período fértil del ciclo estral durante el cual la hembra manifiesta un comportamiento de actividad sexual. El estro ocurre en la mitad y el final de la fase folicular del ciclo, y tiene una duración entre 36 a 48 horas (Durán, *et al.*, 2008).

Según Gélvez (2010), las manifestaciones del estro son poco marcadas en las ovejas y los signos externos se manifiestan como: vulva sonrojada y edematosa; vulva húmeda con descarga de flujo vaginal transparente, blancuzco o cremoso; orina frecuente; balidos en repetidas ocasiones; intranquilidad; movimiento rápido de la cola hacia los lados y éste movimiento es más precipitado cuando están cerca del macho.

3.1.3 Estación Reproductiva

La actividad reproductiva de la especie ovina es poliéstrica estacional, caracterizada por una época del año en que la gran mayoría de las hembras presenta cíclicamente estros o celos (estación sexual), y otra época del año en que un porcentaje

variable de las mismas—según la raza- presenta inactividad sexual (anestro) (Gibbons y Cueto, 2004).

La duración de la estación de apareamiento varía con la duración del día, la raza y la nutrición. Esta estacionalidad es regida por el fotoperiodo; la actividad estrual comienza durante la época en que los días se hacen más cortos (Hafez, 2000). Los animales en condiciones precarias suelen mostrar periodos reproductores cortos, incluso pueden no mostrar estro (Durán, *et al.*, 2008).

Durán (2008), indica que en las regiones ecuatoriales, donde no existen cambios marcados de la duración del día, la actividad reproductiva puede ocurrir en cualquier momento del año, o puede estar relacionada con otros factores climáticos tales como temperatura o época de lluvias. Algunas razas tropicales o ecuatoriales pueden tener estaciones prolongadas, pero, por lo general, todas las razas suelen presentar un periodo de inactividad sexual cada año.

A comienzos de la estación reproductiva, las ovejas presentan generalmente una primera ovulación, no acompañada por su comportamiento sexual característico (celo silente), debido a la ausencia de un cuerpo lúteo previo. En algunos animales se presentan celos de una duración más corta que lo normal, como consecuencia de una regresión prematura del cuerpo lúteo. Por ambos motivos, el lapso de tiempo transcurrido entre los primeros celos que se manifiestan al inicio de la estación de cría es variable (Rangel, 2002).

3.2 MÉTODOS DE CONTROL DE LA REPRODUCCIÓN

3.2.1 Nutrición (*Flushing*)

Desde el punto de vista nutricional se ha logrado comprobar que diversos factores nutricionales tienen influencia sobre los procesos reproductivos. Dietas bajas en energía disponible pueden disminuir la tasa reproductiva al producir descenso en las tasas de ovulación, y dietas con alto contenido energético, que aumentan excesivamente las grasas corporales, reducen la reproductividad al disminuir las tasas de fertilización (Martínez, *et.al.*, 1999).



Figura 4. Alimentación del hato ovino.

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

El *flushing* consiste en aumentar los niveles de energía o proteína de la dieta en las hembras antes y durante la época de reproducción (monta natural o inseminación artificial), con el fin de influenciar positivamente el peso corporal, la condición corporal, la tasa de ovulación y el número de crías por parto. Alternativamente es posible mantener esta práctica nutricional 10 a 15 días después del apareamiento con miras a contribuir la adecuada implantación de los embriones en el útero, reduciendo la temprana mortalidad embrionaria (Cambero, 1999)

La condición corporal, parece tener una influencia significativa sobre los resultados del *flushing*, hembras con una condición corporal menor a los tres puntos responden de mejor manera comparadas con otras de mayor condición corporal. La mayoría de las investigaciones han tratado de relacionar la condición corporal con la tasa de ovulación, por ejemplo se ha planteado que las ovejas con condición corporal mayor a 4 en el momento del servicio tienden a una mayor incidencia de esterilidad mientras que, por otra parte las que poseen condición corporal menor de 3 al servicio responderán más a los efectos del *flushing*, que aquellas con condición corporal entre 3 y 3.5 (Bertot, *et.al.*, 2007).

3.2.2 Sincronización de Celos

Los métodos de sincronización de estros constituyen una herramienta de gran utilidad en los programas de inseminación artificial, ya que facilitan el manejo de los animales al evitar el encierro diario para la detección de celos naturales. Existen

varios métodos para sincronizar el estro y puede clasificarse en dos categorías principales: los farmacológicos y los naturales (Gibbons y Cueto, 2004).

Los métodos farmacológicos son más efectivos en sincronizar el celo, casi a la vez, en todas las hembras tratadas de un rebaño, prefijándose así el tiempo de la inseminación, aunque, su inconveniente es el costo de compra y administración del fármaco. El método natural es más barato, pero no agrupa estrechamente, a las hembras en estro y sólo se puede usar en varias regiones y en determinadas épocas del año (Durán *et al.* 2008).

3.2.2.1 Métodos farmacológicos para sincronizar el celo

Los métodos farmacológicos se pueden dividir en dos tipos, basados en los diferentes principios fisiológicos. El primer tipo se basa en la administración de progestágenos, para simular la acción de un cuerpo lúteo natural. El segundo se basa en la administración de prostaglandina sintética, para acortar la duración del cuerpo lúteo. El método de la prostaglandina depende de la presencia de cuerpo lúteo, y solo se puede utilizar en la época reproductiva; sin embargo, el de los progestágenos se puede utilizar en cualquier época del año (Durán *et al.* 2008).

3.2.2.1.1 Método de los progestágenos

Tanto la vía subcutánea como la intravaginal se han utilizado para administrar progestágenos exógenos. Por conveniencia y simplicidad es preferible el aparato intravaginal. Existen dos formas: las esponjas intravaginales y el CIDER (dispositivo liberador de sustancias Internamente controlado) (Adaptado de Durán *et al.* 2008).

La aplicación de esponjas intravaginales simulan la acción de un cuerpo lúteo mediante la liberación lenta de progesterona. Se colocan en la vagina de la hembra por 12-14 días, periodo de tiempo que iguala o excede la vida media del cuerpo lúteo (Evans y Maxwell, 1993).

Este método permite alcanzar una elevada concentración de celos y llevar a cabo la inseminación artificial a un tiempo fijo luego de finalizado el tratamiento hormonal. Así mismo, concentra los estros fuera de la estación productiva, permitiendo la producción de corderos en contra-estación (Bedolla, 2002).

Hafez (2002), recomienda que la eCG sea administrada por inyección intramuscular al momento de retirar las esponjas, en la estación reproductiva; o 48 horas antes del retiro, en el anestro estacional. La eCG

provoca un pico importante de estrógenos, induciendo la aparición de un pico preovulatorio de LH y la ovulación, al mismo tiempo mejora la sincronía de los celos.

Las dosis de eCG utilizadas para la sincronización en inseminación artificial varían entre 200 y 400 UI, dependiendo fundamentalmente del peso corporal, de la raza y de la época del año, aconsejándose probar en principio la dosis menor. Dosis elevadas de eCG ocasionan ovulaciones y gestaciones múltiples, generando altas pérdidas de animales por toxemia de la preñez y mortalidad perinatal (Gibbons y Cueto, 2004).

Según estudios realizados, entre las 24 y 72 horas post-retiro de las esponjas y aplicación de eCG, se presenta un 85-95% de las ovejas en celo, alcanzándose la mayor concentración de estros entre las 36 y 48 horas (Fig.5).

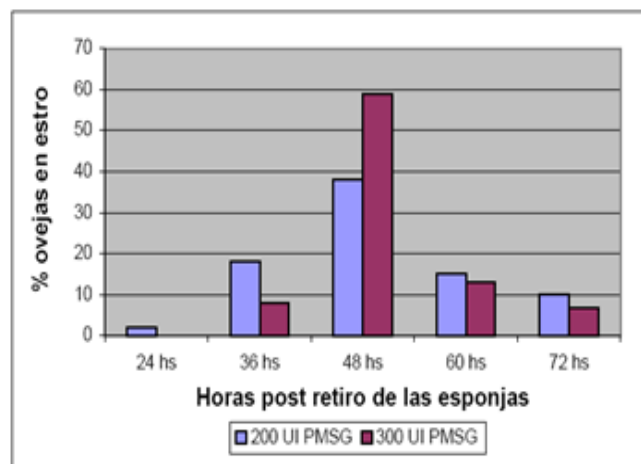


Figura 5. Distribución de la presentación de los estros según la dosis de PMSG en ovejas Merino tratadas con esponjas intravaginales con progestágenos.

Fuente: Gibbons y Cueto, 2004.

Cada esponja intravaginal lleva incorporada una cuerda para facilitar su retirada. Las esponjas se insertan dentro de la vagina con la ayuda de un aplicador, formado por un tubo de plástico y una varilla.



Figura 6. Inserción de la esponja dentro de la vagina con la ayuda de un aplicador.

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.2.2.1.2 Método de prostaglandinas sintéticas

Simulan la acción de la prostaglandina F₂ alfa, acortando la vida del cuerpo lúteo. Dado que los celos se presentan más dispersos que el tratamiento con esponjas, la inseminación artificial se realiza previa detección de celos (Gibbons y Cueto, 2004).

Las prostaglandinas inducen la regresión luteal entre los días 5 y 14 del ciclo estral en ovejas, con manifestación de celo entre las 48 y 84 horas de aplicada la inyección. (Rubianes y Ungerfeld, 2002).

Gibbons y Cueto (2004), recomiendan la administración de prostaglandinas en una sola aplicación, alcanzándose una concentración de celos del 65-75%. Debido a la menor fertilidad de los estros inducidos hormonalmente, es preferible inseminar sobre el segundo celo post-sincronización (celo natural), comenzándose con la detección de los celos a partir del día 16 post-aplicación y durante un periodo de 5 días (fig. 7).

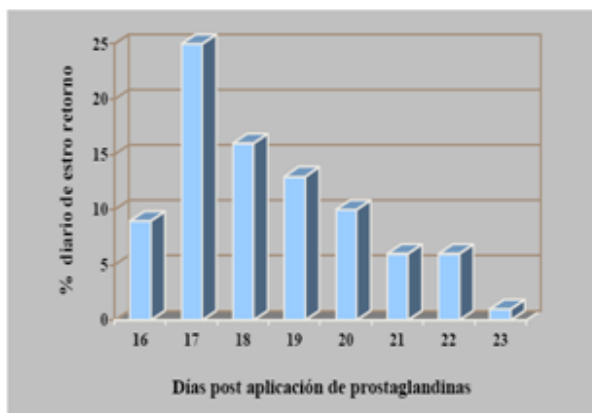


Figura 7. Distribución de la presentación de los estros retorno en ovejas Merino tratadas con prostaglandinas.

Fuente: Gibbons y Cueto, 2004.

3.2.2.2 Método natural (Efecto Macho)

La actividad sexual de las ovejas puede ser inducida al comienzo de la estación de cría, por la acción que sobre la fisiología reproductiva ejerce la incorporación de los machos a una manada de hembras que haya permanecido aislada de los mismos por un periodo mínimo de 4 semanas. Este estímulo sexual se denomina “efecto macho”. Si bien es un método económico, se observa una concentración de celos variables (Durán, *et al.*, 2008).

El conocimiento de este efecto puede ser importante para promover la salida de anestro en especies muy estacionales. Sin embargo, Cueto (1993), no recomienda su utilización para trabajos que requieren alta concentración de celos tales como la inseminación artificial.

La estimulación de celos tempranos como consecuencia de la incorporación del macho al rebaño reproductor permite adelantar el comienzo de la estación de cubrición. Cuando el macho es colocado con el rebaño de las hembras, un número considerable de éstas presenta celo 18 a 20 días después, lo que confirma el efecto estimulante de la presencia del macho (Álvarez y Andrade, 2008).

Por otro lado, para que la estimulación tenga lugar, la incorporación del macho debe realizarse después de que hayan transcurrido tres semanas desde el parto. El mecanismo por el que el factor “presencia del macho” induce la salida

en celo de las ovejas no se conoce con exactitud. La introducción de machos, ya sean vasectomizados o enteros, antes del comienzo de la estación de apareamiento, puede ser un método útil para adelantar la estación y en consecuencia la época de partos. La técnica tiene además la ventaja de asegurar una mayor sincronización de celos de la que se produce naturalmente (Buxadé, 1996).

3.2.3 Luminosidad

La luz es el principal factor ambiental que controla el comienzo natural del estro en la estación de apareamiento, que puede modificarse, mediante la aplicación de programas de iluminación artificial (Porrás, *et al.*, s/f)

La imposibilidad de mantener animales en un fotoperiodo estimulante de manera permanente impone la necesidad de alternar días largos y días cortos. Los días largos pueden ser reemplazados por la iluminación de la fase fotosensible situada alrededor de 16 horas después del amanecer; esta aplicación es posible en predios abiertos. Los días cortos pueden ser naturales, si los días largos cesan temprano en el año (en países de cuatro estaciones), o reemplazados por un implante de melatonina. Los tratamientos deben ser utilizados con una estimulación sexual, especialmente el “efecto macho”. En razas estacionales y en zonas templadas ambos sexos deben ser tratados. Estos tratamientos pueden ser asociados con tratamientos hormonales (Chemineau, *et al.*, 2003).

3.3 FISIOLÓGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN CARNEROS

3.3.1 Producción de Esperma (Espermatogénesis)

La producción de espermatozoides se realiza en los tubos seminíferos de los testículos. La primera liberación de espermatozoides móviles y fértiles ocurre después de la maduración sexual del macho (pubertad), aun que el proceso de la espermatogénesis comienza en la vida fetal. Al principio del desarrollo fetal, las células productoras de espermios, espermatogonias troncales, surgen a partir de las células germinales primordiales, estableciéndose en la paredes de los tubos seminíferos. Una vez establecida, la espermatogonia permanece inactiva hasta la pubertad, momento en que empieza a dividirse para producir espermatozoides. La población de células troncales de espermatogonias, que representan varios millones, permanecen constantes a lo largo de la vida del macho (Durán, *et al.*, 2008).

3.3.2 Control Hormonal de la Función Testicular

Las funciones de los testículos, son fundamentalmente la producción de espermatozoides y andrógenos, y están reguladas por hormonas específicas. Estas hormonas llamadas gonadotropinas, se liberan al torrente circulatorio desde la hipófisis. Sin aporte de las gonadotropinas la producción de espermatozoides y andrógenos cesa totalmente. La producción y liberación de gonadotropinas hipofisarias, están, a su vez,

controladas por otros centros cerebrales que corresponden a estímulos ambientales (Durán, *et al.*, 2008).

Existen dos gonadotropinas, hormona luteinizante (LH), y hormona estimulante de los folículos (FSH). La LH actúa sobre las células de Leyding de los testículos y estimula la producción de andrógenos, que, a su vez, actúan sobre los túbulos seminíferos para promover la espermatogénesis. El papel de la FSH no está tan claro; parece que es necesaria para iniciar la producción de espermatozoides en la pubertad o al principio de la estación reproductora; sin embargo no parece que sea útil para mantener la espermatogénesis (Hafez, 2000).

El principal estímulo externo que afecta la secreción de las gonadotropinas es la duración del día (horas luz), de tal forma que cuando se acortan los días hay un aumento de la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, estimulándose así la función testicular. Otros factores como la temperatura, estado nutricional, enfermedades, estrés pueden también modificar la función hipofisaria. Los factores sociales son, asimismo, importantes, la introducción inmediata de una oveja en celo estimula la secreción de LH en el carnero, por estímulos olfatorios visuales (Gibbons y Cueto, 2004).

3.3.3 Cubrición y Eyaculación

Aun cuando los carneros pueden ser entrenados para montar a hembras no éstricas, lo normal es que sólo respondan a hembras éstricas. El principal estímulo sexual es el olfato hasta el punto de que los machos son capaces de detectar a los miembros del sexo opuesto mediante las feromonas (Manes, *et al.*, 2001).

Una vez estimulado por una hembra éstrica, el carnero comienza el llamado cortejo nupcial, que, en ocasiones, puede incluir hasta comportamiento agresivo hacia la hembra, pateándola, frotándola (particularmente la vulva), balando y moviendo el labio superior. Durante este periodo de excitación sexual es posible que se escape algo de líquido del proceso uretral del pene. Esto es una secreción de las glándulas bulbo-uretrales y uretrales que sirve para eliminar cualquier resto de orina que permaneciera en la uretra (Durán, *et al.*, 2008).

Una vez sujeta la hembra, el carnero la montará rápidamente y, después de uno o dos empujones, se producirá la intromisión del pene en la vagina. La eyaculación ocurre espontáneamente y dura solo unos segundos caracterizándose por un violento empuje de su pelvis. Concluida la eyaculación al macho desmonta inmediatamente. El comportamiento sexual del macho es el fruto de la acción de los estrógenos secretados por los testículos (Hafez, 2000).



Figura 8. Macho estimulado por la presencia de una hembra en celo

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.4 SELECCIÓN DE REPRODUCTORES

3.4.1 Selección de Ovejas para ser utilizadas en Programas de Inseminación Artificial

Los programas de inseminación artificial y mejoramiento genético están normalmente destinados a las ovejas de alto valor genético del hato ovino.

Antes de incorporar los animales a un programa de inseminación artificial intrauterina, es necesario tener en cuenta los siguientes aspectos de nutrición, sanidad y reproductivos (Gibbons y Cueto, 2004).

- ✓ Las hembras deben alcanzar 2.5-3 puntos de Condición Corporal un mes antes de la inseminación artificial

- ✓ Las ovejas deben estar libres de enfermedades y parásitos. Se realiza control mediante método FAMACHA y pruebas de laboratorio.

- ✓ El destete de los corderos debe realizarse 6 a 8 semanas antes de la inseminación.

- ✓ Se debe separar ovejas “viejas” y con problemas de ubre (pezones ciegos, ubres cortadas, mastitis), así como también aquellas ovejas que presenten problemas reproductivos.



Figura 9. Selección de ovejas para Inseminación Artificial

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.4.1.1 Preparación de las ovejas para la inseminación

Varias semanas antes de que comience un programa de inseminación artificial se debe poner especial atención al estado de las hembras y su preparación para la inseminación. El éxito del programa depende de la fertilidad de las hembras, así como de la calidad del semen utilizado en la inseminación (Durán, *et al.* 2008).

La inseminación artificial sólo tendrá éxito si se practica en un determinado tiempo, con relación a la ovulación, o a la aparición del estro. Por ello es necesario detectar el celo en las hembras que naturalmente sean cíclicas o sincronizar los celos. La sincronización de celos tiene la ventaja de acortar el tiempo necesario para inseminar hatos enteros y facilita el manejo durante la gestación y el parto. Por otro lado, el control de celos hace posible el estímulo de la ovulación artificialmente, incrementándose la fertilidad (número de crías por hembra) (Manes, *et al.*, 2001)

Cuando se utilizan gonadotropinas exógenas para estimular la ovulación existe la ventaja adicional de que el tiempo en el que ocurre la ovulación disminuye, el tratamiento aumenta la sincronía de la ovulación y de ahí el éxito de las inseminaciones a tiempo fijo. La estimulación del celo y ovulación también pueden ser efectivas en la estación no reproductiva, permitiéndose la reproducción “fuera de estación” (Hafez, 2000).

3.4.1.2 Identificación de las hembras

Para facilitar los registros en la ganadería, cada hembra debe ser identificada claramente. Si se desean hacer registros de producción individuales cada hembra debe tener un arete numerado. Para evitar cualquier estrés o inconveniente, en el momento de la inseminación artificial, es mejor colocar los aretes de antemano, por ejemplo, en el momento de seleccionar las hembras que van a constituir el programa de inseminación artificial, al manifestar las hembras el celo, o en el momento de administrar los progestágenos o prostaglandinas. Cualquier arete es idóneo, pero para evitar retrasos en el momento de la inseminación es mejor utilizar modelos que incluyan números grandes para identificar fácilmente los animales (Durán, *et al.*, 2008).

3.4.2 Selección de machos para ser utilizados en Programas de Inseminación Artificial

El objetivo de un programa de inseminación artificial ovino es mejorar las características de producción, principalmente la cantidad o calidad de lana o pelo, leche o carne. Esto dependerá de la capacidad reproductora de los sementales que se utilicen. Una estimación del valor de un semental puede sacarse de su propia producción y de las descendencias que haya tenido, comparándolas con sus contemporáneos. Los reproductores deben ser genéticamente mejores que sus congéneres (Bedolla, 2002).

En todo programa de inseminación artificial ovino, es necesario medir una serie de parámetros que aporten información, para evaluar la aptitud reproductiva de los carneros; y es necesario considerar (Durán, *et al.*, 2008):

- ✓ Desarrollo corporal, revisión clínica y semiológica del aparato reproductor.
- ✓ Diámetro testicular.
- ✓ Líbido.
- ✓ Evaluación del semen: calidad seminal.

Aparte de los criterios genéticos existen otros factores que se deben considerar al seleccionar los machos para un programa de inseminación artificial. Entre estos encontramos el estado de salud y peso. Los machos, particularmente los recién comprados o introducidos en el rebaño, deben ser sometidos a un examen físico y controlar su estado de salud con el fin de asegurar que estén exentos de anomalías o enfermedades (Salamon, 1990; Hafez, 2000).

También se deben examinar los órganos reproductores poniendo especial atención en el tamaño y forma de los testículos y epidídimos, órganos que pueden ser palpados a través del escroto. Los testículos deben ser firmes y elásticos, carentes de lesiones y deformidades y moverse libremente dentro del saco escrotal. La cola del epidídimo se debe palpar con facilidad y tener igual tamaño y forma en ambos testículos (Cesa, 2005).

Además se debe examinar el conducto deferente; el cuello del escroto debe estar duro y fácilmente palpable. Finalmente, también se deben inspeccionar las posibles anomalías en prepucio y pene. Los animales con defectos, tales como criptorquidismo, hipoplasia testicular, espermiostasis o varicoceles (dilatación de la vena espermática) deben ser excluidos de los programas de inseminación (Hafez, 2000).

Una cuestión que a menudo se olvida al seleccionar los sementales es su capacidad de servicio y su vigor sexual, que se puede controlar mediante una prueba de servicio, donde el macho es colocado con hembras en celo. La falta de voluntad a montarlas puede deberse a un trauma físico, artritis, mal de pezuñas o lesiones en el pene (Robles, 2004).

Es importante que el macho seleccionado posea semen de buena calidad y en cantidad. Este factor se debe controlar inmediatamente antes de comenzar el programa de inseminación artificial (Hervé, *et al.*, 2007).

3.5 EL SEMEN Y SUS COMPONENTES

El semen es un líquido generado por el macho, que contiene gametos masculinos (espermatozoides), se deposita en la vagina de la hembra durante la cópula o puede ser recolectado por medios artificiales para su estudio o para uso en inseminación artificial. El semen está formado por el plasma seminal y los espermatozoides, su composición varía según las especies (Durán *et al.*, 2008).

3.5.1 Plasma Seminal

El plasma seminal de los carneros es un líquido opaco o claro, aunque el semen puede ser de color blanco o cremoso debido a su alta concentración de espermatozoides. El principal componente del plasma seminal es el agua (75%), aunque también aparecen sustancias orgánicas e inorgánicas que sirven de protectores y nutrientes de los espermatozoides. El plasma seminal generalmente es un líquido isotónico y neutro (Cueto, *et al.*, 2008).

El plasma seminal tiene tres funciones principales: actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación; sirve de activador de los espermatozoides, previamente no móviles; y proporciona un medio rico en nutrientes, que colabora para mantener la supervivencia de los espermatozoides después de ser depositados en el aparato genital de la hembra (Durán *et al.*, 2008).

3.5.2 Espermatozoides

Los espermatozoides son los gametos masculinos que se producen en los túbulos seminíferos de los testículos. Son pequeñas células, las únicas vivientes dotadas de una movilidad independiente, muy enérgica y capaz de mantenerse en actividad fuera del cuerpo durante un tiempo prolongado. En el ovino miden de 70 a 80 micras. Constan básicamente de una porción globosa, la cabeza, la cual es aplanada y

contiene material cromosómico o ADN, responsable directo de la transmisión hereditaria y, de un apéndice fino y largo denominado cola, por cuyo interior pasa el filamento axial. Constituido por nueve microfibrillas, que son las encargadas de brindar forma y movimiento al espermatozoide (Manes, *et al.*, 2001).

Sánchez (2004), indica que la supervivencia de los espermatozoides dentro del aparato genital del ovino es de aproximadamente 36 a 48 horas, existiendo variaciones considerables entre individuos.

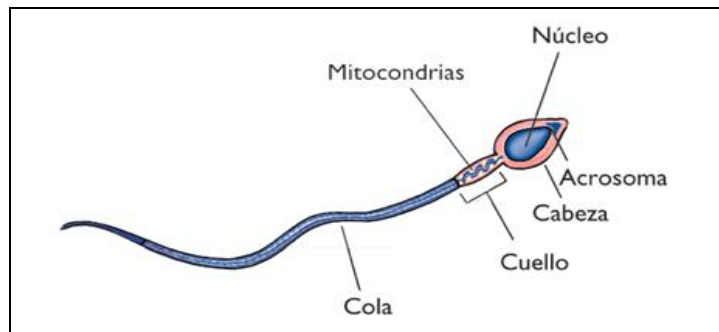


Figura 10. Conformación estructural del espermatozoide

Fuente: www.beybies.blogspot.com

3.5.2.1 Composición espermática

Los espermatozoides constituyen aproximadamente el 44% del volumen del eyaculado (semen normal) y lo restante es secreción de tubos y glándulas. Físico-químicamente están integrados por un 86% de agua, sustancias

inorgánicas: sodio, potasio, calcio, magnesio, fósforo; sustancias orgánicas: proteínas, hidratos de carbono (fructosa), ácido láctico y cítrico, vitaminas y otros en menor cantidad (Foote, 2002).

3.6 FACTORES QUE ALTERAN LA CALIDAD SEMINAL

Una buena salud y estado físico general, órganos reproductores normales, gran tamaño testicular y excelente calidad de semen conforman una buena base para comprobar la eficiencia reproductiva (Laing, *et al.*, 1991).

3.6.1 Temperatura

A medida que la temperatura del semen aumenta, la tasa metabólica también aumenta y su periodo de vida disminuye. Cuando la temperatura se eleva a más de 50 °C, los espermatozoides sufren una pérdida irreversible de su motilidad; si se les mantiene a la temperatura corporal, solo vivirán por pocas horas debido al agotamiento de los sustratos energéticos, a una caída del pH por acumulación de ácido láctico, o por combinación de ambos. La protección del semen contra el choque frío se logra añadiendo al mismo un diluyente de yema de huevo o leche, ya que, éstos contienen lipoproteínas y lecitina, que son agentes protectantes (Bearden y Fuquay, 1982).

3.6.2 pH

Un pH relativamente neutro mantiene una alta tasa metabólica elevada de semen, sin embargo, cuando el pH se desvía hacia la acidez o alcalinidad, este índice se reduce, de ahí la importancia de diluir el semen en un medio amortiguador para los casos de congelación seminal (Bearden y Fuquay, 1982).

3.6.3 Presión osmótica

La membrana de los espermatozoides es semipremeable; las soluciones hipo e hipertónicas alteran la transferencia de agua a través de la membrana, lesionando la integridad de la célula. Es muy importante utilizar solo soluciones isotónicas ya que los espermatozoides permanecen móviles por más tiempo cuando están suspendidos en dicho medio (Bearden y Fuquay, 1982).

3.6.4 Luz

Las intensidades lumínicas encontradas normalmente en el laboratorio pueden deprimir la tasa metabólica, la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides. La catalasa previene los efectos de la luz, por lo que se sugiere que la luz provoca una reacción fotoquímica en el semen que causa la producción de peróxido de hidrógeno; se debe proteger al semen y nunca exponerlo a la luz solar (Bearden y Fuquay, 1982).

3.7 MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE SEMEN

Existen dos maneras de obtener semen de un carnero: a través del uso de una vagina artificial o de la electroeyaculación.

3.7.1 Colecta de semen con vagina artificial

Es una técnica poco traumática por lo que es recomendable su uso en carneros destinados a la producción de semen en programas de inseminación artificial. Se utiliza vagina artificial, que simula las características de la vagina de la oveja. Los elementos de la vagina artificial que van a estar en contacto con el pene y el semen del carnero deben ser lavados y desinfectados ya que la muestra debe ser tomada en la forma más aséptica posible. Con respecto al carnero se aconseja realizar un buen lavado de la zona prepucial, desinfectarla y secarla (Salamon, 1990).

Para la extracción del semen, se debe contar con una hembra en celo natural o estimulado artificialmente, que se coloca en una rampa para el salto. Se acerca el carnero, se espera que se excite y finalmente se lo deja montar. En el momento del salto y cuando el carnero desenvaina, se toma el pene con una mano y se lo desvía dentro de la vagina artificial dentro de la cual el carnero eyaculará. Una vez obtenido el eyaculado, se retira el tubo colector y se tapa rápidamente para evitar contaminaciones (Robles, 2004).



Figura 11. Vagina artificial, camisa y copa de recolección para semen ovino

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.7.1.1 Entrenamiento de machos para recolección de semen

Antes de que un carnero sea capaz de producir semen con regularidad, para poder incluirlo en un programa de inseminación artificial, se debe someterlo a un periodo de adaptación y entrenamiento a la extracción de semen. En ese tiempo habrá de evaluarse la capacidad de adaptación al método de obtención del semen, aunque la mayoría lo acepta luego de un tiempo, varía con la época del año, la edad del animal, la raza y la experiencia del entrenador.

El entrenamiento es mejor hacerlo durante la estación reproductora, cuando el deseo sexual es más manifiesto y cuando se dispone de hembras en estro que sirven como maniqués. Una vez entrenados a eyacular, los machos reaprenden rápidamente cuando son requeridos en el futuro para recolectar semen de nuevo (Salamon, 1990).

Para los propósitos del entrenamiento se precisa una hembra en estro natural, o que presente estro sincronizado. Una vez los carneros y machos cabríos estén entrenados, las hembras maniquís no necesitan estar en estro, ya que los sementales están condicionados a montar a cualquier hembra que este colocada en el aparato sujetador del cobertizo. Es aconsejable seleccionar hembras maniquís apacibles, ya que los machos pueden distraerse por aquellas hembras que no se estén completamente quietas (Hervé, *et al.*, 2007).



Figura 12. Recolección de semen con vagina artificial

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.7.1.1.1 Aspectos a considerar

Según la Universidad de Córdoba (2006), en el entrenamiento se pueden presentar las siguientes situaciones:

Si el macho manifiesta los elementos característicos de conducta sexual tales como oler a la hembra, acercamiento o incluso monta, el operador debe intentar un acercamiento al macho que se debe realizar de manera tranquila a fin de evitar provocarle miedo; si la motivación sexual es suficientemente fuerte, y a pesar de la presencia humana continúa intentando cubrir a la hembra, se le puede presentar la vagina artificial en la posición adecuada para la colecta de semen.

En este momento se pueden dar dos situaciones:

- El macho eyacula directamente en la vagina.
- El macho se baja de la hembra desde el momento que la mano del operario toca el prepucio para desviar el pene hacia la vagina artificial, en este caso, es importante que el operario no cambie de posición para evitar que el macho pueda asociar los dos acontecimientos. El animal generalmente, volverá a intentar la cubrición de la hembra; es importante que el operario estimule al carnero con su voz; también puede recurrir a otros medios como: soltar a la hembra y hacerla pasear delante de él, cambiar la hembra o volver la cabeza de la hembra hacia atrás.

3.7.1.2 Frecuencias de colecta con vagina artificial

El INTA (2006), afirma que la frecuencia de extracción de semen en carneros adultos puede ser hasta de 4-5 eyaculados diarios; en animales jóvenes, la frecuencia de extracción será menor.

Un aumento en el número de colectas mediante vagina artificial es capaz de proporcionar un incremento importante en el número de espermatozoides producidos, esto si el ritmo de colecta no ha sido intenso. El beneficio de una modificación de este tipo depende de las reservas en el epidídimo en el momento del cambio del ritmo; cuando estas reservas son máximas, una tasa de colecta elevada permite coleccionar un número importante de espermatozoides, pero tras haber vaciado esta reserva, el ritmo de colecta debe ser reducido de nuevo a dos veces por día o incluso un eyaculado diario: un aumento del ritmo de colecta no es interesante más que cuando el ritmo previamente establecido no está próximo al ritmo de producción máxima del testículo (INTA, 2006).

3.7.2 Colecta de semen con electroeyaculador

La electroeyaculación es una técnica mucho más sencilla, pero más cruenta que la anterior, por lo que se recomienda para obtener semen ocasionalmente (Adaptado de Robles, 2004).

Este método es el más práctico para la evaluación sanitaria del semen. Consiste en una fuente productora de electroestímulos regulables en intensidad y frecuencia, conectado por un cable a un electrodo bipolar. Al igual que para el caso anterior es necesario hacer una correcta desinfección de la zona prepucial lavando con solución fisiológica o un desinfectante suave sin olvidar secar el área lavada (Robles, 2004).

El carnero es colocado en el suelo , en decúbito lateral, se sostiene el pene hasta tenerlo totalmente fuera de la cavidad prepucial, y tras higienizarlo, es envuelto por detrás del glande con una gasa lo que permitirá mantenerlo fuera de la cavidad prepucial (Cesa, 2005).

El electrodo es lubricado con vaselina e insertado en el recto del carnero a una profundidad de 10 a 15 cm., coincidiendo aproximadamente con la ubicación de las glándulas seminales. Se coloca el extremo del glande dentro del tubo donde se recolectará el semen y se comienza con los estímulos eléctricos, que son suaves y lentos al principio, y van incrementándose paulatinamente hasta lograr la excitación del animal y la erección del pene, lo que se logra con 6 a 10 revoluciones. En ese momento, se interrumpe por unos segundos la estimulación, se mueve el electrodo colocándolo un poco más adentro del recto y se da un nuevo estímulo que produce la eyaculación (Cesa, 2005).

3.8 MÉTODOS DE EVALUACIÓN SEMINAL

Aisen (2004), asienta que la evaluación seminal es un proceso que permite determinar la calidad, viabilidad y fertilidad de los espermatozoides, No se dispone de una prueba única para detectar con exactitud la fertilidad de los eyaculados individuales, pero cuando se combinan cuidadosamente varias de ellas, se pueden seleccionar los eyaculados que tengan un potencial fecundante más elevado de los que se desechan.

Un examen regular del semen de cada macho permite la detección de anomalías inesperadas y descubrir, que animal sufre alteraciones espermáticas (Universidad de Córdoba, s/f).

González (2002), asegura que las valoraciones de semen utilizado rutinariamente en los centros de inseminación o aquellas realizadas por laboratorios de apoyo, se podrán clasificar de la siguiente manera:

- Macroscópicas: Aspecto (color, olor, viscosidad), volumen, pH.
- Microscópicas: Concentración, motilidad (masal, individual, progresiva), morfología de la célula espermática, evaluación de estado de los acrosomas.

3.8.1 Valoración Macroscópica

3.8.1.1 Color o Aspecto

El color del semen de carnero es normalmente blanco cremoso, un color rosado del semen indica sangre, probablemente, a causa de lesión del pene durante la recolección, mientras que el semen gris o pardo sugiere contaminación o infección del tracto reproductivo (Hafez, 2000).

Se puede determinar a través de una observación visual del color, subjetivamente la concentración del mismo; sin embargo, su grado de imprecisión es enorme (Universidad de Córdoba, 2006).

Tabla 1. Concentración espermática en base al color del semen

Valor	Color	N. de espermatozoides (x10⁶)/ ml
0	Acuoso	Insignificante
1	Nuboso	700
2	Lechoso	2000
3	Cre moso suave	3000
4	Cre moso	4000
5	Cre moso espeso	5000

Fuente: Aisen ,2004.

3.8.1.2 Volumen

Cueto, *et al.* (2008), determinaron que el volumen puede ser medido utilizando un tubo de recolección graduado. El volumen varía de acuerdo al método de recolección, resultando mayores volúmenes mediante electroeyaculador en comparación con aquellos colectados con vagina artificial (Hafez, 2000); es por esto que Mellisho y Gallegos (2006), manifiestan que cuando la recolección es con vagina artificial, el volumen promedio esperado de eyaculado para carneros es de 1.0 ml dependiendo de la edad, condición del animal, frecuencia de colección y habilidad del operador.

De manera general se puede establecer que los volúmenes de colecta oscilan entre 0.3 a 1.7 ml, de los cuales aquellos que sean menores a 0.4 ml son descartados (Aisen, 2004).



Figura 13. Volumen de eyaculado ovino

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.8.1.3 pH

Aisen (2004) asegura que el pH del semen es en general neutro a levemente alcalino dependiendo de la especie, esto con el fin de contrarrestar la acidez normal del aparato reproductor femenino. Los valores de pH en el carneo oscilan entre 6,2 a 7,3 llegando a citarse como normal un pH, de 7,5.

3.8.2 Valoración Microscópica

3.8.2.1 Motilidad

La motilidad es uno de los parámetros más importantes en las contrastaciones seminales, ya que es imprescindible en la célula espermática para que se produzca fecundación (González, 2002).

Para el estudio de la motilidad de los espermatozoides, se han creado sistemas denominados genéricamente CASA (Computer Assited Motility Analysis), automatizando y simplificando el proceso. El CASA establece una manera efectiva y medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides (Higalco, *et al.*,s/f).

La valoración de la motilidad implica la estimación de los espermatozoides y la calidad de motilidad. Para este análisis se emplea generalmente un microscopio de luz (Hafez, 2000).

Hidalgo, *et al.* (s/f), determinan que los espermatozoides pueden tener dos tipos de movimientos:

- Movimiento de rotación: alrededor de su propio eje.
- Movimiento progresivo (desplazamiento de la célula): lineal y circular.

3.8.2.1.1 Motilidad masal

El semen puro de carnero exhibe movimiento en ondas cuando se examina bajo el microscopio de 40 aumentos (Mellisho y Gallegos, 2006). Esta técnica permite detectar los espermatozoides muertos o muy poco móviles en los eyaculados, pero resulta impreciso para determinar los diferentes porcentajes de motilidad individual de los espermatozoides (Universidad de Córdoba, s/f).

Mellisho y Gallegos (2006), determinan que la valoración se efectúa colocando una gota de semen en una lámina porta objetos limpia y temperada a 37 °C. Las muestras se examinan en un microscopio óptico a 40 aumentos y se valora las ondas espermáticas dentro de una escala del 1 al 6, considerándose que solo las muestras que tengan una motilidad buena o muy buena, son aptas para ser usadas para inseminación. Aquellas muestras que poseen una calificación menor a 3 son descartadas y no serán sometidas a la crioconservación (Cueto, *et al.*, 2008).

Tabla 2. Escala de valoración de motilidad masal

Grado	Clave	Descripción
1	Muertos	Sin movimiento
2	Muy pobre	Muy pocos movimientos
3	Pobre	No aparecen ondas, pero se ven movimientos espermáticos
4	Regular	Ondas de movimiento lento
5	Bueno	Ondas y remolinos vigorosos pero no tan rápidos
6	Muy bueno	Ondas densas de movimientos muy rápidos

Fuente: Aisen, 2004.

3.8.2.1.2 Motilidad individual

La motilidad individual es uno de los parámetros más utilizados en la valoración seminal, sin embargo, no pronostica en forma ajustada la capacidad fecundante del espermatozoide (Aisen, 2004).

Gonzales (2002), menciona que la motilidad individual se valora por medio de un microscopio óptico, tomando en cuenta el porcentaje de espermatozoides que presentan un movimiento rectilíneo y progresivo (correcto), descartando de esta forma aquellos que presentan un movimiento circular (anormal).

Aisen (2004), establece que en este movimiento se visualizan varios campos microscópicos y se estima el porcentaje de espermatozoides motiles dentro de una escala del 0 al 5.

Tabla 3. Escala de valoración de motilidad individual

Valor	Características
0	Espermatozoides inmóviles o muertos
1	Espermatozoides con movimiento progresivo, girando sobre sí mismos
2	Espermatozoides con movimiento anormal o eventualmente progresivo
3	Espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso
4	Espermatozoides sin movimiento progresivo muy rápido
5	Espermatozoides con movimiento progresivo y energético

Fuente: Aisen, 2004.

3.8.2.2 Concentración

Un semen de carnero de buena calidad contiene de 3.5 a 6.0 millones de espermatozoides por ml. (Mellisho y Gallegos, 2006). Existe una gran variabilidad en la concentración de un eyaculado a otro. Es importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que, de este parámetro se determinará el número de hembras a inseminar (Hidalgo, *et al.*, s/f).

Uno de los métodos para la determinación de la concentración espermática son: el recuento de la cámara de Neubauer y el recuento mediante el fotolorímetro; ambos métodos son precisos, pero el fotolorímetro permite un recuento más rápido en comparación con la cámara de Neubauer (Gibbons y Cueto, 2004).

3.8.2.2.1 Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauger, puede ser cargada con micropipeta, realizando una dilución de 5 microlitros de semen en 2 ml de agua. El conteo de espermatozoides se lleva a cabo colocando una gota de la dilución sobre la cámara, observando al microscopio. Si los espermatozoides no están repartidos uniformemente en toda la cámara, debe repetírse la operación de carga.

Se cuenta el número de espermatozoides en un cuadrado “grande” (sin divisiones internas) por cada cuadrante y se repite el conteo en uno de los cuadrantes elegidos al azar, contándose en total 5 cuadrados. La concentración de espermatozoides/ml se calcula multiplicando la suma de los espermatozoides contados en los 5 cuadrados por 12.800.000 (Cueto, *et al.*, 2008).

Dilución 1:400

$$\text{Esp/ml} = \frac{\text{Suma de esp.} \times 0.1 \text{ mm}^3 \times 10.000 \text{ ml/mm}^3 \times 400 \times 16}{5}$$

$$\text{Esp/ml} = \text{Suma de esp.} \times 12.800.000$$

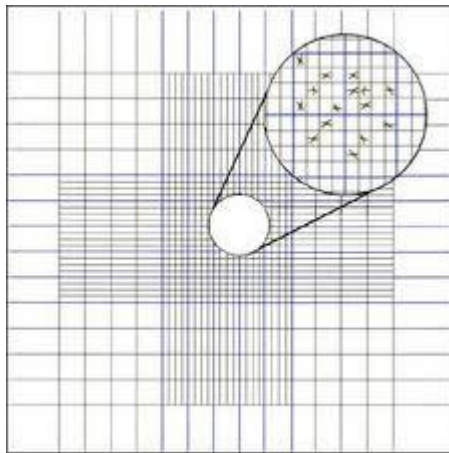


Figura14. Cuadrícula de la Cámara de Neubauer

Fuente: <http://clinicojulio.blogspot.html>

3.8.2.3 Morfología (anormalidades)

El examen morfológico es una prueba de control de calidad espermática. La valoración de la morfología se basa en la relación directa que exista entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad in vivo (Hidalgo, *et al.*, s/f).

Hafez (2000), afirma que, existe una relación positiva entre los espermatozoides con morfología normal y la motilidad espermática. Los espermatozoides anormales no tienen motilidad progresiva, y a medida que las anormalidades aumentan, la motilidad disminuirá.

Gómez y Migliorisi (s/f), mencionan que existen dos tipos de malformaciones: las malformaciones primarias que son aquellas que se originan dentro del testículo durante la espermatogénesis y se producen por lesiones como hipoplasia o degeneración testicular; y las malformaciones secundarias que se originan dentro del epidídimo y se producen por exceso de actividad sexual, reposo sexual prolongado (mayor a 60 días), procesos inflamatorios del testículo, procesos inflamatorios de las glándulas accesorias o errores técnicos del laboratorio en el manejo seminal.

3.8.2.4 Conteo de vivos y muertos

El semen de los reproductores no debe contener más de un 20-30% de espermatozoides muertos (coloreados) en el primer eyaculado de una serie. Estos valores disminuyen normalmente con el número de colectas (Universidad de Córdoba, 2006).

Para esta determinación se usan colorantes: eosina al 5% y nigrosina al 10% en un frotis con una muestra de semen fresco observada al microscopio (Mellisho y Gallegos, 2006).

3.9 INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La técnica de inseminación artificial es un mecanismo de reproducción que consiste en introducir el material fecundante masculino por medios artificiales, en las vías genitales femeninas. Los medios mecánicos sustituyen a los órganos, sin necesidad de poner en presencia y en contacto a los progenitores (Sánchez, 2004).

La utilización de la inseminación artificial en ovinos como cualquier otra biotecnia reproductiva, (técnica laparoscópica), no es de uso generalizado, ya que es necesaria una serie de condiciones de parte de los establecimientos donde se la pretende aplicar (Azzarini, 1992).

Para realizar un programa de mejoramiento genético es necesario cumplir con los siguientes requisitos:

- ✓ **Sanitario:** todos los animales deben estar bajo un programa de sanidad, que asegure la salud productiva de los mismos.

- ✓ **Manejo nutricional:** las exigencias para implementar un programa de inseminación artificial con expectativas de éxito son altas. La oferta alimentaria, la planificación de la cadena forrajera para ovejas de cría, el estado de los animales, la Condición Corporal, deben ser mayores a la

situación de servicio o monta natural, porque la exigencia y el esfuerzo biológico al que son sometidos los animales, así lo requiere.

✓ **Instalaciones básicas:** deben facilitar el manejo de los animales y reducir el estrés, como: bretes de aparte, para selección y clasificación, recolección y manipulación del semen; y la aplicación de la inseminación artificial propiamente dicha.

3.9.1 Semen para Inseminación Artificial

3.9.1.1 Semen fresco

La obtención y fraccionamiento del semen para su utilización en fresco de un carnero genéticamente superior, permite acelerar el mejoramiento de las características productivas de los hatos ovinos, al aumentar el número de crías logradas con respecto a las que se obtendrían en servicio natural (Cueto, *et al.*, 2008).

El semen colectado mediante la vagina artificial o del electroeyaculador, es conservado en baño maría a temperatura de 28-30 °C durante su evaluación y posterior utilización (Gibbons y Cueto, 2004).

Es de suma importancia que el tiempo transcurrido entre la obtención del eyaculado y la última inseminación sea el menor posible (alrededor de 1 hora), extremándose este cuidado en caso de tratarse de semen sin diluir.

Antes de proceder a su utilización, el eyaculado debe ser evaluado al microscopio (100 aumentos), observando fundamentalmente que el mismo posea una motilidad masal igual o superior a 3 (Evans y Maxwell, 1993).

La dilución del semen obtenido se realiza en forma aproximada, asegurándose una cantidad de 100 a 1500 millones de espermatozoides totales por dosis de inseminación de 0.025-0.05 cc. (Gibbons y Cueto, 2004).

El examen del semen al microscopio durante el transcurso de la inseminación permitirá ir verificando su motilidad. El semen se homogeneizará mediante agitación, en forma periódica, durante su utilización (Gibbons y Cueto, 2004).

3.9.1.1.1 Tasas de fertilización

En ovinos, mediante inseminación artificial con semen fresco se han obtenido las siguientes tasas de fertilización (Hernández, 2003):

- ✓ Técnica Transcervical: 77%
- ✓ Técnica Laparoscópica: 93%

3.9.1.2 Semen congelado

Las técnicas de congelamiento del semen posibilitan el mejor aprovechamiento y difusión de genes, al tiempo que permiten su conservación en nitrógeno líquido (a -196 °C) por un período ilimitado de tiempo. El empleo del semen congelado ovino puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético, al aumentar considerablemente el flujo de material genético del hato. De esta manera, se evita el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el riesgo sanitario (Gibbons y Cueto, 2004).

En el ganado ovino, el uso de la técnica es de aplicación reciente, debido a la dificultad que presenta el cuello uterino de la oveja para ser transpuesto por la vaina de inseminación (vía transcervical), y la reducción de la viabilidad espermática producida por el proceso de congelamiento y descongelamiento. Esto impide obtener tasas de preñez semejantes a otras especies. Los porcentajes de preñez obtenidos por medio de la inseminación transcervical con semen congelado varían entre 20 y 25 %, y por laparoscopia entre 80-85% (Evans y Maxwell, 1993).

A nivel mundial el semen congelado de carneros con valor genético, es utilizado principalmente en la técnica de inseminación artificial intrauterina vía laparoscópica, lo que garantiza la efectividad de la misma y la mejora genética del hato ovino (Gibbons y Cueto, 2004).

Tabla 4. Resultados obtenidos en la inseminación artificial utilizando semen fresco y congelado.

TÉCNICA	FRESCO	CONGELADO
Vaginal	40-50%	10-20%
Transcervical	60-80%	40-70%
Laparoscópica	70-90%	50-80%

Fuente: Bedolla, 2002.

3.9.2 Dosis de Inseminado

El número total debe repartirse, por igual, en cada cuerno cuando se practica la inseminación intrauterina por laparoscopia. Aun cuando los espermatozoides depositados en un cuerno uterino son capaces de fertilizar los oocitos desprendidos en el ovario contralateral, se ha observado un ligero aumento de la fertilidad cuando el total del inseminado se reparte entre ambos cuernos. Cuando se realiza la inseminación vaginal o transcervical, las dosis recomendadas son para cada inseminación (Salamon, 1990; Mejía y Hernández, 1996).

Tabla 5. Volúmenes recomendados para inseminación.

TÉCNICA	VOLUMEN
Inseminación Vaginal	0.30-0.50 ml
Inseminación Transcervical	0.05-0.10 ml
Inseminación Laparoscópica (por cada cuerno)	0.05-0.10ml

Fuente: (Salamon, 1990)

Tabla 6. Número mínimo de seguridad de espermatozoides móviles en inseminado con diferentes técnicas (número expresado en millones)

TÉCNICA	TIPO DE SEMEN		
	Fresco	Líquido Conservado	Congelado
Inseminación Vaginal	300	No efectivo	No efectivo
Inseminación Transcervical	100	150	180
Inseminación Laparoscópica	20	20	20

Fuente: (Salamon, 1990)

3.9.3 Manipulación y evaluación del semen

Luego de su recolección, es importante que en todo momento, el semen se mantenga protegido de los cambios bruscos de temperatura, contacto con el

agua y metales, radiación solar directa, e impurezas. Por lo tanto, todo el material que entre en contacto con el eyaculado deberá ser de vidrio o plástico, estará esterilizado y seco, y a la misma temperatura que el semen (Cueto, *et al.*, 2008).

Será de suma importancia que el tiempo que trascorra entre la obtención del semen y el agregado del diluyente sea el menor posible (Buratovich, 2003).

La observación del color del semen, así como la apreciación de su motilidad masal, son importantes para decidir si se procederá a utilizar el eyaculado. El volumen y la concentración espermática deben ser estimados antes de su utilización, para realizar una correcta dilución según el volumen y número de espermatozoides totales a inseminar por dosis. El volumen promedio del eyaculado del carnero es de 1 ml, y su concentración varía entre 2000-6000 millones/ml (Hafez, 2000).

La dilución del semen para inseminación artificial se lleva a cabo por razones técnicas y biológicas (Duran, *et al.*, 2008):

- ✓ Razones técnicas: incrementar el volumen de eyaculado para inseminar un gran número de hembras (uso intensivo del padre).
- ✓ Razones biológicas: proveer a los espermatozoides, nutrientes y protección contra el enfriamiento y congelamiento.

3.9.3.1 Diluyentes y dilución del semen

La motilidad y concentración dictan la proporción a la que se diluye el semen. El semen con puntuación de 5 en movimiento y concentración puede diluirse en una proporción de hasta 4:1. La mayor parte de los eyaculados se diluyen a una proporción de 2:1. El que tiene puntuación de 2 no debe diluirse y sólo utilizarse en estado fresco sin diluir (Hafez, 2000).

Es posible utilizar diluyentes naturales o sintéticos. La leche de vaca es el diluyente natural de mayor uso. La leche entera, sin grasa o en polvo debe calentarse a 92-95 °C en baño maría, durante 8 a 10 minutos. El diluyente y el semen deben encontrarse a la misma temperatura (30°C) cuando se realiza la dilución. La adición del diluyente al semen reduce el choque a los espermatozoides. Nunca debe agregarse semen al diluyente. La mezcla debe revolverse con suavidad, y a continuación se evalúa el semen después de la disolución para confirmar la viabilidad de los espermatozoides (Gibbons y Cueto, 2004).

3.9.4 Inseminación Artificial Laparoscópica

A comienzos de la década del 80, investigadores australianos desarrollaron una técnica de inseminación artificial intrauterina por laparoscopia. Al depositar el semen descongelado directamente en la luz de los cuernos uterinos, permitía obtener porcentajes de preñez superiores al 50% (Azzarini, 1992).

Para la realización de ésta técnica, el material de laparoscopia (endoscopio, trócares de 5 y 7 mm y cánulas correspondientes) se coloca en una bandeja con una solución desinfectante de amonio cuaternario (DG6), y será devuelto a la bandeja entre inseminación e inseminación (Durán, *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo la inseminación intrauterina, se introduce en la cavidad abdominal un trocar de 7 mm y cánula a la izquierda de la línea media de la oveja y unos 5 cm de la ubre, cuidando de no perforar las venas visibles a simple vista. Antes de introducir el trócar de 5mm y cánula a la derecha de la línea media, es conveniente dejar ingresar aire dentro de la cavidad abdominal, lo que facilita la visualización de los órganos internos (Gibbons y Cueto, 2004). A través de la cánula de 5mm, se introduce el transcap con la vaina de inseminación, con el volumen requerido de semen (Fig. 15).

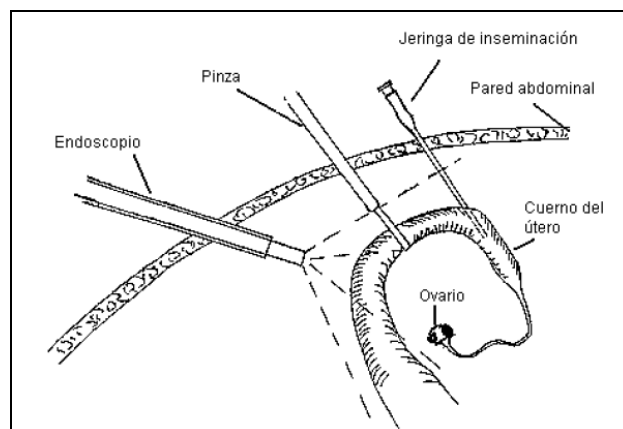


Figura 15. Esquema de Inseminación Artificial Intrauterina vía Laparoscópica

Fuente: Durán, 2008.

Luego de la deposición del semen, se retira la vaina de inseminación y el laparoscopio, permitiendo la salida de aire del interior de la cavidad abdominal, antes de retirar las cánulas. Una vez finalizada la inseminación es conveniente que los animales permanezcan por 2-3 horas en un corral, antes de ser trasladados al campo (Gibbons y Cueto, 2004).

Esta técnica permite realizar un uso muy eficiente del semen. Al depositarse la dosis de inseminación en proximidad del ovario, basta un bajo número de espermatozoides para preñar una hembra. Esto permite obtener, mediante una adecuada dilución y fraccionamiento del semen, entre 60 y 150 dosis fecundantes de un mismo eyaculado (3000-7000 millones de espermatozoides) (Evans y Maxwell, 1993).

El volumen de la dosis utilizado normalmente en inseminación laparoscópica es de 0.025 a 0.05 ml. El número de espermatozoides totales por dosis de inseminación varía entre 40 y 50 millones, obteniéndose tasas de preñez del 50 al 60 % (Hafez, 2002).



Figura 16. Inseminación Artificial Laparoscópica

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.9.5 Inseminación Artificial Transcervical

La inseminación transcervical puede llevarse a cabo mediante una pistola de inseminación multidosis, que permite mediante un émbolo dentado, inseminar varias ovejas una vez cargado el semen, así como graduar el volumen de la dosis de inseminación (Fonseca,2009).

El semen se aspira desde el tubo de colección, dejando previamente una cámara de aire de 2 ml. El lugar donde se practicará la inseminación debe estar limpio, a una temperatura ambiental de 20-25°C y libre de corrientes de aire (Durán, *et al.*, 2008).

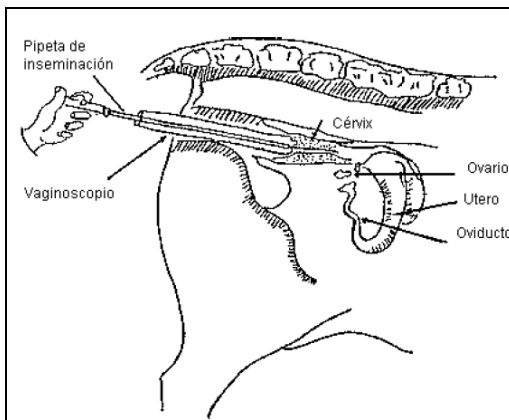


Figura 17. Esquema de Inseminación Artificial Transcervical

Fuente: Gibbons y Cueto, 2004.

Para realizar la inseminación transcervical, las hembras se presentan inclinadas cabeza-abajo, con los cuartos traseros montados sobre una baranda o riel. Las

ovejas deben sujetarse un mínimo de tiempo, evitando causar estrés innecesario (Sánchez, 2004).

Se limpia la vulva con una toalla y se aplica una muy pequeña cantidad de vaselina para facilitar la introducción del vaginoscopio. Este se introduce lentamente hasta el fondo de la vagina de la hembra, donde se localiza el orificio de entrada al útero (cérvix) (Hafez, 2002).

La punta de la vaina de inseminación se guía hasta la entrada del orificio uterino y es introducida mediante suaves movimientos giratorios, hasta donde se presente resistencia.

Una vez descargado el semen es conveniente que la hembra permanezca durante dos o tres minutos en la posición de inseminación, y luego en un brete contiguo a los machos por un par de horas. La dosis utilizada es de 0.1 ml. Los porcentajes de preñez logrados en Inseminación Transcervical con semen fresco, y dosis de 100-150 millones de espermatozoides, varían entre el 60 y 70% (Gibbons y Cueto, 2004).



Figura 18. Inseminación Artificial Transcervical

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

3.10 DETECCIÓN DE PREÑEZ EN OVEJAS MEDIANTE ECOGRAFÍA

Una de las herramientas básicas en la mejora de la rentabilidad de las explotaciones ovinas es el diagnóstico de gestación. Con ésta se persigue disminuir en lo posible las pérdidas económicas que ocasionan los animales no gestantes. Desde hace ya muchos años, la Ecografía o ultrasonografía está siendo utilizada como una herramienta importante en el manejo, diagnóstico y tratamiento de los procesos reproductivos (Capurro, 2006).

La ecografía en la producción ovina se utiliza entre otras cosas para:

- Diagnóstico de gestación (Preñadas – Vacías).
- Número de corderos por gestación (Preñeces Múltiples).
- Determinación del sexo fetal.
- Determinación de la edad de gestación.

- Estudio de ovarios y útero durante el ciclo estral y gestación.
- Diagnóstico de patologías del aparato reproductor.

Las técnicas utilizadas pueden ser: Vía Transrectal y Vía Abdominal, las cuales se describen a continuación:

3.10.1 Ecografía Transrectal

Por esta vía es posible realizar una detección precoz de preñez a los 16-17 días post servicio con una eficiencia del 70% dependiendo de la destreza del operador. Además se puede determinar gestaciones múltiples a los 20-22 días cuando el embrión posee 1 cm de longitud. Los animales deberán permanecer en ayuno por lo menos 12 horas previa la evaluación. Se recomienda lubricar correctamente el transductor para evitar posibles daños en el recto (Soto, *et al.*, 2003).

3.10.2 Ecografía Abdominal

En esta técnica se coloca el transductor en la región inguinal (delante y por arriba de la inserción mamaria). Los puntos anatómicos de referencia que se tiene son la vejiga y útero. Para mayor facilidad en el manejo del ecógrafo la oveja debe permanecer de pie colocada en una manga elevada. La preñez se detecta a partir de los 28-30 días post-servicio (Soto, *et al.*, 2003).



Figura 19. Ecografía Abdominal

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

IV. METODOLOGÍA

4.1 UBICACIÓN DEL LUGAR DE INVESTIGACIÓN

4.1.1 Ubicación Política Hacienda “Agrícola Pura Vida”

Provincia: Santa Elena

Cantón: Santa Elena

Parroquia: Chanduy

Comuna: “El Azúcar”

Hacienda: “Agrícola Pura Vida”

4.1.2 Ubicación Geográfica Hacienda “Agrícola Pura Vida”

Norte: Comuna “El Azúcar”

Sur: Comuna “Pechiche”

Este: Comuna “El Zapotal”

Oeste: Comuna “San Rafael”

4.1.3 Ubicación Ecológica Hacienda “Agrícola Pura Vida”

Altitud: 34 msnm

Temperatura Promedio: 23,8 ° C

Temperatura Máxima:	29,8 ° C
Temperatura Mínima:	17,8 ° C
Precipitación Anual:	524 mm
Humedad Relativa:	80 %

4.2 MATERIALES

6.2.1 Semovientes

- ✓ Ovejas con valor genético para inseminación artificial.
- ✓ Carneros con valor genético para extracción de semen.

6.2.2 Equipos

- ✓ Laparoscopio
- ✓ Ecógrafo.
- ✓ Microscopio.
- ✓ Termo transportador de pajuelas.
- ✓ Baño María.
- ✓ Pipetas de inseminación.
- ✓ Camilla inmovilizadora.
- ✓ Vagina artificial.
- ✓ Pistola de inseminación laparoscópica.

- ✓ Espéculo.
- ✓ Vaginoscopio.

6.2.3 Insumos y Varios

- ✓ Pastillas de semen congelado.
- ✓ Semen fresco.
- ✓ Hormonas: Novormon (eCG).
- ✓ Dispositivos intravaginales para sincronización de celo.
- ✓ Anestésico: Ketamina, Xilacina, Atropina
- ✓ Diluyente comercial para semen ovino: Triladil
- ✓ Condones.
- ✓ Vaselina.
- ✓ Gel para ecografía.
- ✓ Gasas.
- ✓ Desinfectante.
- ✓ Guantes quirúrgicos.
- ✓ Jeringuillas.
- ✓ Tubos de ensayo.
- ✓ Eterol.
- ✓ Toallas de papel descartable.
- ✓ Registros.
- ✓ Material de escritorio.



Figura 20. Materiales utilizados para extracción y evaluación seminal

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Perfeccionar la técnica de inseminación artificial vía laparoscópica y transcervical con ovejas de bajo valor genético.

Con el fin de perfeccionar la técnica de inseminación artificial laparoscópica y transcervical, se realizó una fase de entrenamiento, en la cual se utilizaron ovejas de bajo valor genético pertenecientes al hato ovino de la Hda. Agrícola “Pura Vida”.

En esta fase de entrenamiento se realizó la identificación de la anatomía del aparato reproductor de la oveja y sus respectivas estructuras. Posteriormente se utilizó el laparoscopio y vaginoscopio para la identificación de los mismos en el interior de la oveja viva.

En esta fase de entrenamiento se realizó la identificación de la anatomía del aparato reproductor de la oveja y sus respectivas estructuras. Posteriormente se utilizó el laparoscopio y vaginoscopio para la identificación de los mismos en el interior de la oveja viva.



Figura 21. Prácticas en la fase de entrenamiento

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

Una vez concluido el aprendizaje teórico-práctico, y después de haber realizado las prácticas necesarias del correcto uso del laparoscopio y vaginoscopio, se procedió a aplicar el protocolo acorde a lo descrito en el capítulo IV de éste documento.

4.3.2 Validar el protocolo de inseminación artificial laparoscópica y transcervical con semen fresco y congelado previa sincronización de celo con progestágenos.

Con esta investigación se implementó el Programa Reproductivo en el proyecto ovino de la Hda. Agrícola “Pura Vida”, el mismo que se detalla a continuación:

Como punto de partida se realizó ecografía abdominal a todas las hembras del hato ovino que se encontraban sin identificación y por lo tanto no poseían registros que determinen si dichas hembras estaban en periodo de gestación o se encontraban vacías. Dentro del grupo de hembras vacías, con la finalidad de homogenizar el grupo de estudio, se procedió a evaluar y pre seleccionar a los animales que cumplieron con las siguientes características:

- Condición Corporal (CC) comprendida entre 2.5 a 3.5.
- Hembras de primer y segundo parto.

Después de la pre selección se procedió a realizar los siguientes exámenes en las hembras que cumplieron los requisitos antes mencionados y se determinó mediante los mismos, las hembras aptas para ser sometidas a las técnicas de inseminación artificial transcervical y laparoscópica:

- Examen coprológico básico.

- Hemograma completo.
- Examen clínico general.
- Examen ginecológico.
- Revisión de patas.
- Grado FAMACHA (detección de anemia)



Figura 22. Revisión de anemia y Condición Corporal

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

Es importante destacar que en el proceso de selección, fueron descartadas las hembras que presentaron los siguientes problemas: grado FAMACHA menor a 2, infecciones vaginales, panadizo y queratoconjuntivitis (nube blanca).

Para mejorar la Condición Corporal de las ovejas, 15 días antes de la inseminación artificial, se sometió a las hembras a un procedimiento nutricional

conocido como *flushing*, para mejorar la eficiencia reproductiva del grupo en estudio, el mismo que consistió en el suministro de 400 g de maíz/hembra/día (Palacios, 2012).

Las hembras seleccionadas, de raza Pellibuey y Dorper, fueron distribuidas en tres tratamientos, a razón de 13 animales por tratamiento. Los tratamientos fueron determinados de acuerdo a la técnica de inseminación artificial y a la dosis de inseminación utilizada, conforme se detalla a continuación:

T1: Inseminación Artificial Transcervical con semen fresco. (Dosis 0.1 ml.)

T2: Inseminación Artificial Laparoscópica con semen fresco. (Dosis 0.05 ml. por cuerno).

T3: Inseminación Artificial Laparoscópica con semen congelado. (Dosis 0.05 ml. por cuerno).

Para la identificación de cada tratamiento las hembras fueron marcadas con pintura en la grupa con colores: rojo (T1), verde (T2) y amarillo (T3) respectivamente.



Figura 23. Identificación de las hembras con color rojo, amarillo y verde respectivamente, de acuerdo a cada tratamiento.

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

Posterior a esto, se procedió a sincronizar los celos de las ovejas seleccionadas mediante la aplicación de esponjas vaginales impregnadas con 60 mg de acetato de medroxiprogesterona cada una. Las esponjas fueron retiradas 12 días después de su aplicación, y el procedimiento se complementó con el suministro de 250 U.I. de eCG por vía intramuscular, hormona que estimula la ovulación.

El protocolo de sincronización de celos entre tratamientos tuvo un intervalo de dos días para facilitar el manejo de las ovejas.

Los protocolos implementados dentro del Programa Reproductivo Ovino de la Hda. Agrícola “Pura Vida” se detallan a continuación:

PROTOCOLO DE SINCRONIZACIÓN DE CELOS

1. El día 0, se colocó una esponja intravaginal impregnada con 60 mg. de acetato medroxiprogesterona a cada una de las hembras seleccionadas, durante 12 días.
2. El día 12 se inyectó 250 U.I. de Novormon (eCG) por vía intramuscular, post retiro de las esponjas.
3. El día 14, dentro de 48 y 56 horas después del retiro de los esponjas intravaginales y posteriores a la ovulación, se procedió a realizar la inseminación artificial laparoscópica y transcervical con semen fresco y congelado respectivamente.

APLICACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS INTRAVAGINALES

1. Se desinfectó el aplicador antes y después de cada aplicación.
2. Se introdujo la esponja por la extremidad biselada del aplicador.
3. Por el otro extremo del aplicador, se introdujo la varilla hasta que ésta topó con la esponja.
4. El aplicador fue colocado suavemente al fondo de la vagina, con un poco de lubricante para facilitar la introducción.
5. Para retirarla, se haló del hilo gradualmente.



Figura 24. Colocación de esponjas vaginales

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.



Figura 25. Retiro de esponjas vaginales

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE SEMEN:

Para la extracción de semen con vagina artificial, se procedió a entrenar a tres machos de razas Pelibuey, y Dorper. La extracción se realizó 3 veces al día, por 3 días a la semana, durante 15 días.

1. Se seleccionó machos con características fenotípicas deseables.
2. Una hembra “maniquí” estrogenizada, fue colocada en el cepo inmovilizador.
3. El macho mediante el olfato determinó la presencia de celo en la hembra y empezó el “cortejo nupcial”
4. Posterior al reflejo de monta del macho hacia la hembra, se le presentó la vagina artificial, y existió eyaculación.
5. El semen recolectado fue cuidadosamente manipulado para evitar, cambios bruscos de temperatura.
6. Posterior a esto se procedió a realizar la evaluación de las características macro y microscópicas del semen recolectado.

La evaluación de las muestras seminal extraídas, fueron realizadas de la siguiente manera:

El volumen fue determinado de acuerdo a la cantidad de eyaculado de cada carnero; para la concentración se realizó el conteo de los espermatozoides mediante la cámara de Neubauer, la motilidad masal fue evaluada al microscopio de 40 aumentos

mediante una gota de semen colocada en un porta objetos y mediante la escala numérica del 1 al 6, siendo 6 la mejor y 1 la peor; el color o aspecto fue determinado mediante la escala numérica de 0 a 5, siendo 5 la mejor y 0 la peor; y el N° de dosis seminales fue determinado mediante la concentración espermática considerando, mortalidad, anormalidades, vivos y muertos.



Figura 26. Extracción seminal

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

Posteriormente se procedió a la dilución del semen, mediante el siguiente procedimiento: 5ml de diluyente comercial, 15 ml de yema de huevo y 80 ml de agua destilada. Esta mezcla está considerada para la obtención de 80 pastillas de semen.

PROTOCOLO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL LAPAROSCÓPICA

1. Se utilizó semen fresco y pastillas de semen congelado.
2. No se proporcionó alimento ni agua a las ovejas durante 12 horas antes de la inseminación artificial.
3. Se suministró anestésico general. La sedación se realizó con la aplicación por vía intravenosa, y se colocó 3 ml de ketamina, y otra inyección simultánea de 0.16 ml de Xilacina, combinado con 0.5 ml de Atropina por animal (Palacios, 2012).
4. El animal fue colocado en una camilla inmovilizadora para facilitar la operación.
5. Se procedió a lavar, rasurar y desinfectar la zona abdominal.
6. Se utilizó trocar para punzar la cavidad abdominal.
7. Una vez perforada la cavidad abdominal, en el lado izquierdo de la oveja se introdujo el lente de fibra óptica y en el lado derecho la pinza de manipulación que posteriormente fue reemplazada por la pistola de inseminación.
8. Con una suave punción sobre el cuerno uterino, el semen fue depositado mediante la pistola de inseminación, 0.05 ml. por cuerno.
9. En las incisiones se colocó antibiótico local en spray.
10. Posteriormente la oveja fue colocada en un corral, donde tuvo disponibilidad de agua y alimento.

PROTOCOLO DE INSEMINACIÓN ARTIFICIAL TRANSCERVICAL

1. La oveja fue colocada cabeza-abajo, con los cuartos traseros levantados.
2. La vulva fue desinfectada y se aplicó lubricante para facilitar la introducción del vaginoscopio.
3. El vaginoscopio fue introducido hasta el fondo de la vagina de la hembra, donde se localizó el orificio de entrada al útero (cérvix), utilizando una linterna.
4. La punta de la vaina de inseminación se colocó en la entrada del orificio uterino, y fue introducida con movimientos giratorios, hasta donde hubo resistencia.
5. El semen fue depositado en la entrada del cérvix en una cantidad de 0.1 ml.
6. Posteriormente la oveja fue colocada en posición normal.

4.3.3 Comparar el porcentaje de efectividad de las dos técnicas reproductivas utilizadas mediante ecografía abdominal.

Después de haber cumplido con los protocolos establecidos, 45 días posteriores a la inseminación artificial transcervical y laparoscópica, se procedió a realizar el diagnóstico de preñez mediante ecografía abdominal.



Figura 27. Detección de preñez mediante ecografía abdominal

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

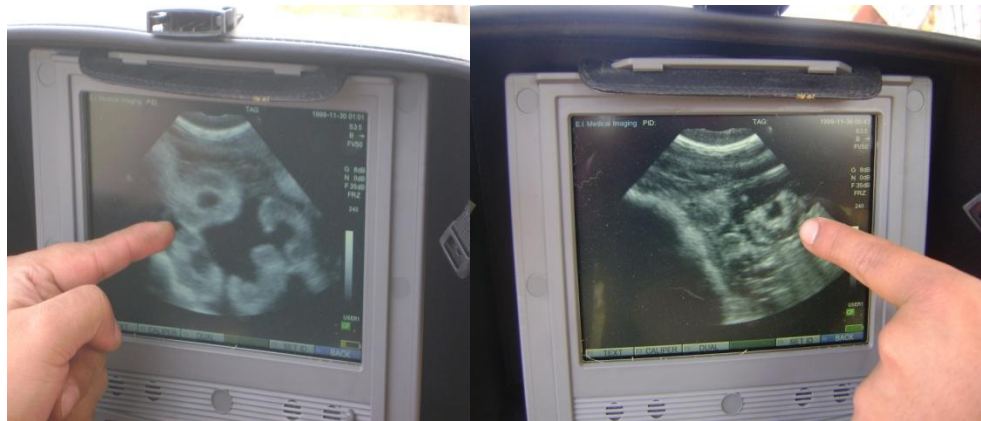


Figura 28. Cotiledones de ovejas a los 50 días de gestación

Fuente: El autor. Hda. Agrícola “Pura Vida”, 2012.

4.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la determinación de la calidad seminal en las variables: volumen y concentración espermática, se utilizó el análisis estadístico ANOVA, que mide variables de distribución normal; y para las variables aspecto y motilidad masal, se utilizó el Test de Kruskal-Wallis, que es un método no paramétrico, que mide variables de libre distribución.

Para la variable, Porcentaje de Preñez, se utilizó el método estadístico denominado Regresión Logística, que permitió determinar la efectividad de cada técnica de Inseminación Artificial, expresada en porcentaje.

4.5 VARIABLES A MEDIR

Las variables medidas en esta investigación fueron las siguientes:

a) **Calidad de semen:** Se evaluaron características macro y microscópicas para determinar la viabilidad y calidad seminal.

- Macroscópicas:
 - ✓ Volumen
 - ✓ Aspecto

- Microscópicas:
 - ✓ Motilidad masal
 - ✓ Concentración
 - ✓ Morfología
 - ✓ Número de dosis por eyaculado
 - ✓ Viabilidad del semen post dilución

b) Porcentaje de preñez (fecundidad): Esta variable midió el número de ovejas preñadas, después de la aplicación de las técnicas de Inseminación Artificial utilizadas en esta investigación. La determinación de preñez se realizó mediante ecografía abdominal.

c) Análisis de Costos: Se realizó en base a la comparación de los costos requeridos para la aplicación de cada tratamiento.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CALIDAD DE SEMEN

Para la determinación de la calidad seminal, se evaluaron los parámetros que se describen a continuación en 9 muestras extraídas de cada uno de los 3 carneros utilizados, dando un total de 27 muestras evaluadas.

5.1.1 VOLUMEN DE EYACULADO

El volumen promedio de eyaculado presentó diferencias estadísticas significativas entre los 3 carneros evaluados, obteniéndose como resultado 1.04 ml para el Carnero 1, 0.74 ml para el Carnero 2 y 0.94 ml para el Carnero 3 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de medias de Volumen de Eyaculado

Carnero	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
Carnero 1	1,044	0,02778	37,6	< 2e-16 ***
Carnero 2	0,744	0,03928	-7,637	7,11E-08 ***
Carnero 3	0,944	0,03928	-2,546	0,0178 *

*** Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Fuente: El autor, 2012.

Así mismo, los resultados obtenidos en la evaluación de volumen de eyaculado se pueden visualizar de manera gráfica (Fig. 29), definiéndose que el mejor promedio fue el perteneciente al Carnero 1.

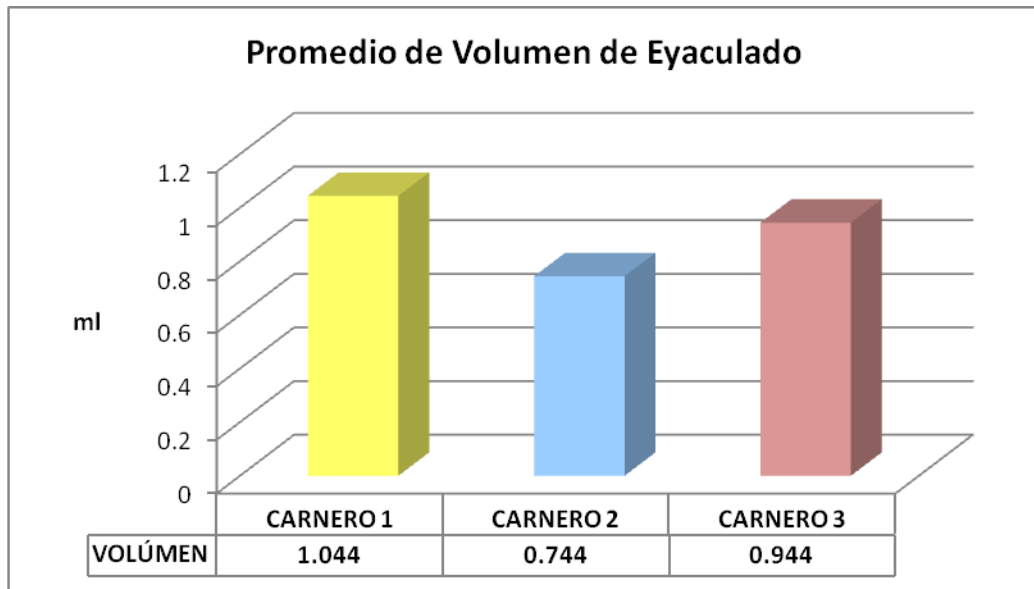


Figura 29. Promedio de Volumen de Eyaculado

Fuente: El autor, 2012.

Los volúmenes de eyaculado obtenidos en la presente investigación se acercan a lo descrito por Aisen (2004), que asevera que dichos valores deben oscilar entre 0.4 ml y 1.7 ml; la variación de la cantidad seminal obtenida puede deberse a factores como: edad, frecuencia de colecta seminal, nutrición, genética, entre otros.

5.1.2 ASPECTO

La valoración del aspecto seminal presentó diferencias estadísticas significativas para los 3 carneros en estudio, evaluándose esta variable en una escala numérica comprendida entre 0 y 5, siendo 5 la mejor por presentar un aspecto cremoso espeso y 0 la peor por presentar un aspecto acuoso, lo cual influye negativamente la capacidad de fecundación del semen (Cuadro 2).

Cuadro 2. Aspecto Seminal

Kruskal-Wallis rank sum test

data: as.factor(Aspecto) by Carnero

Kruskal-Wallis chi-squared = 19.7955, df = 2, p-value = 5.029e-05*

* *Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$)*

Fuente: El autor, 2012.

Para el Carnero 1, se estableció que 5 de las 9 muestras evaluadas, se encontraron en la escala numérica 5, correspondiente al aspecto cremoso espeso y las 4 restantes en la escala numérica 4, correspondiente al aspecto cremoso; para el Carnero 2, las 9 muestras se ubicaron en la categoría 3 correspondiente al aspecto cremoso suave y para el Carnero 3, se determinó que 7 muestras se ubicaron en la categoría 4 correspondiente al aspecto cremoso, y las 2 restantes en la categoría 3 correspondiente al aspecto cremoso suave (Fig. 30).

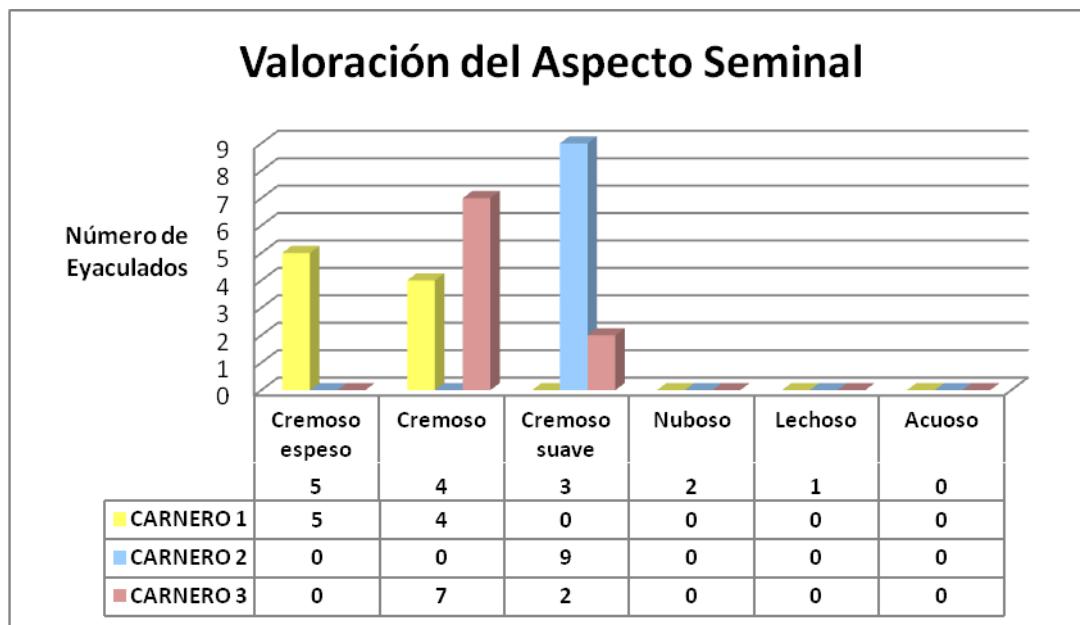


Figura 30. Valoración de Aspecto Seminal

Fuente: El autor, 2012.

5.1.3 MOTILIDAD MASAL

La motilidad masal fue valorada en base a las ondas espermáticas observadas, y fue medida dentro de una escala del 1 al 6, establecida según Aisen (2004), siendo 6 la mejor y 1 la peor, y presentó diferencia significativa para los 3 carneros en estudio. Las muestras evaluadas al microscopio de 40 aumentos, presentaron resultados favorables, los mismos que determinaron que el semen se encontró apto para ser utilizado mediante Inseminación Artificial (Cuadro 3).

Cuadro 3. Motilidad Masal

Kruskal-Wallis rank sum test

data: as.factor(Motilidad) by Carnero

Kruskal-Wallis chi-squared = 14.637, df = 2, p-value = 0.0006631*

* Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Fuente: El autor, 2012.

Para la valoración de motilidad masal dentro de la escala numérica, 8 de las 9 muestras obtenidas del Carnero 1 se ubicaron en la categoría 6, y 1 en la categoría 5; del Carnero 2, 7 muestras se ubicaron en la categoría 5, y 2 en la categoría 4 y del Carnero 3, 4 muestras se colocaron en la categoría 6 y 5 muestras en la categoría 5.

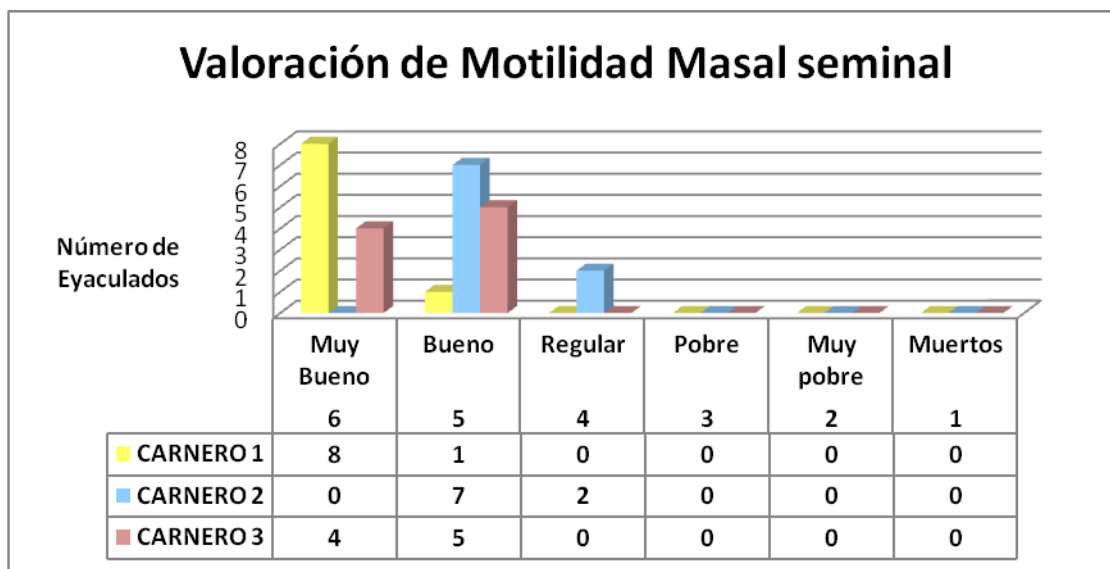


Figura 31. Valoración de Motilidad Masal Seminal

Fuente: El autor, 2012.

Todas las muestras extraídas estuvieron dentro de la escala 4 y 6 correspondientes a las categorías regular, bueno y muy bueno; valoración que permitió corroborar los datos publicados por Cueto, *et al* (2008), quienes aseguran que únicamente las muestras que tengan una motilidad buena o muy buena, son aptas para ser usadas para inseminación y aquellas muestras que posean una calificación menor a 3 serán descartadas y no podrán ser utilizadas para crioconservación, ya que no garantizan su capacidad fecundante.

5.1.4 CONCENTRACIÓN

El promedio de concentración de eyaculado presentó diferencias estadísticas significativas entre los 3 carneros evaluados, obteniéndose como resultado 3722 millones de esp/ml para el Carnero 1, 3011 millones de esp/ml para el Carnero 2 y 3434 millones de esp/ml para el Carnero 3 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración espermática

Carnero	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)	
Carnero 1	3722	39,93	93,212	< 2e-16	***
Carnero 2	3011	56,47	-12,592	4,58E-12	***
Carnero 3	3434	56,47	-5,115	3,10E-05	***

*** Indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Fuente: El autor, 2012.

Los datos de este estudio evidencian que la concentración espermática más alta corresponde al Carnero 1, sin embargo, se establece que el semen obtenido de los otros 2 Carneros, fue de buena calidad, ya que se encontró dentro de los rangos aceptables según lo señalado por Mellisho y Gallegos (2006), que afirman que un semen de carnero de buena calidad contiene de 3.5 a 6.0 millones de espermatozoides/ ml. La variación que existe en la concentración espermática de uno a otro eyaculado puede depender de factores externos y propios de cada animal.

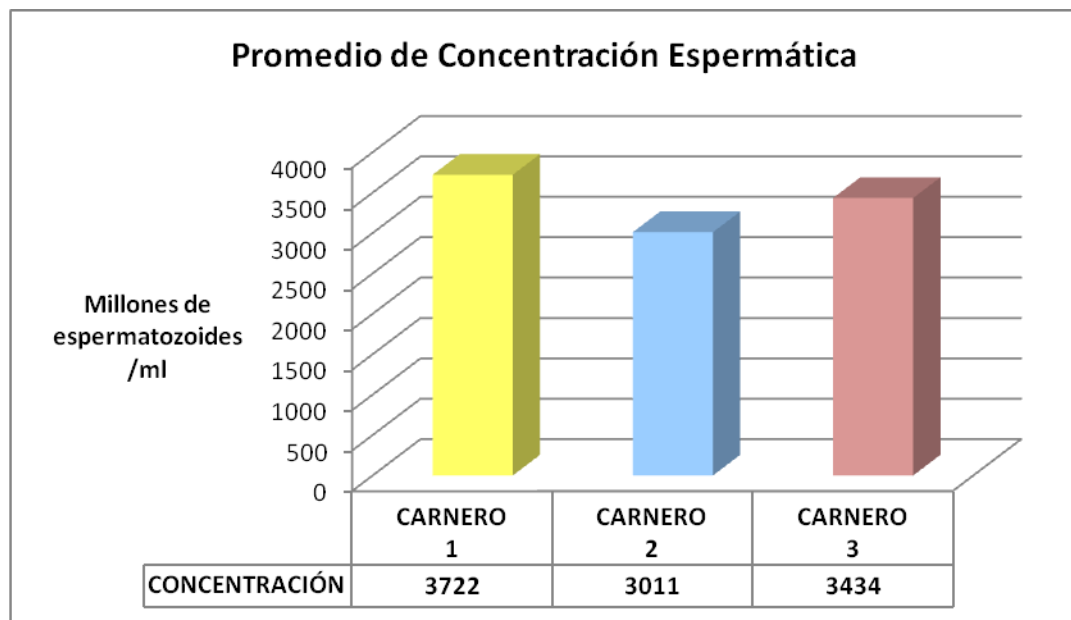


Figura 32. Concentración Espermática

Fuente: El autor, 2012.

Estos resultados evidencian, que la calidad seminal del Carnero 1, fue superior a la de los Carneros 2 y 3, presentando mayor volumen, mejor concentración

espermática, aspecto y motilidad masal. Por estas razones el semen fue utilizado para la realización de este estudio.

Además existe relación directa entre la concentración y el aspecto, en los resultados obtenidos del Carnero 1, lo que demuestra que mientras mayor es la concentración espermática existente en un eyaculado ovino, el color o aspecto se vuelven más intensos.

5.1.4 MORFOLOGÍA

El examen morfológico, realizado a las muestras extraídas de los 3 carneros en estudio, determinó que las anomalías totales encontradas en el semen fueron menores al 10 %, siendo éstas de cabeza y cola.

En ningún caso se encontró malformaciones que evidencien la presencia de problemas de degeneración testicular, procesos inflamatorios del testículo, entre otros, citados por Gómez y Migliorisi (s/f), evidenciando la buena salud reproductiva de los reproductores.

5.1.5 NÚMERO DE DOSIS POR EYACULADO

La concentración espermática promedio del Carnero 1 fue de 3722 millones de espermatozoides/ml, y considerando mortalidad, anomalías, vivos y

muertos se alcanzó una concentración espermática de 2714 millones de espermatozoides/ml, de la cual se obtuvieron dosis seminales efectivas para la Inseminación Artificial del grupo de hembras en estudio, que se refieren a continuación:

Para semen fresco, con una concentración por dosis de 150 millones de espermatozoides se obtuvieron 18 dosis, y para semen congelado, con una concentración de 50 millones de espermatozoides se obtuvieron 54 dosis seminales.

5.1.6 VIABILIDAD DEL SEMEN POST DILUCIÓN

Antes de utilizar el semen para la Inseminación Artificial, se realizó el análisis al microscopio de la motilidad masal, encontrándose resultados óptimos y se procedió a mantener el protocolo de dilución.

5.2 PORCENTAJE DE PREÑEZ (FECUNDIDAD)

Los porcentajes de preñez obtenidos, no presentan diferencias estadísticas significativas entre sí, sin embargo muestran diferencias numéricas en porcentaje entre cada técnica de inseminación aplicada. La efectividad de cada tratamiento se presenta de la siguiente manera: Inseminación Artificial Transcervical con semen fresco (T1) 77%, Inseminación Artificial Laparoscópica con semen fresco (T2) 62% e Inseminación Artificial Laparoscópica con semen congelado (T3) 54%, siendo el T1, el tratamiento más efectivo al presentar el mayor porcentaje de hembras preñadas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de preñez por Tratamiento

Preñez	T1	T2	T3	Grand Total
No	23.08%	38.46%	46.15%	35.90%
Si	76.92%	61.54%	53.85%	64.10%
Grand Total	100.00%	100.00%	100.00%	100.00%

Sin diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Fuente: El autor, 2012.

El porcentaje de preñez obtenido por cada tratamiento en estudio se puede evidenciar en las figuras de la siguiente manera:

En el (T1) Inseminación Artificial Transcervical con semen fresco, de las 13 hembras inseminadas, 10 se preñaron (77%) y 3 se encontraron vacías (23%) (Fig. 33).

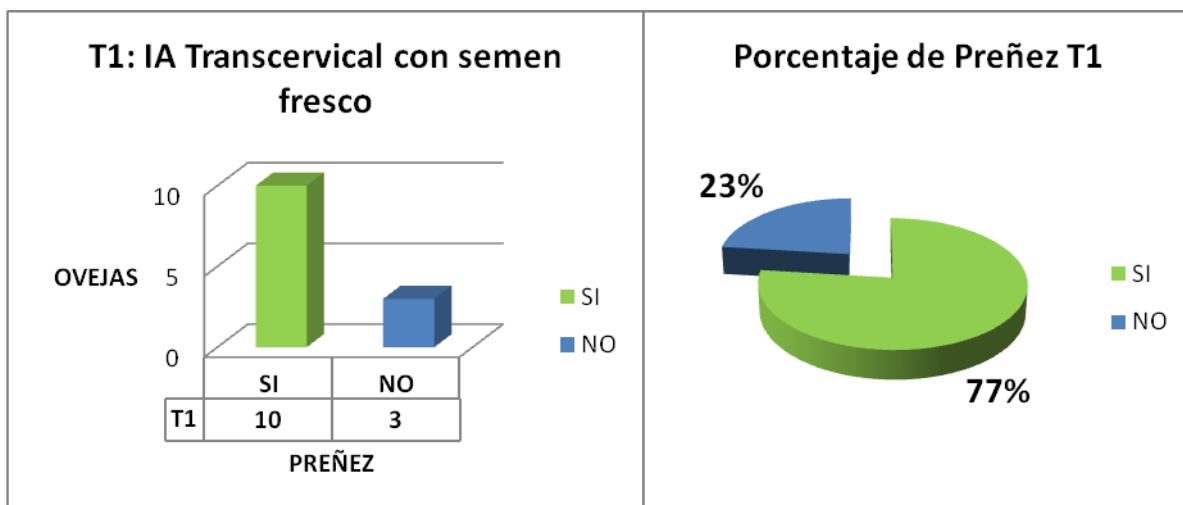


Figura 33. Porcentaje de Preñez T1

Fuente: El autor, 2012.

En el (T2) Inseminación Artificial Laparoscópica con semen fresco, de las 13 hembras inseminadas, 8 se preñadas (62%), y 5 se encontraron vacías (33%) (Fig.34).

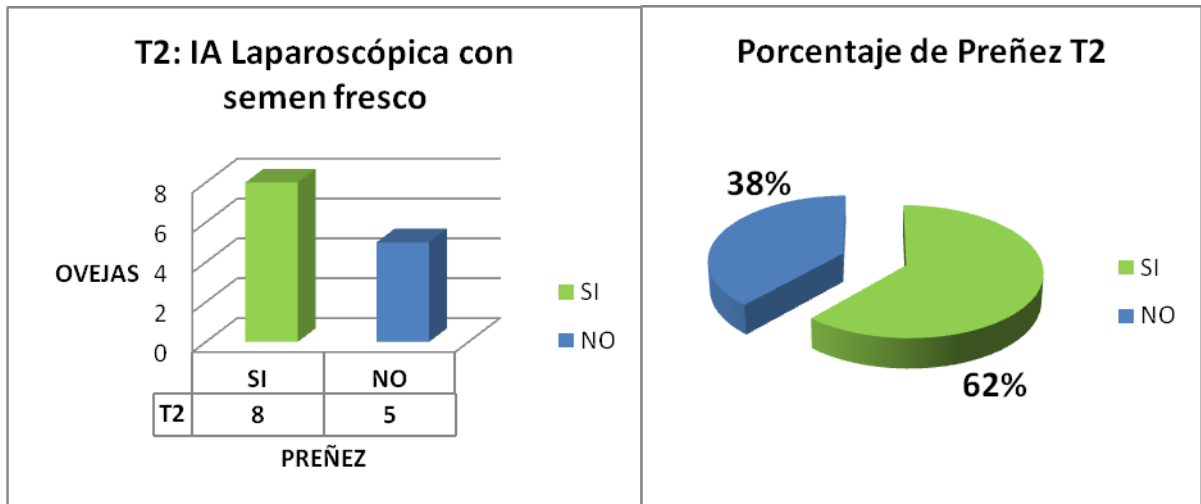


Figura 34. Porcentaje de Preñez T2

Fuente: El autor, 2012.

En el (T3) Inseminación Artificial Laparoscópica con semen congelado, de las 13 hembras inseminadas, 7 se preñaron (54%), y 6 se encontraron vacías (46%) (Fig.35).

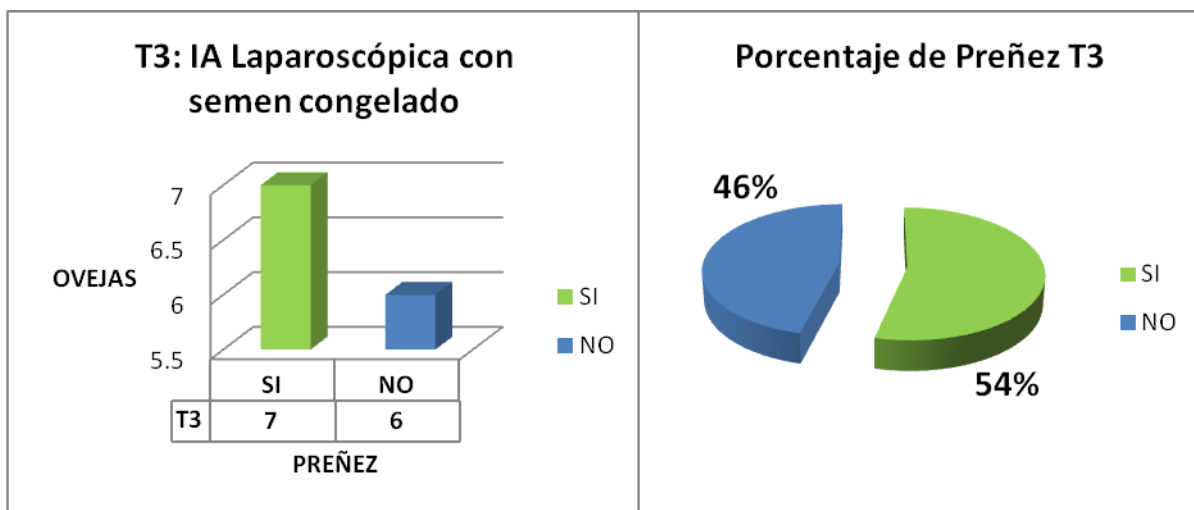


Figura 35. Porcentaje de Preñez T3

Fuente: El autor, 2012.

El OR (Cuadro 6) representa el número de veces que cada tratamiento incide en el porcentaje de preñez de las hembras; y ratifica que el T1 sube 2 veces el porcentaje de preñez con respecto al T2; y el T3 baja 1,2 veces dicho porcentaje respecto del T1.

Cuadro 6. Comparación de Efectividad entre Tratamientos

Tratamiento	OR	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
T1	2.0005	0.6934	0.8889	0.78	0.435
T2	1.0000	1.0837	0.7892	1.373	0.17
T3	1.2032	-0.185	0.8192	-0.226	0.821
Raza Pellibuey	2.5896	-0.9515	0.7833	-1.215	0.224

Sin diferencias significativas ($p <= 0,05$)

Fuente: El autor, 2012.

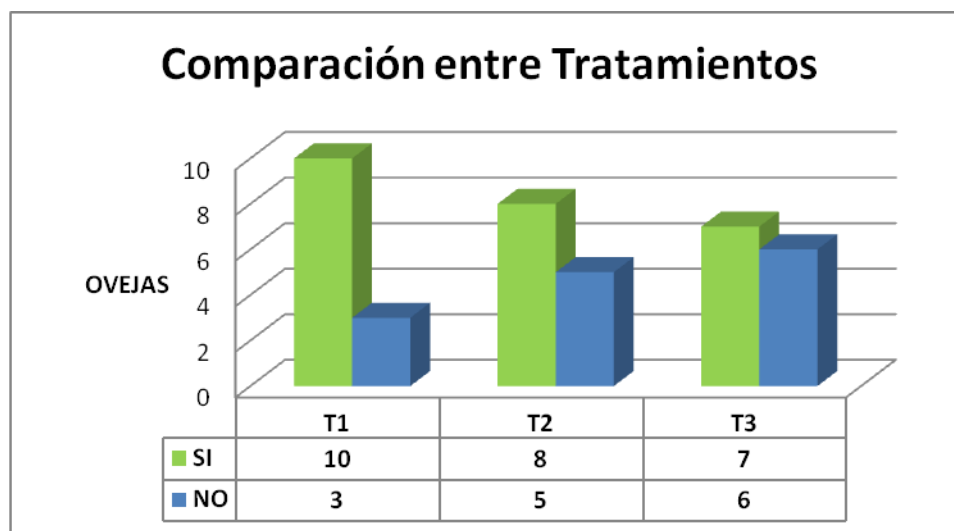


Figura 36. Porcentaje de Preñez entre Tratamientos

Fuente: El autor, 2012.

Los resultados descritos, son similares a los publicados por Bedolla (2002), que sostiene que, para Inseminación Artificial Transcervical con semen congelado los rangos de efectividad deben situarse entre 60 y 80%; para Inseminación Artificial Laparoscópica con semen fresco entre 70 y 90%, y para Inseminación Artificial Laparoscópica con semen congelado, entre 50 y 80 %. Los resultados del T2 difieren con los antes mencionados, posiblemente por las razas utilizadas, concentración espermática, nutrición de las hembras inseminadas, factores propios de cada animal, entre otros, aspectos de los cuales no se tiene mayores referencias por lo que no se puede establecer las razones ideales para este comportamiento.

Del total de hembras Dorper utilizadas para Inseminación Artificial, el 79% se preñó y el 21 % no se preñó y del total de hembras Pelibuey, el 54 % se preñó y el 46% no se preñó (Cuadro 7); éste efecto podría deberse a que las hembras de la raza Dorper, respondieron de manera más efectiva al *flushing* suministrado 15 días antes de la inseminación, así como también a la adaptación de la misma a las condiciones medio ambientales.

Cuadro 7. Porcentaje de Preñez por Raza

Preñez	Dorper	Pelibuey	Grand Total
No	21.43%	44.00%	35.90%
Si	78.57%	56.00%	64.10%
Grand Total	100.00%	100.00%	100.00%

Sin diferencias significativas ($p < 0,05$)

Fuente: El autor, 2012.

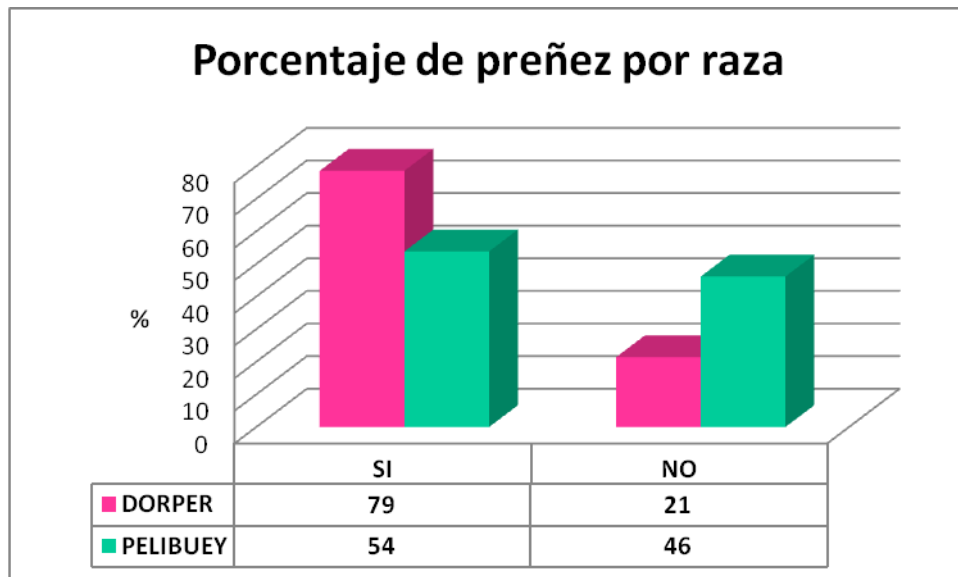


Figura 37. Porcentaje de Preñez por Raza

Fuente: El autor, 2012.

Los costos requeridos para la implementación de las técnicas de Inseminación Artificial por tratamiento se detallan a continuación (Cuadro 8, 9, 10):

Cuadro 8. Costos Inseminación Artificial Transcervical con semen fresco (T1)

Producto	Cantidad	Unidad	Valor unitario (\$)	Total (\$)
Flushing (Concentrado)	78	kg	0,33	25,7
Sincronización				
Esponjas intravaginales	13	unidad	2,1	27,3
Hormonas (eCG)	13	dosis	2,75	35,8
Mano de Obra	13	animales	1,2	15
Pajuelas de I.A.	13	dosis	5	65
Proceso de I.A	13	procesos	1,25	16,25
TOTAL				185,05

Fuente: El autor, 2012.

Cuadro 9. Costos Inseminación Artificial Laparoscópica con semen fresco (T2)

Producto	Cantidad	Unidad	Valor unitario (\$)	Total (\$)
Flushing (Concentrado)	78	kg	0,33	25,7
Sincronización				
Esponjas intravaginales	13	unidad	2,1	27,3
Hormonas (eCG)	13	dosis	2,75	35,8
Mano de Obra	13	animales	1,2	15
Anestésicos	13	dosis	4,64	60,32
Pajuelas de I.A.	13	dosis	5	65
Proceso de I.A	13	procesos	5	65
TOTAL				294,12

Fuente: El autor, 2012.

Cuadro 10. Inseminación Artificial Laparoscópica con semen congelado (T3)

Producto	Cantidad	Unidad	Valor unitario (\$)	Total (\$)
Flushing (Concentrado)	78	kg	0,33	25,7
Sincronización				
Esponjas intravaginales	13	unidad	2,1	27,3
Hormonas (eCG)	13	dosis	2,75	35,8
Mano de Obra	13	animales	1,2	15
Anestésicos	13	dosis	4,64	60,32
Pajuelas de I.A.	13	dosis	10	130
Proceso de I.A	13	procesos	5	65
TOTAL				359,12

Fuente: El autor, 2012.

Los costos por tratamiento, difieren unos con otros principalmente por la técnica de Inseminación Artificial utilizada y por el costo de procesamiento del semen. La dosis de semen fresco tiene un valor comercial de \$5, y la dosis en pastilla de semen comercial un valor comercial de \$10.

Los costos individuales de cada hembra inseminada de acuerdo a cada tratamiento utilizado son los siguientes:

T1 \$14,2; T2 \$ 22,6 y T3 \$27,6; además los costos por hembra preñada de cada tratamiento son: T1 \$18,5; T2 \$36, 7 y T3 %51,3; determinándose que el T1 es 36% más económico que el T3, tomado como base por ser el tratamiento mas costoso.

La difusión de la metodología y los resultados obtenidos en esta investigación se impartió a los interesados para su conocimiento y aplicación mediante

un video demostrativo de las técnicas de Inseminación Artificial evaluadas que servirá como material didáctico para los alumnos en formación.

VI. CONCLUSIONES

- El análisis de la calidad seminal de los tres carneros utilizados para la presente investigación, presentó diferencias estadísticas significativas en las variables medidas: volumen, concentración, aspecto y motilidad masal, determinando que el carnero 1 fue superior al carnero 2 y carnero 3, por lo que éste reproductor fue utilizado para la extracción y procesamiento seminal, para la Inseminación Artificial de las hembras seleccionadas.
- Los porcentajes de preñez obtenidos, en la aplicación de las técnicas de: Inseminación Artificial Transcervical con semen fresco (T1), Inseminación Artificial Laparoscópica con semen fresco (T2) e Inseminación Artificial Laparoscópica con semen congelado (T3), no muestran diferencias estadísticas significativas entre sí, entendiéndose que con la aplicación de cualquiera de las tres técnicas reproductivas, se puede obtener resultados entre el 54 y 77%.
- Las técnicas de Inseminación Artificial utilizadas en éste trabajo de investigación, mostraron resultados de efectividad esperados, por lo que su aplicación dependerá de los requerimientos y necesidades de cada ganadería ovina.

- Para la aplicación de las técnicas de reproducción evaluadas en ésta investigación es de suma importancia un período de capacitación y adiestramiento, así como buenas condiciones nutricionales y de manejo de las hembras y machos reproductores, para obtener un apropiado desempeño reproductivo.
- El análisis de los costos de los respectivos tratamientos, estableció que el T1, es el más económico para su aplicación, determinándose que el costo por hembra preñada para los diferentes tratamientos es: T1 \$18,5; T2 \$36,7 y para T3 \$51,3.

VII. RECOMENDACIONES

- Para hatos ovinos con condiciones similares a los de la Hda. “Agrícola Pura Vida”, se recomienda por costos y facilidad de aplicación, la utilización de la técnica de Inseminación Artificial Transcervical correspondiente al T1.
- Para la utilización de cualquiera de las técnicas de Inseminación Artificial, se recomienda la aplicación de un adecuado protocolo de extracción y procesamiento de semen, el mismo que debe seguir normas básicas de sanidad, temperatura, manejo, ya que de esto dependerá la obtención de dosis seminales viables y de buena calidad.
- Dado el alto potencial que las técnicas reproductivas permiten obtener, se recomienda la difusión y comercialización de semen ovino congelado, para su crioconservación y utilización de acuerdo a las necesidades de cada ganadería.
- Se recomienda el uso de estas técnicas de Inseminación Artificial, en hatos ovinos que cumplan con las condiciones adecuadas de manejo, sanidad y nutrición, mismas que permitirán obtener resultados favorables, que se verán reflejados en ganancias económicas, mismas que permitirán a las ganaderías ovinas su desarrollo y competitividad.

- Para la aplicación de las técnicas de Laparoscopia, se recomienda el uso adecuado y responsable de los anestésicos requeridos para este procedimiento, para evitar complicaciones que ponga en riesgo el bienestar de los animales utilizados.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, L. y Andrade, S. 2008. El efecto del macho reduce la edad al primer estro y ovulación en corderas Pelibuey. Arch. Zootec. 57.
- Aguilar, D.; Celser, R.; Franz, H.; Gómez, M.; Insaurralde, M.; Robson, R. 2009. Corridale, Bs. As. 4-9.
- Aisen, E. 2004. Reproducción Ovina y Caprina. Primera Edición. Editorial Inter-Médica. Argentina, 203 págs.
- Bearden, H.; Fuqway, J. 1982. Reproducción animal aplicada. Primera Edición. Editorial El Mundo Moderno. México. 230 págs.
- Bertot, J.; Garay, M.; Marshall, W.; Santiesteban, D. 2007. Evaluación de la Condición Corporal en Ovejas. Curso-Taller Internacional de Producción Sostenible de Ovino-Caprino. Universidad de Camaguey, Cuba.
- Buxadé, C. 1996. Bases de Producción Animal. Tomo VIII. Producción Ovina. Ediciones Mundi-Prensa. España. 380 págs.

- Buratovich, O. 2010. Eficiencia reproductiva en ovinos: factores que afectan. Parte II: otros factores no nutricionales. EEA INTA Esquel. Carpeta Técnica, Ganadería N. 36. 16 págs.
- Cambero, P. 1999. Cuaderno de la explotación de ovinos. Servicio Agrario de Caja Duero. Segunda Edición. España. 80 págs.
- Durán, F.; Hernández, H.; Latorre, D. 2008. Manual de Explotación y Reproducción de Ovejas y Borregos. Grupo Latino Editores Ltda. Colombia. 742 págs.
- Hafez, B. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Séptima Edición. México. 515 págs.
- Hervé, M.; Escobar, A.; Fernández, J. 2007. Producción Ovina. Salviat Impresiones. Chile. 66 págs.
- Laing, L.; Brinley, M.; Wanger, W. 1991. Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria. Cuarta Edición. Mac Graw-Hill. España. 324 págs.
- Manes, J.; Hozbor, F.; Sanchez, E. 2004. Primer curso práctico de Inseminación Artificial en ovinos. Argentina. 30 págs.

- Martínez, A.; Mazarri, M.; Rodríguez, J.; Quintana, H.; Chico, C. 1999. Suplementación Energética y Proteica pre-servicio en Ovejas west african. *Zoootenia tropical*, 4 (1y2): 19-28.

- Revista Líderes Emprendedores. 20011. Producción Ovina en el Ecuador.

- Robles, C. 2004. Salud Reproductiva del Carnero. Editorial EEA. Primera Edición. Argentina. 32 págs.

- Sánchez, C. 2004. Cría y Mejoramiento del Ganado Ovino. Editorial Ripalme. Perú. 134 págs.

PÁGINAS WEB

- Azzarini, M. 1992. Reproducción en ovinos en América Latina (en línea). Argentina. Consultado el 25 de Enero del 2012. Disponible en www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2010-2/arch-8.pdf

- Bedolla, C. 2002. *Técnicas de inseminación artificial en ovinos (en línea)*. México. Consultado el 05 de Febrero del 2012. Disponible en <http://www.ovinos-caprinos.com.ar/INSEMINACION/inseminacion-ovinos.pdf>

- Boretto, J.; Gibbons, A.; Bunge, M.; Cueto, M.; Bidinost, F. 2002. Calidad seminal post-descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos (en línea). Argentina. Consultado el 25 de Enero del 2012. Disponible en http://www.vet-uy.com/articulos/artic_forest/publicaciones_de_salud_animal.htm

- Capurro, M. 2006. Sistema de control de gestación ovina mediante ecografía (en línea). Uruguay. Consultado el 05 de Febrero del 2012. Disponible en <http://www.ccee.edu.uy/ensenian/catcontesp/ej/ejemplo%20Ovinos%20Sistema%20de%20Control%20Gestacion.pdf>

- Cesa, A. 2005. La selección de los carneros (en línea). Argentina. Consultado el 04 de Enero del 2012. Disponible en http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/ovinos/04=Documentaci%C3%B3n%20Tecnica/04-Genetica/_archivos/000000_Seleccion%20de%20Carneros.pdf

- Cueto, M.; Gibbons A. 2004. Eficiencia de la inseminación artificial con semen congelado en ovinos (en línea). Argentina. Consultado el 12 de Enero del 2012. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/inseminacion_ovinos/02-eficiencia_inseminacion.pdf

- Cueto, M.; García J.; Gibbons, A. 2008. Obtención y Procesamiento y Conservación del Semen Ovino (en línea). Argentina. Consultado el 20 de Octubre del 2012. Disponible en <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210332.pdf>

- Chemineau, P.; Delgadillo, J.; Malpaux, B.; Morello H. 2003. Estacionalidad reproductiva en pequeños rumiantes: mecanismos fisiológicos y técnicas para la inducción de una actividad sexual contra-estación (en línea). Chile. Consultado el 17 de Octubre del 2012. Disponible en <http://www.seoc.eu/docs/pr/pRv2n1mar01.pdf>

- *Bedolla, C. 2002. Técnicas de inseminación artificial en ovinos (en línea). México. Consultado el 25 de Septiembre del 2012. Disponible en <http://www.ovinos-caprinos.com.ar/INSEMINACION/inseminacion-ovinos.pdf>*

- *Boretto, J.; Gibbons, A.; Bunge, M.; Cueto, M.; Bidinost, F. 2002. Calidad seminal post-descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos (en línea). Argentina. Consultado el 25 de Enero del 2012. Disponible en http://www.vet-uy.com/articulos/artic_forest/publicaciones_de_salud_animal.htm*

- *Evans, G.; Maxwell, W., 1993. Salamon's artificial insemination of sheep and goats (en línea). Australia. Consultado el 04 de Enero del 2012. Disponible en <http://www.exopol.com/seoc/docs/wqojar0t.pdf>*

- *Foote, R. 2002. The history of artificial insemination (en línea). EEUU. Consultado el 25 de Enero del 2012. Disponible en <http://www.asas.org/Bios/Footehist.pdf>*

- *Gélvez, L. 2010. El ciclo estral de las ovejas (en línea). México. Consultado el 26 de Septiembre del 2012. Disponible en*

http://mundo-pecuario.com/tema247/reproduccion_ovejas/ciclo_estral_ovejas-1451.html

- Gómez, M.; Migliorisi, A. s/f. Protocolo para la evaluación de semen en rumiantes (en línea). Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Consultado el 14 de Septiembre del 2012. Disponible en <http://www.fcv.unlp.edu.ar/sitios-catedras/8/material/ProtocoloEval.Semen.pdf>

- González, R. 2002. Contrastación seminal (en línea). s.l. Consultado 14 de Octubre del 2012. Disponible en <http://www.avicultura.com/docscu/CU2002Dic394-399.pdf>

- Hidalgo, C.; Tamargo, C.; Diez, C. s/f. Análisis del semen ovino (en línea). Boletín informativo del SERIDA N. 2. s.l. Consultado el 27 Septiembre del 2012. Disponible en <http://www.serida.org/pdfs/01495.pdf>

- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2006. Inseminación artificial con semen fresco en ovinos (en línea). Estación Experimental Agropecuaria Bariloche Centro Regional Patagonia Norte. Argentina. Consultado el 20 de Octubre del 2012. Disponible en http://www.cuencarural.com/ganadería/ovinos/inseminacion_artificial_con_semen_fresco_en_ovinos/

- Mellisho, E.; Pinazo, R.; Rivas, V. 2006. Inseminación artificial vía laparoscópica de ovejas Black Belly con semen congelado (en línea). Perú. Consultado el 04 de Enero del 2012. Disponible en <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v17n2/a08v17n2.pdf>

- Mellisho, E.; Gallegos, A. 2006. Manual de Laboratorio de Reproducción Animal (en línea). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima- Perú. Consultado el 23 de Junio del 2012. Disponible en <http://tarwi.lamolina.edu.pe/emellisho/reproduccion/Pract05.pdf>

- Porras, A.; Valencia, J.; Zarco, L. (s/f). Estacionalidad reproductiva en ovejas /en línea). México. Consultado el 17 de Octubre del 2012. Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvo19/CVv9cl.pdf>

- Rangel, R. 2002. Mejoramiento de la calidad genética y reproductiva del ganado (en línea). México. Consultado el 25 de Enero del 2012. Disponible en http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrur/ESTUDIOS_E_INVESTIGACIONES/GANADERIA/manuales%20caprino/manual6.PDF

- Redondo, P. 2002. Esquema de la regulación hormonal en la hembra (en línea). Perú. Consultado el 23 de Septiembre del 2012. Disponible en http://legado.inea.org/web/zootecnia/Zootecnia/Hormonas_hembra.htm

- Salamon, S. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras (en línea). España. Consultado el 05 de Febrero del 2012. Disponible en <http://www.plusformacion.com/Recursos/r/Tecnicas-inseminacion-artificial-ovinos>

- Ungerfeld, R.; Rubiantes, E. 2002. Perspectivas de la investigación reproductiva ovina en América Latina en el marco de las actuales tendencias productivas (en línea). Uruguay. Consultado el 04 de Febrero del 2012. Disponible en <http://www.alpa.org.ve/PDF/Arch%2010-2/arch-8.pdf>

- Universidad de Córdoba. Departamento de Producción Animal. 2006. Inseminación Artificial: Recolección y conservación del semen (en línea). España. Consultado el 02 de Septiembre del 2012. Disponible en <http://www.uco.es/zootecniaygestion/menu.php?tema=120>

ENTREVISTAS PERSONALES

- Alcocer, C. 2012. Productora Privada de ganado ovino.
- Palacios, J. 2012. Gerente Proyecto Ovino, Hda. “Agrícola Pura Vida”