TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y BIOLÓGICAS

CARRERA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN A LAS 0, 24 Y 48 HORAS SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN DE SEMENTALES DE LA LÍNEA ZANGERSHEIDE"

Tesis para optar el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentado por:

Ana Paola Sánchez Quispe (0000-0003-3499-013X)

Asesor:

Alexei Vicent Santiani Acosta (0000-0001-9740-5490)

Lima – Perú

2023

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Lima, 14 de junio del 2023.

Los integrantes del Jurado de tesis:

Presidente: Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Miembro: Ing. Zoot. PAOLA GIOVANNA MARIA QUINTANA DOLORES
Miembro: MVZ. CARLOS ALONSO SEGURA ZEVALLOS

Se reúnen para evaluar la tesis titulada:

"ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN A LAS 0,24 Y 48 HORAS SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN DE SEMENTALES DE LA LÍNEA ZANGERSHEIDE"

Presentada por la bachiller: **ANA PAOLA SÁNCHEZ QUISPE**

Para optar el Título Profesional de **Médico Veterinario Zootecnista**

Asesorada por el: **Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA**

Coasesorada por el: **Mg. RODOBEL OLMOS ACEVEDO**

Luego de haber evaluado el informe final de tesis y evaluado el desempeño de la bachiller de la carrera de **Medicina Veterinaria y Zootecnia** en la sustentación, concluyen: de manera unánime (x) por mayoría simple ( ) calificar a:

Tesista: **ANA PAOLA SÁNCHEZ QUISPE**			Nota: Dieciseis
Aprobado ( )	Aprobado - Muy buena (x)	Aprobado - Sobresaliente ()	Desaprobado ( )

Los miembros del jurado firman en señal de conformidad.

Mg. JORGE LUIS VILELA VELARDE
Presidente

Ing. Zoot. PAOLA GIOVANNA MARIA QUINTANA DOLORES
Miembro 1

MVZ. CARLOS ALONSO SEGURA ZEVALLOS
Miembro 2

Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA
Asesor

Mg. RODOBEL OLMOS ACEVEDO
C6-Asesor

T // (511) 610 6738
informes@cientifica.edu.pe
cientifica.edu.pe

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ANEXO: FORMATO DE DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS O TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DE CONTENIDO DE INFORME FINAL DE TESIS / TRABAJO DE INVESTIGACIÓN[1]

Lima, 17 de Julio del 2023

Señor,
Rubén Borja

Director General de Investigación, Desarrollo e Innovación
Universidad Científica del Sur
Presente. –

De nuestra consideración,

Yo: Ana Paola Sánchez Quispe, egresado de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Científica del Sur, en conjunto con el asesor de tesis Alexei Vicent Santiani Acosta declaramos que este informe final de tesis/trabajo de investigación titulado: Análisis del efecto de la refrigeración a las 0, 24 y 48 horas sobre la viabilidad espermática del semen de sementales de la línea Zangersheide, sustentado para obtener el título/grado de Médico Veterinario y Zootecnista es original.

Es decir, no contiene plagio parcial ni total, cuando se utilizó información de fuentes externas se reconoció la autoría mediante la adecuada citación y los resultados obtenidos son producto entero de mi (nuestra) investigación y no han sido falseados ni fabricados. Todo esto en cumplimiento del Código de ética en la investigación, Reglamento del Comité de Integridad Científica, Reglamento de Propiedad Intelectual, Normas y procedimientos de los trabajos de investigación para la obtención de títulos profesionales y grados académicos [2], que afirmamos conocer en su totalidad.

Por ello, en caso de identificarse alguna situación de plagio, falsificación o fabricación de resultados, nos allanamos al proceso de investigación que establezca la Universidad y las posibles sanciones que pudieran surgir.

Firmamos en conformidad con lo declarado,

Firma tesista
DNI: 73681993

UNMSM

Firma del asesor de tesis
DNI:

[1] En conformidad con la Resolución del Consejo Directivo N° 084-2022-SUNEDU/CD
[2] Los documentos están en: https://investigacion.cientifica.edu.pe/reglamentos/

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

INFORME DE REVISIÓN DE ORIGINALIDAD

Título del documento evaluado. Análisis del efecto de la refrigeración a las 0, 24 y 48 horas sobre la viabilidad espermática del semen de sementales de la línea Zangersheide

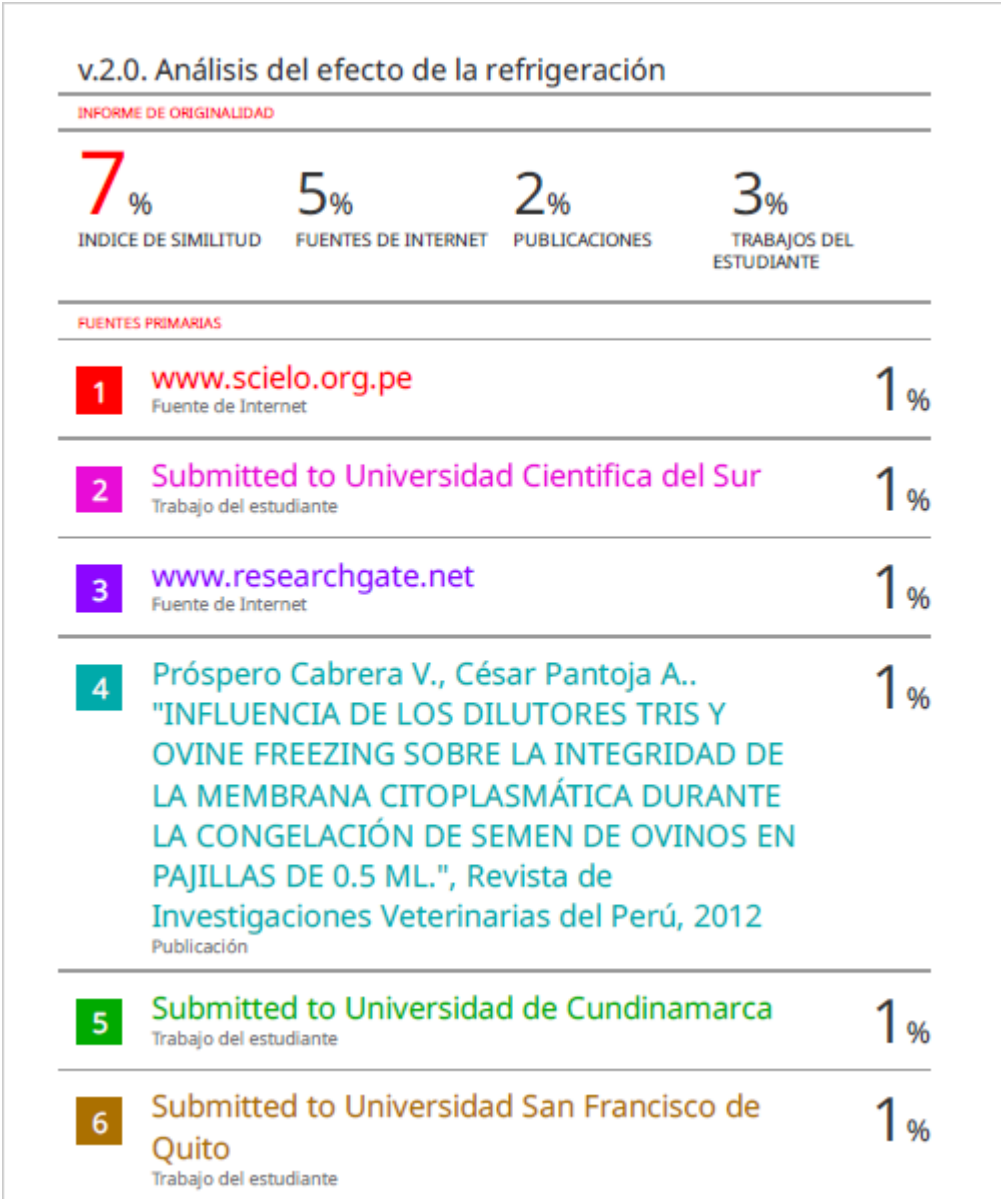
Autores. Ana Paola Sanchez Quispe.

Mecanismo de revisión de originalidad. Evaluación con Turnitin (ID 2231459292).

Resultado de la evaluación. 7%

Revisado por. Magaly Kelly Guerrero Huaracallo.

Comentarios sobre la revisión. Filtros usados: excluir fuentes de menos de 12 palabras.



v.2.0. Análisis del efecto de la refrigeración

INFORME DE ORIGINALIDAD

7%	5%	2%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.scielo.org.pe Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Cientifica del Sur Trabajo del estudiante	1%
3	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
4	Próspero Cabrera V., César Pantoja A.. "INFLUENCIA DE LOS DILUTORES TRIS Y OVINE FREEZING SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DURANTE LA CONGELACIÓN DE SEMEN DE OVINOS EN PAJILLAS DE 0.5 ML.", Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 2012 Publicación	1%
5	Submitted to Universidad de Cundinamarca Trabajo del estudiante	1%
6	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Trabajo del estudiante	1%

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

RESUMEN

Durante la refrigeración del semen, los espermatozoides alteran sus características funcionales al ser mantenidos a una temperatura distinta a la corporal. Por lo tanto, es necesario evaluar la influencia del tiempo de refrigeración sobre los parámetros de calidad espermática. Es por ello que el objetivo de este trabajo es analizar el efecto del tiempo de la refrigeración a las 0, 24 y 48 horas sobre la viabilidad espermática del semen de sementales de la línea Zangersheide. Se evaluaron 15 eyaculados de sementales de la línea Zangersheide pertenecientes a la base Las Palmas del Ejército peruano. La viabilidad seminal fue evaluada con la tinción Eosina - Nigrosina. El porcentaje de viabilidad espermática en los tres tiempos fue 53.13 ± 8.28 %, 46.70 ± 7.98 % y 27.63 ± 8.16 %, correspondientes a los tiempos de refrigeración 0, 24 y 48 horas respectivamente, existiendo una disminución significativa ($p < 0.001$) entre los tres grupos. Se puede concluir que, para el conjunto de sementales de la Línea Zangersheide, existe un efecto del tiempo de refrigeración sobre la viabilidad espermática.

Palabras clave: viabilidad, espermatozoides, Zangersheide, tinción Eosina – Nigrosina, refrigeración

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

ABSTRACT

During semen refrigeration, spermatozoa alter their functional characteristics when kept at temperatures other than body temperature. Therefore, it is necessary to evaluate the influence of refrigeration time on sperm quality parameters. That is why the aim of this study is to analyze the effect of refrigeration time at 0, 24 and 48 hours over the spermatic viability of Zangersheide stallion semen. Fifteen ejaculates from Zangersheide stallions from Las Palmas base of the Peruvian Army were evaluated. Seminal viability was evaluated with Eosin-Nigrosin staining. The percentage of sperm viability in the three times was 53.13 ± 8.28 %, 46.70 ± 7.98 % and 27.63 ± 8.16 %, corresponding to refrigeration times 0, 24 and 48 hours respectively, with a significant decrease ($p<0.001$) between the three groups. It is concluded that there is an effect of refrigeration over sperm viability in Zangersheide stallions.

Key words: viability, spermatozooa, Zangersheide, Eosin-Nigrosin stain, refrigeration

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Análisis del efecto de la refrigeración a las 0, 24 y 48 horas sobre la viabilidad espermática del semen de sementales de la línea Zangersheide

Effect of refrigeration at 0, 24 and 48 hours over sperm viability in Zangersheide stallions

Refrigeración y viabilidad en espermatozoides equinos

Ana Paola Sánchez Quispe [1], *Alexei Vicent Santiani Acosta* [2]

Rodobel Olmos Acevedo [3]

[1]Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas, Universidad Científica del Sur, Lima, Perú

[2]Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

[3]Hospital Veterinario Central del Ejército, Base Aérea Las Palmas, Lima, Perú

Institución responsable: Universidad Científica del Sur (UCSUR)

Autor correspondiente: Alexei Vicent Santiani Acosta

Dirección: Av, Circunvalación 2800, San Borja

Teléfono: +51 992 754 758

Email: asantiania@unmsm.edu.pe

Página web: www.unmsm.edu.pe

Fuente financiera: Autofinanciamiento

Artículo derivado de la tesis: "Evaluación del efecto del tiempo de refrigeración sobre la integridad funcional de la membrana espermática en semen de padrillos de la línea Zangersheide"

Tesista: Ana Paola Sánchez Quispe

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

INTRODUCCIÓN

El semen puede ser utilizado para realizar la Inseminación Artificial (IA) en forma fresca, refrigerada o congelada (Martínez et al., 2006). En forma fresca, el semen debe utilizarse justo después de su colecta ya que la motilidad y viabilidad de los espermatozoides disminuye rápidamente por un aumento de ácido láctico en el eyaculado (Vivanco, 1998). Por esto último se debe descartar el uso de semen fresco cuando se desee aparear individuos geográficamente alejados.

Por el contrario, con el semen refrigerado se puede conservar la calidad seminal por un mayor tiempo y da oportunidad a una mayor flexibilidad de su uso en programas de IA (Giraldo et al., 2006). La temperatura a la que las muestras seminales están sometidas afectan su calidad generando que la probabilidad de preñez de la yegua disminuya; por tanto, es de suma importancia conocer el tiempo en el que la muestra de semen permanezca refrigerada conservando las características ideales para lograr una preñez exitosa (Giraldo et al., 2006; Cabrera y Pantoja, 2012). Autores mencionan que las bajas temperaturas de almacenamiento afectan la viabilidad espermática dependiendo de las horas de almacenamiento (Stornelli et al., 2001; Cabrera y Pantoja, 2012)

El análisis de la viabilidad espermática es el componente principal para la identificación de la fertilidad (Roa et al., 2012). Dicho parámetro se evalúa por medio de inspección visual vía microscopio diferenciando los espermatozoides vivos y los espermatozoides muertos. Para esta diferenciación se utilizan los colorantes Eosina y Nigrosina mezclado con la muestra seminal, en la que el paso de la eosina a través de la membrana indica la pérdida de funcionalidad e integridad que se pierde al momento en que la célula inicia su proceso de muerte (Cromakit, 2011). Este proceso permite la distinción de las tonalidades de los espermatozoides. Los muertos se tiñen de color rojo mientras que los vivos se muestran incoloros (Roa et al., 2012).

El objetivo de la refrigeración es el de disminuir el metabolismo energético de los espermatozoides (Choque, 2017) con el fin de prolongar su viabilidad, durabilidad y capacidad

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

fecundante en el tiempo y por ende su supervivencia; sin embargo, un enfriamiento que se produce demasiado rápido podría provocar un "choque de frío". Devireddy et al., (2002), mencionan el choque térmico existe cuando los espermatozoides son enfriados de 37°C a 8 °C con una velocidad superior a los 0.38 °C /min. Uno de los signos de este choque de frío son la pérdida de la motilidad, alteración y aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y disminución de la capacidad fecundante (Hermansson, 2006).

Los daños celulares principales ocasionados durante el proceso de refrigeración son las alteraciones en la morfología donde se puede encontrar ruptura de la membrana plasmática y /o degeneración de la membrana acrosomal además de lesiones mitocondriales (De Leeuw et al., 1990). Durante la refrigeración, el porcentaje de viabilidad espermática se ve disminuida por el efecto de la temperatura y de la presión osmótica conllevando a la alteración en la composición lipídica de las membranas espermáticas, permeabilidad y cambios en el líquido intracelular (Thomas et al., 1998). Debido a que se genera el desequilibrio osmótico entre el medio extracelular e intracelular por efecto de la temperatura, el espermatozoide difunde agua al compartimiento intracelular y por ende, la célula aumenta su volumen generando hinchamiento (Ducci et al., 2002). La hipertonicidad causa inestabilidad de la membrana plasmática (Cabrera y Pantoja, 2008). Al verse alterada la membrana plasmática y la membrana acrosomal se generan cambios en la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular (Cabrera y Pantoja, 2012).

En consecuencia, de la alteración de la integridad de las membranas plasmática y acrosomal se genera hinchamiento y disrupción de las membranas, cambios en la salida y entrada de iones y variación de la actividad de las enzimas. Una de las alteraciones es el acúmulo de Calcio a nivel intracelular debido a que hay una reducción en la capacidad de la membrana para controlar la entrada de dicho ion. Esto podría inducir una capacitación espermática y la reacción acrosomal anticipada lo que afectaría la fertilidad (Tartaglione y Ritta, 2004). Maxwell y Salomon (2000) mencionan que el daño del espermatozoide es generado por el aumento del tiempo de almacenamiento y la alteración en su capacidad de regular el flujo de iones de calcio.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

El rango de temperatura óptima para mantener la motilidad espermática; por ende, la viabilidad y la fertilidad del semen equino refrigerado varía entre 4 y 6 °C (Orosco et al., 2011). Se ha reportado que el almacenamiento a 5 °C es viable para semen que será almacenado por periodos mayores a 12-24 horas (Squires et al., 1988). Sin embargo, a una temperatura de refrigeración de aproximadamente 5°C, la conservación del semen acarrea consecuencias perjudiciales como por ejemplo una disminución de la actividad metabólica del Sodio y Potasio intracelular, lo que genera una disfunción significativa en el flujo de iones de la membrana celular que ocasiona la disminución de la supervivencia del espermatozoide (Morrier et al., 2002).

La disminución a bajas temperaturas del semen equino conlleva al incremento de especies reactivas de oxígeno por el desacoplamiento del metabolismo oxidativo normal de los espermatozoides (Ortega et al., 2009). Carvajal (2019) menciona que el desequilibrio de la producción de especies reactivas de oxígeno y la capacidad antioxidante ocasionan la ruptura de la función celular y daños a los constituyentes celulares. Durante la refrigeración, el estrés oxidativo podría desencadenar la oxidación de los ácidos grasos, proteínas y del ADN de los espermatozoides equinos, lo que generaría una reducción de la motilidad, viabilidad y su capacidad fecundante (Morte et al., 2008).

El efecto del tiempo a temperaturas de refrigeración sobre la viabilidad espermática es desconocido en sementales de la línea Zangersheide por lo que el objetivo del presente trabajo es analizar efecto del tiempo de la refrigeración a las 0, 24 y 48 horas sobre la viabilidad espermática del semen de sementales de la línea Zangersheide.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y muestras

El experimento se desarrolló al evaluar 15 muestras seminales de tres padrillos de la Línea Zangersheide pertenecientes al departamento de reproducción del Hospital Veterinario Central del Ejército Peruano, estos eran los únicos sementales presentes en el establecimiento. Los equinos utilizados para este trabajo eran de fertilidad comprobada por crías nacidas vivas y con una motilidad espermática mayor a 65%. Las edades de los individuos eran 10, 11 y 17 años, tenían un peso de aproximadamente 500 Kg y una condición corporal entre tres y cuatro en una escala de uno a cinco. Los individuos se encontraban clínicamente sanos ya que una semana previa al experimento, estos fueron sometidos a análisis de hemograma y bioquímica donde sus resultados se encontraban dentro del rango normal. Previo a las colectas de semen, se realizó a cada semental el agotamiento de las reservas extragonadales con la finalidad de mejorar la resistencia de los espermatozoides al proceso de refrigeración (Canisso et al., 2008). Este proceso fue realizado colectando muestras de semen de los sementales una vez al día por siete días. Estas muestras no fueron evaluadas.

Colección y evaluación inicial de semen

Se utilizó una yegua en celo con folículo ovárico mayor a 35 mm detectado por ultrasonografía y signos de estro como levantar la cola, separar los miembros posteriores, orinar con frecuencia, contraer y relajar los labios vulvares con la eversión del clítoris, comúnmente llamado ¨guiño vulvar¨ (Heusner, 1993). Además de ello se utilizó una Vagina Artificial tipo Missouri a 42°C de temperatura. La vagina artificial constaba de un forro de látex termosellado formando una cámara en la cual se introdujo agua mediante una válvula que permitió el ingreso de agua y aire, en su parte externa cubierta por una funda de cuero.

Una vez lista y armada la vagina artificial, se procedió a lubricar el primer tercio de esta con una cantidad pequeña de gel estéril no espermicida. Al tener el material listo se procedió a

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

lavar con algodones húmedos a una temperatura de 37°C la fosa del glande y el proceso uretral para evitar la contaminación de la muestra de semen (Boeta et al., 2017). Luego de ello, el semental fue llevado junto con la yegua para realizar la monta. Las colectas se realizaron después de dos horas aproximadamente luego de haber detectado el celo. Estas fueron realizadas siempre por la mañana entre las siete y las ocho de la mañana cada cuatro días. Una vez se obtuvieron las muestras, estas fueron llevadas al laboratorio inmediatamente protegiéndolas de la exposición al sol. Las muestras fueron filtradas para separar la porción gelatinosa del eyaculado mediante un filtro de nylon. El parámetro evaluado para el análisis del presente estudio fue la viabilidad espermática (%) mientras que para verificar si los eyaculados tenían características normales fueron evaluados el volumen (ml), pH, motilidad (%) y la concentración espermática (millones/ml).

Procedimiento metodológico

Las muestras fueron dividieron en tres grupos: 0, 24 y 48 horas post refrigeración. La evaluación para cada grupo se realizó con el semen previamente diluido con Equiplus en relación 1:1 - 1:3 el cual contiene azúcares, buffers, Gentamicina y caseinatos que derivan de fracciones de proteína de leche (Minitube, 2014).

Almacenamiento y refrigeración de semen

Luego de realizar las diluciones, las muestras se colocaron en un Whirl-Pak sellado herméticamente. Estas fueron evaluadas a las 0 horas de refrigeración (semen fresco sin refrigerar), a las 24 horas post refrigeración y a las 48 horas post refrigeración. Las muestras que se sometieron al proceso de refrigeración (grupo 24 y 48 horas) fueron colocadas en un Equitainer que se encontraba a una temperatura de 5°C.

Evaluación de la viabilidad espermática

La evaluación fue realizada mediante la técnica de tinciones Eosina - Nigrosina que constaba en colocar 20 µL de muestra seminal en un portaobjetos, se le añadía 20 µL de tinción

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Eosina, se enjuagaba con agua destilada, luego de ello se añadía 40 µL de tinción Nigrosina, se enjuagaba con agua destilada y se dejaba secar la lámina para poder ser evaluada mediante un microscopio a un objetivo de 40X. Los espermatozoides teñidos de rojo estaban muertos (con pérdida de integridad de la membrana) mientras que los incoloros permanecían vivos (Mallma, 2019).

Consideraciones éticas

Todos los animales utilizados en el presente estudio fueron mantenidos de acuerdo a la legislación vigente sobre bienestar animal.

Análisis estadístico.

Para determinar si los parámetros siguieron la distribución normal se utilizó la prueba de Shapiro Wilk. El efecto del tiempo de refrigeración (0, 24 y 48 h) (Variable independiente) sobre el porcentaje de viabilidad espermática (variable dependiente) fue evaluado mediante análisis de varianza ANOVA de medidas repetidas con significancia de 5% seguido del test de Tukey (prueba de comparación de medias). Los análisis se ejecutaron con el programa Prism® version 3.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a las evaluaciones iniciales de volumen (53.93 ± 19.01), pH (7.09 ± 0.13), motilidad espermática (78.67 ± 8.34 %) y concentración espermática (155.47 ± 39.70 millones/ml), los eyaculados se encontraban dentro de los rangos normales para semen equino (Rousset et al., 1987; Amann y Graham., 1993). Los resultados muestran que el porcentaje de espermatozoides viables presentó una diferencia significativa entre los grupos 0, 24 y 48 horas ($p < 0.01$). En la prueba de comparación de medias (Test de Tukey) se encontró, con respecto al porcentaje de viabilidad espermática una disminución significativa entre los grupos 0 y 24 horas ($p < 0.01$) así como entre los grupos 24 y 48 horas ($p < 0.01$). (Cuadro 1)

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Cuadro 1. estadística descriptiva de los resultados de porcentajes de la viabilidad espermática a las 0, 24 y 48 horas

	0 horas	24 horas	48 horas
Promedio de la Viabilidad espermática (%)	53.13 *a*	46.7 *b*	27.63 *c*
Desviación estándar	8.28	7.98	8.16
mínimo (%)	37.5	31.5	15
máximo (%)	66.5	60	45.5

Valores obtenidos en base a las quince muestras seminales de tres sementales evaluadas a las 0, 24 y 48 horas.

a,b,c : Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.0001$).

A la evaluación del porcentaje de viabilidad a las 0 horas se encontró un promedio de 53.13 ± 8.28 %, similar a lo reportado por Giraldo., et al (2006) quienes evaluaron la viabilidad espermática del semen fresco de 5 sementales Criollos Colombianos, sus muestras fueron diluidas con el diluyente Kenney obteniendo como resultado 57 ± 6.4 % utilizando el mismo método de tinción que en nuestra investigación (Eosina - Nigrosina). A diferencia de nuestro estudio, ellos mantuvieron su muestra colectada en un medio que conservaba una temperatura de 37 °C por 10 minutos hasta llegar a su centro de investigación (Laboratorio de Medicina Tropical del CES) y analizarlo mientras que en nuestro estudio se trasladaba a temperatura ambiente por un aproximado de cinco minutos hasta llegar al laboratorio. Se sabe que a temperatura ambiente desciende la motilidad espermática, este parámetro se encuentra altamente relacionado con la viabilidad por lo que se podría presumir que la viabilidad también disminuiría, por ello Giraldo et al. (2006) obtuvieron resultados mayores. En otro estudio realizado por Paredes (2015), se obtuvo una viabilidad en semen fresco de 47.2±2.18, este resultado es menor al hallado en nuestro estudio, esto puede deberse a que se realizaron colectas consecutivas durante 7 días a intervalos de 24 horas mientras que en nuestro estudio se realizaron las colectas con un intervalo de 4 días.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Probablemente, al realizar colectas tan seguidas se generó agotamiento y estrés que podría disminuir los parámetros de calidad seminal.

La viabilidad tuvo una tendencia a disminuir mientras el tiempo de refrigeración aumentaba, esto se evidenció cuando a la evaluación a las 24 horas de semen refrigerado, el promedio de viabilidad espermática obtenido fue de 46.70 ± 7.98 %. Resultados semejantes fueron reportados por Dellepiane et al. (2015) quienes evaluaron Caballos Peruanos de Paso obteniendo 42.2 ± 1.84 % de viabilidad usaron un dilutor a base de leche descremada y glucosa. Ellos, al contrario de nuestra investigación, para evaluar la integridad acrosomal y viabilidad utilizaron FITC - PSA y yoduro de propidio respectivamente, para el caso de viabilidad e integridad acrosomal utilizaron un láser de excitación de 488 nm con una potencia de 20 mW, y detectaron la fluorescencia utilizando los canales de detección Ch02 (Para FITC - PSA) y Ch04 (Para Yoduro de propidio). El análisis de su estudio fue automatizado ya que se utilizó citometría de flujo por lo que sus resultados serían más confiables. Al tener hallazgos similares en nuestra investigación, podemos presumir que el conteo de espermatozoides viables en el microscopio fue realizado correctamente y resulta confiable. Asimismo, Pugliesi et al. (2012) reportaron que a las 24 horas post refrigeración a una temperatura de entre 6-8 ºC, el promedio de la viabilidad espermática fue 34.9 ± 22.9 % y 47.8 ± 21.4 % diluidos con los dilutores Kenney y Foote respectivamente. En nuestro estudio, la temperatura de refrigeración promedio fue de 5°C por lo que esta diferencia de temperaturas podría generar la variación en los resultados. Se sabe que el rango de temperatura óptima para mantener la motilidad espermática; por ende, la viabilidad y la fertilidad del semen equino refrigerado varía entre 4 y 6% (Orosco et al., 2011), Pugliesi et al. (2012) superan la temperatura ideal. Además de ello, las ligeras diferencias encontradas podrían deberse al contenido de los dilutores que Dellepiane et al. (2015) y Pugliese et al. (2012) utilizaron ya que todos fueron distintos. Los dilutores que estos autores utilizaron fueron uno a base de leche descremada más glucosa y Kenney, respectivamente. Pagl et al. (2006) realizaron un estudio comparativo entre el dilutor Equiplus y el dilutor Kenny donde observaron que el semen refrigerado diluído con el Equiplus obtuvo mejores resultados para la motilidad e integridad de membrana cuando este fue almacenado por periodos de hasta 72 horas.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

A las 48 horas post refrigeración, el resultado obtenido en nuestra investigación fue 27.63 ± 8.16 %, un estudio realizado por Dellepiane et al. (2015) obtuvieron un promedio del 31.6 ± 3.5 % de viabilidad espermática, siendo un resultado ligeramente mayor a los nuestros. Esto pudo deberse a que los sementales usados en su estudio tenían una edad promedio de 4 años y medio mientras que los evaluados en nuestra investigación tenían entre 8 y 11 años; además de ello, al usar citometría de flujo su conteo fue mucho más exacto y su margen de error fue menor al nuestro por tanto, los resultados varían. A su vez, Giraldo et al. (2006) reportaron en Caballos Criollos Colombianos un promedio de la viabilidad espermática de 30.4 ± 12% a las 48 horas post refrigeración, esta diferencia con nuestros resultados puede deberse a que la muestra recién colectada fue expuesta a temperatura ambiente mientras que la de los autores no, como ya se explicó anteriormente. Un estudio realizado por LeFrapper et al. (2010), en equinos Cuarto de Milla de entre 15 y 23 años demostró que la motilidad disminuye desde las 0 a las 24 horas y de las 24 a las 48 horas de refrigeración, sus resultados fueron 73.4 ± 4.2 % a las 0 horas, 71.1 ± 3.5 % a las 24 horas y 65.8 ± 6.2 % a las 48 horas. Esta disminución podría estar indicando una reducción de la viabilidad espermática ya que ambos parámetros se encuentran bastante relacionados.

Francl et al. (1987) mencionó que el semen almacenado por 24 horas tiene la capacidad de mantener un porcentaje de fertilidad semejante al semen fresco; sin embargo, al aumentar las horas en las que se encuentra a temperaturas de refrigeración, la motilidad espermática y los rangos de fertilidad pueden verse disminuidos. En un estudio realizado por Plaza et al. (2021) dos grupos de yeguas fueron inseminadas con semen refrigerado por 48h. Como resultados, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de preñez entre los tratamientos. Choque (2017), inseminó ovejas criollas con semen refrigerado por 24 horas cuya viabilidad había disminuido 20%, como resultado, obtuvo un 60% de tasa de preñez por lo que concluyó que es viable realizar la inseminación artificial con semen refrigerado por 24 horas debido a que presenta un porcentaje de preñez adecuado. Esto nos indica que es viable realizar la inseminación artificial con semen refrigerado hasta las 48 horas obteniendo como resultado una preñez exitosa.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

CONCLUSIÓN

Para el conjunto de sementales de la Línea Zangersheide, sí existe un efecto del tiempo de refrigeración sobre la viabilidad espermática, disminuyendo el porcentaje de viabilidad de 0 a 24 horas y también de 24 a 48 horas.

LITERATURA CITADA

1. ***Amann, R, Graham J. 1993***. In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. Journal of Andrology 14; 397-406.
2. ***Boeta M, Dias M, Hayen S. 2017.*** Manual de la práctica de profundización en reproducción equina. 1ª ed. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México. 64 p.
3. ***Bucci D, Giaretta E, Spinaci M, Rizzato G, Isani G, Mislei B, Mari G, Tamanini C, Galeati G. 2016.*** Characterization of alkaline phosphatase activity in seminal plasma and in fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. Theriogenology 15: 288-295.
4. ***Cabrera P, Pantoja, C. 2008.*** Influencia de los dilutores Tris y Ovine Freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. Rev Inv Vet Perú 19: 152-159.
5. ***Cabrera P, Pantoja, C. 2012.*** Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. Rev Inv Vet Perú 23: 192-200
6. ***Canisso I, Souza F, Ortagiza Escobar J, Carvalho G, Morel M, da Silva E. 2008.*** Congelamiento de semen de burro (Equus asinus). Rev Inv Vet Perú 19: 113-125.
7. ***Carvajal C. 2019.*** Especies reactivas de oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. Medicina Legal de Costa Rica 35: 91-100.
8. ***Choque F. 2017.*** Evaluación de la viabilidad espermática del semen refrigerado y tasa de preñez en ovejas criollas. Tesis de Médico Veterinario. Puno: Univ. Nac. del Altiplano. 38 p.

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

9. ***Cromakit Eosina. 2011.*** Nigrosina para tinción de espermatozoides; para diagnóstico ¨in vitro¨. Cataluña: Química Clínica Aplicada. Informe técnico. 1p.
10. ***De Leeuw F, Colenbrander A, Verkleij A. 1990***. The role membrane plays in cold shock and freezing injury. J Reprod Dom Anim Suppl 1: 95-104.
11. ***Dellepiane H, Chilge S, Vexelman D, Ugarelli A, Evangelista S, Santiani A. 2015.*** Evaluación de viabilidad e integridad acrosomal y actividad mitocondrial en semen refrigerado de caballo peruano de paso. Spermova. Asoc. Per. Reprod. Anim 5: 38-41.
12. ***Devireddy R, Swanlund D, Alghamdi A, Duoos L, Troedsson M, Bischof J, Roberts K. 2002.*** Measured effect of collection and cooling conditions on the motility and the water transport parameters at subzero temperatures of equine spermatozoa. Reproduction. 124: 643-8.
13. ***Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini P, Martelli F, Genazzani A . 2002***. Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. Eur J Obst Gynecol Reprod Biol 10: 53-56.
14. ***Francl A, Amann R, Squires E, Pickett, W. 1987.*** Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20 °C. Theriogenology 23: 925-34.
15. ***Giraldo S, Correa J, Vásquez. 2006.*** Evaluación del efecto de la refrigeración sobre la calidad del semen equino. Rev. CES Medicina Veterinaria y Zootecnia 1: 8-16.
16. ***Hermansson U. 2006.*** Studies of Canine and Feline Sperm Viability under Different Storage Procedures. Tesis de Médico Veterinario. Upsala: Swedish Univ. of Agricultural Science. 38 p.
17. ***Heusner G. 1993.*** Georgia: Horse breeding. [Internet], [22 diciembre 2022]. Disponible en: http://www.ces.uga.edu/pubcd /b945-w.html
18. ***LeFrapper L, Walston L, Whisnant C. 2010.*** Comparison of Various Extenders for Storage of Cooled Stallion Spermatozoa for 72 Hours. Journal of Equine Veterinary Science 30: 200-204

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

19. ***Mallma P. 2019.*** Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein. Tesis de Médico Veterinario. Apurimac: Univ. Nac. Micaela Bastidas de Apurimac. 60p.
20. ***Martínez R, Hernández J, Hernández H, Michel A, Valencia J. 2006.*** Inseminación artificial intrauterina en cabras criollas con semen refrigerado Agrociencia 40: 71-76.
21. ***Maxwell M, Salomon S. 2000.*** Storage of ram semen. Anim Repoda. Sci 62: 77-111.
22. ***Minitube. 2014.*** EquiPlus - Preservation extender medium for fresh and cooled stallion semen. Tiefenbach: Minitbe. Informe técnico. 1p.
23. ***Morrier A, Castonguay F, Bailey J. 2002***. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermartozoa. Can. J. Anim. Sci. 6: 347-356.
24. ***Morte M, Rodrigues A, Soares D, Rodrigues A, Gamboa S, Ramalho J. 2008.*** The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. Anim Reprod Sci 106: 36-47.
25. ***Orosco V, Rosemberg M, Santiani A, Rodríguez L. 2011***. Evaluación de tres dilutores para la refrigeración de semen de caballo Peruano de Paso y sus efectos sobre la motilidad espermática e integridad funcional de la membrana. Rev. Científica 8: 104-114.
26. ***Ortega C, García, B, Gallardo J, Gonzáles L, Fernández L, Rodriguez-Martinez H, Tapia J, Peña F. 2009.*** Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci 114: 393-403
27. ***Pagl R, Aurich J, Müller-Schlösser F, Kankofer M, Aurich C. 2006.*** Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. Theriogenology 66: 1115–1122.
28. ***Paredes, A. 2015.*** Determinación de la viabilidad espermática post descongelamiento, bajo efecto de la adición fraccionada de dimetilformamida en caballo criollo colombiano. Tesis de Médico Veterinario. Bogotá: Univ. De La Salle. 57 p.
29. ***Plaza J, Olivieri G, Gallelli M, Bruno S, Miragaya M. 2021.*** Efecto del agregado de EDTA al diluyente de Kenney para la refrigeración de semen asnal. InVet. 1: 88-88

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS
UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

30. ***Pugliesi G. 2012.*** Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. R. Bras. Zootec. 41: 2411-2417
31. ***Roa E, Cortés F ,Guerrero N, Cardona W, Morantes L. 2012.*** Evaluación asistida por computador de la viabilidad espermática en humanos. Rev. ing. biomed 6: 17-28.
32. ***Rousset H, Chanteloube P, Magistrini M, Palmer E. 1987.*** Assessment of fertility and semen evaluations of stallions. J Reprod Fertil Suppl 35:25-31.
33. ***Squires E, Amann R, McKinnon A, Pickett B. 1988.*** Fertility of equine espermatozoa cooled to 5 or 20 °C. Proc. Int. Cong. Anim. Reprod 11: 297-299.
34. ***Stornelli M, Arauz M, De La Sota L. 2001.*** Inseminación artificial con semen fresco, refrigerado y congelado. Aplicación y desarrollo en caninos. Analecta Veterinaria 1:58-66.
35. ***Tartaglione C, Ritta M. 2004.*** Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. Theriogenology 62: 1245-1252.
36. ***Thomas C, Garner D, Dejarnette J, Marshall C. 1998.*** Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. Biol Reprod 58: 786-793.
37. ***Vivanco M. 1998.*** Inseminación artificial en ovinos. In: Memorias del Seminario Internacional: Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos. Chapingo, Edo. de Méx 135-194.

ANEXOS

1. Resolución de aprobación de proyecto de tesis

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

TESIS

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

RESOLUCIÓN DIRECTORAL ACADÉMICA DE CARRERA N° 141-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2022

Lima, 25 de octubre del 2022

Visto el proyecto de tesis presentada por **ANA PAOLA SÁNCHEZ QUISPE,** egresada de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, se expide la presente Resolución:

CONSIDERANDO:

- ✓ Que, para optar el título profesional de Médico Veterinario Zootecnista en la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Científica del Sur, es necesario la realización y sustentación de una tesis.
- ✓ Que, el Reglamento de Tesis pertinente, dispone que el Proyecto de Tesis debe ser presentado a la Carrera de acuerdo con el perfil aprobado, el cual debe ser dictaminado por el Comité de Investigación.
- ✓ Que, **ANA PAOLA SÁNCHEZ QUISPE**, ha cumplido con presentar su proyecto de tesis titulado **"ANÁLISIS RETROSPECTIVO DEL EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN A LAS 0, 24 Y 48 HORAS SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN DE SEMENTALES DE LA LÍNEA ZANGERSHEIDE"**, bajo la Asesoría del **Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA.**
- ✓ Que la Comisión de Grados y Títulos de la Carrera ha emitido una evaluación favorable y recomienda la inscripción del proyecto citado.

Estando a lo dispuesto por el Reglamento General de la Universidad Científica del Sur, el Reglamento de Tesis de la Carrera y a las normas vigentes, en uso de las atribuciones conferidas a la Carrera,

SE RESUELVE:

1. **APROBAR** el Proyecto de Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario Zootecnista titulado: **"ANÁLISIS RETROSPECTIVO DEL EFECTO DE LA REFRIGERACIÓN A LAS 0, 24 Y 48 HORAS SOBRE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN DE SEMENTALES DE LA LÍNEA ZANGERSHEIDE".**
2. Declarar a **ANA PAOLA SÁNCHEZ QUISPE,** expedita para la realización del Proyecto de Tesis aprobado.
3. Nombrar al **Dr. ALEXEI VICENT SANTIANI ACOSTA** como Asesor del Proyecto de Tesis que se realizará.
4. Disponer la inscripción del proyecto de tesis aprobado en el Registro de Tesis para optar el Título Profesional de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la CIENTÍFICA.
5. Declarar que **ANA PAOLA SÁNCHEZ QUISPE** tiene plazo de 24 meses para presentar su tesis final desde la fecha de la emisión de la presente Resolución.

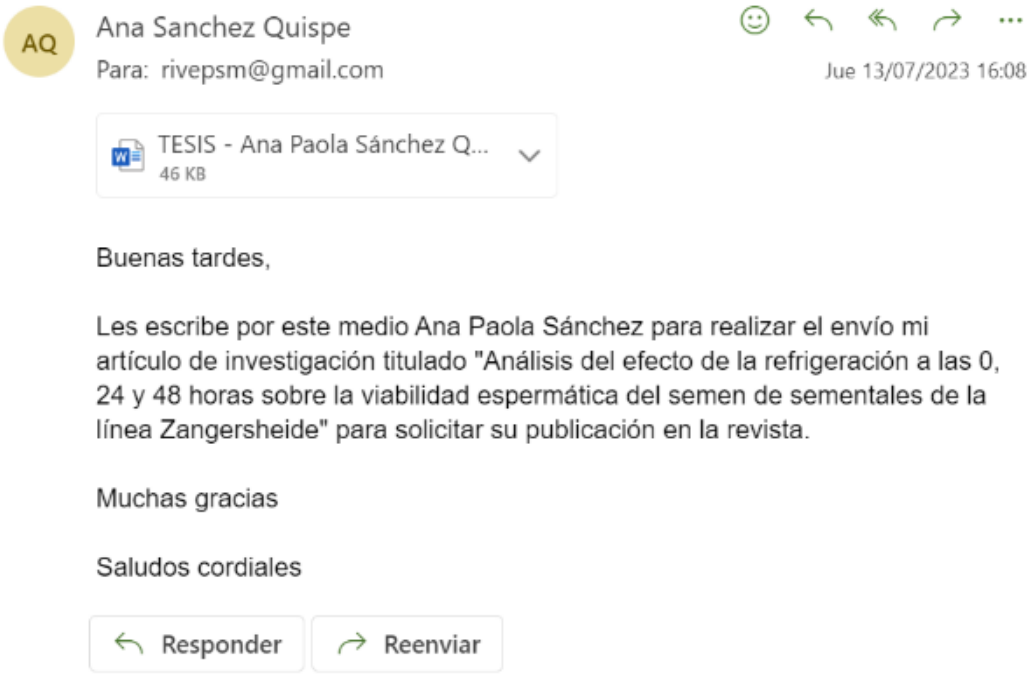
Regístrese, comuníquese y archívese.

M.V.Z. María Lourdes Velarde Marcos
Directora Académica de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

T // (511) 610 6738
informes@cientificavedu.pe
cientificavedu.pe

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis

2. Comprobación de envío a la revista



AQ

Ana Sanchez Quispe

Para: rivepsm@gmail.com

Jue 13/07/2023 16:08

TESIS - Ana Paola Sánchez Q...
46 KB

Buenas tardes,

Les escribe por este medio Ana Paola Sánchez para realizar el envío mi artículo de investigación titulado "Análisis del efecto de la refrigeración a las 0, 24 y 48 horas sobre la viabilidad espermática del semen de sementales de la línea Zangersheide" para solicitar su publicación en la revista.

Muchas gracias

Saludos cordiales

Responder Reenviar

Tesis publicada con autorización del autor
No olvide citar esta tesis