



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN
CON EL FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

EFFECTO DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LA CIRCUNFERENCIA ESCROTAL Y MORFOMETRIA ESPERMATICA EN OVINOS CRIOLLOS BAJO CONDICIONES DE ALTURA.

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
Ciencia y producción animal	Reproducción animal	

3. Duración del proyecto (meses)

ocho

4. Tipo de proyecto

Individual	<input type="radio"/>
Multidisciplinario	<input checked="" type="radio"/>
Director de tesis pregrado	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	Catacora Flores Nubia Lilia
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	983117036
Correo Electrónico	nlcatacora@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	Natalio Luque Mamani
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	951592536
Correo Electrónico	nluque@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	Rolando Daniel Rojas Espinoza
Escuela Profesional	Medicina Veterinaria y Zootecnia
Celular	976666927



- I. Título (El proyecto de tesis debe llevar un título que exprese en forma sintética su contenido, haciendo referencia en lo posible, al resultado final que se pretende lograr. Máx. palabras 25)

EFFECTO DE LA ESTACIONALIDAD SOBRE LA CIRCUNFERENCIA ESCROTAL Y MORFOMETRIA ESPERMATICA EN OVINOS CRIOLLOS BAJO CONDICIONES DE ALTURA

- II. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando -igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan)

La estacionalidad afecta la circunferencia escrotal y parámetros espermáticos del semen de carneros ya que el proceso de congelación- descongelación, causa un daño parcial irreversible de los espermatozoides. El objetivo será evaluar la circunferencia escrotal y morfometría espermática del semen del ovinos criollo. Se utilizarán dos machos reproductores de raza criolla y el diluyente triladyl. Se recogerán eyaculados una vez al mes durante tres meses de estación reproductiva (mayo, junio, julio) y tres meses en estación no reproductiva (setiembre, octubre, noviembre), posteriormente se diluirá se congelarán las muestras de semen y se evaluará la morfometría espermática al descongelado de la muestra. Además, se registrará las medidas de la circunferencia escrotal durante los meses arriba descritos. La finalidad de estudio será conocer si la estacionalidad influye sobre los parámetros reproductivos de ovino criollo y su impacto en la reproducción.

- III. Palabras claves (Keywords) (Colocadas en orden de importancia. Máx. palabras: cinco)

carnero, CASA, estacionalidad, parámetros reproductivos

- IV. Justificación del proyecto (Describa el problema y su relevancia como objeto de investigación. Es importante una clara definición y delimitación del problema que abordará la investigación, ya que temas cuya definición es difusa o amplísima son difíciles de evaluar y desarrollar)



La disponibilidad de métodos eficaces de criopreservación para los animales domésticos ha beneficiado a las industrias de vacuno y lechero desde hace más de medio siglo. Sin embargo, el éxito en la criopreservación de espermatozoides de toro no se ha trasladado a otras especies de animales de granja, como el carnero (Salamon & Maxwell, 2000). Así, los programas de inseminación artificial con espermatozoides criopreservados del carnero no satisfacen la demanda de la industria ovina (Trounson, 1998), como consecuencia de la criopreservación del semen del carnero, se produce un daño parcial irreversible de los espermatozoides (Purdy et al., 2016), debido a la escasa capacidad de los espermatozoides de carnero para resistir el proceso de congelación-descongelación (Salamon & Maxwell, 1995) y por tanto, el bajo rendimiento derivado de su uso, son responsables de la escasa difusión de esta técnica (Ramón et al., 2013).

En el carnero, los espermatozoides son sensibles a los cambios extremos de temperatura durante el proceso de congelación-descongelación, este daño depende del efecto combinado de varios factores, incluida la temperatura de congelación (Ashrafi et al., 2012), y sufren diversas tensiones (Anel et al., 2006) y daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales (Maxwell et al., 1993), afectando negativamente a la calidad del espermatozoide congelado. En concreto, la congelación induce un estrés osmótico, una alta producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), daños en el ADN del espermatozoide, desestabilización de la membrana espermática y disfunción de mitocondrias de los espermatozoides (Peña et al., 2004).

Tras la ruptura de la estabilización de la célula, se desarrolla un daño por choque de frío en la célula que se denomina criolesión (Holt, 2000), durante la congelación-descongelación y es causada por factores como el choque térmico, la formación de hielo (De Leeuw et al., 1993), la deshidratación, incrementos en la concentración de sales y el choque osmótico (Woelders et al., 1997), pero se ha sugerido que la formación de hielo intracelular en el espermatozoide es uno de los principales factores perjudiciales que reducen la viabilidad y la integridad de la membrana de los espermatozoides congelados-descongelados, y es que la sensibilidad de la membrana del espermatozoide de carnero, las propiedades termodinámicas, propiedades de estructurales y los fosfolípidos insaturados convertidos en membranas de la fase líquida a la fase de gel, lo que no favorece a los protocolos de congelación. Como consecuencia, por lo general, no más del 50% de los espermatozoides sobreviven a la criopreservación, lo que proporciona bajas tasas de fertilidad (Watson, 2000).

Por lo tanto en este estudio realizamos la siguiente interrogante de investigación: ¿Es posible que la estacionalidad afecte parámetros reproductivos como la circunferencia escrotal y morfometría espermática del ovino criollo bajo condiciones de altura?

- V. Antecedentes del proyecto** (Incluya el estado actual del conocimiento en el ámbito nacional e internacional. La revisión bibliográfica debe incluir en lo posible artículos científicos actuales, para evidenciar el conocimiento existente y el aporte de la Tesis propuesta. Esto es importante para el futuro artículo que resultará como producto de este trabajo)

La criopreservación celular se ha convertido en una herramienta indispensable en biología. Los materiales biológicos pueden conservarse y utilizarse con seguridad (Ramón et al., 2013), proporcionando un método rentable y eficaz



para preservar el material genético durante décadas (Benson et al., 2012). La conservación y el almacenamiento a largo plazo del semen es un tema de interés permanente debido al uso extensivo de la inseminación artificial (IA) y la influencia de cuestiones como la distancia entre los lugares de recogida e inseminación, la transmisión de enfermedades y la posibilidad de cubrir un gran número de hembras en un corto periodo de tiempo (Ollero et al., 1998). La aplicación generalizada de la IA depende en gran medida de la utilización de semen congelado y, por tanto, de la disponibilidad de técnicas que den lugar a una fertilidad aceptable en un programa de control de la reproducción selectiva, esto podría lograrse con métodos que redujeran o detuvieran el metabolismo de los espermatozoides y prolongar así su vida fértil. En consecuencia, el almacenamiento del semen en estado líquido no congelado, utilizando temperaturas reducidas u otros medios para deprimir el metabolismo de los espermatozoides (semen refrigerado) y en un estado de congelación que implica la conservación a temperaturas bajo cero (semen congelado) (Salamon & Maxwell, 2000).

Varios diluyentes como el TRIS, Andromed®, BioXcell®, Triladyl®, Ovipro® y la leche desnatada se han utilizado ampliamente para la congelación de espermatozoides de carnero. Los espermatozoides de carnero en pajuelas toleran un rango de congelación, por lo que la suspensión en vapor de nitrógeno líquido (NL) entre -75 y -125 °C no afecta a la supervivencia de los espermatozoides (Salamon & Maxwell, 2000). La lecitina de soya puede sustituir con éxito a la yema de huevo como suplemento para el medio de criopreservación, sin efectos adversos sobre la movilidad, la integridad de la membrana y la viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación, la concentración óptima de lecitina en el diluyente de semen es del 1,5% para la criopreservación del semen (Salmani et al., 2014). Los extensores complementados con un 20% de yema de huevo o un 2,0% de lecitina de soya aumentan significativamente la actividad de superoxidodismutasa y disminuyen las actividades de especies reactivas de oxígeno (ROS) y malondilaldehído (MDA) y tienen efectos similares en la preservación de los espermatozoides. Por lo tanto, un diluyente a base de lecitina de soya puede utilizarse como diluyente alternativo a la yema de huevo para la criopreservación del semen (Sun et al., 2020). La adición de yema de huevo al diluyente inicial tuvo un efecto beneficioso sobre el porcentaje de espermatozoides móviles especialmente tras el enfriamiento rápido del semen a 10 y 5°C y mejoró sustancialmente la supervivencia posterior de los espermatozoides tras la congelación y descongelación (Fiser & Fairfull, 1986). Así, la yema de huevo de codorniz, gallina criolla y de granja en la criopreservación de espermatozoides de carneros optimizan la funcionalidad plasmática, incluso la motilidad espermática a la post-descongelación (Perez, 2020).

Para aumentar el nivel productivo y, por lo tanto, la eficiencia de los sistemas de producción ovina, se debe introducir animales probados en su comportamiento individual o progenie, la ovinocultura nacional requiere herramientas como la inseminación artificial por laparoscopia, para poder establecer programas de mejoramiento genético eficientes. La inseminación artificial (IA) en ovinos se inició a principios del siglo XX en Rusia con semen fresco el cual era depositado en el fondo de la vaginal, obteniendo muy bajas tasas de fertilidad (5-30 %). Al perfeccionarse la técnica surge la inseminación cervical o pericervical con semen fresco o refrigerado, la cual observa resultados que van del 10 al 60 %, debido a la diversidad morfológica en la anatomía del cérvix en esta especie. Para dar solución a dicha situación se ha desarrollado la técnica de inseminación laparoscópica la cual permite un mejor acceso al útero de los ovinos, así como la valoración de la cavidad abdominal y por lo tanto la optimización del semen; los resultados reportados por dicha técnica indican tasas de fertilidad hasta del 80 %



(Buckrell, 2000). La inseminación artificial a tiempo fijo post sincronización de celo, con semen refrigerado ovino durante 12 h y una dosis de inseminación de 300 millones de espermatozoides, permite obtener una preñez aceptable (38%) considerando el beneficio de poder transportar semen a largas distancias y su bajo costo operativo (Naim et al., 2009). Así mismo luego de un periodo de refrigeración de dos horas, la raza del carnero no influye ni determina, en relación a las características seminales como motilidad individual progresiva e integridad de membrana (Castro Bedriñana et al., 2017), de ahí la importancia de poder refrigerar el semen del carnero.

No obstante, sus resultados en el Perú, hasta ahora tienden a ser insatisfactorios en ovinos, debido a la baja tasa de fertilidad, este hecho podría deberse a los daños ocasionados en los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, principalmente en la membrana plasmática y acrosomal del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables acortando su tiempo de vida en el tracto reproductivo de la hembra; por lo tanto, tendría una menor oportunidad de poder fecundar el ovocito (Sandoval, R. 2005). Dado que el semen de carnero tiene unas tasas muy bajas de criotolerancia/criosupervivencia, se presta como modelo experimental ideal para estudiar diversos aspectos de la congelación del semen. Resultando necesario, mejorar los protocolos de criopreservación del semen de carnero, utilizando diluyentes que contengan yema de huevo, azúcares y glicerol y permitan obtener una adecuada calidad del esperma de carnero durante la criopreservación, con una técnica de congelación manual que dé lugar a una fertilidad aceptable, para aplicarlos en los programas de cría.

VI. Hipótesis del trabajo (Es el aporte proyectado de la investigación en la solución del problema)

La estacionalidad no afecta parámetros reproductivos como la circunferencia escrotal y morfometría espermática del ovino criollo bajo condiciones de altura

VII. Objetivo general

Evaluar la circunferencia escrotal y morfometría espermática del ovino criollo bajo condiciones de altura.

VIII. Objetivos específicos

Evaluar la circunferencia escrotal del ovino criollo en estación reproductiva y no reproductiva.
- Evaluar la morfometría espermática del ovino criollo en estación reproductiva y no reproductiva.

IX. Metodología de investigación (Describir el(los) método(s) científico(s) que se empleará(n) para alcanzar los objetivos específicos, en forma coherente a la hipótesis de la investigación. Sustentar, con base bibliográfica, la pertinencia del(los) método(s) en términos de la representatividad de la muestra y de los resultados que se esperan alcanzar. Incluir los análisis estadísticos a utilizar)



Población y tamaño de muestra.

Población.

La población estará conformada por los carneros del plantel, los cuales están destinados a la campaña de inseminación artificial del Centro experimental Chuquibambilla.

Muestra

Se realizará el muestreo no probabilístico por conveniencia, que es una técnica de **muestreo no probabilístico** y no aleatorio, debido a la poca cantidad de carneros destinados a la campaña de inseminación artificial y tomando como referencia trabajos de investigación similares, por lo que se utilizarán dos carneros de la raza criolla con edades de 4 a 6 años, sexualmente activos y con buen estado de salud.

Descripción detallada de los métodos, uso de materiales, equipos o insumos.

a) Diseño de muestreo

De los animales

Se utilizarán dos carneros sexualmente maduros (3 a 6 años), dos de raza criolla, de acuerdo a los trabajos de investigación similares, que se realizaron en otros lugares. Los carneros serán alimentados con heno de buena calidad y agua ad libitum.

b) Descripción detallada del uso de materiales, equipos, insumos, entre otros.

- Para la evaluación de la morfometría espermática

1. Se recogerán eyaculados de los cuatro carneros una vez por mes en estación reproductiva (mayo, junio, julio) mediante una vagina artificial a una temperatura de 40 a 43°C.
2. Se realizará la evaluación macroscópica del semen colectado, determinando volumen utilizando las marcas de graduación del tubo de recogida.
3. La evaluación microscópica de la motilidad masal se realizará a través de un microscopio portátil, previo calentamiento a 38 °C y a 40X; la puntuación será en la escala de 0-5.
4. La evaluación de la concentración de espermatozoides se evaluará mediante el método del hemocitómetro y la vitalidad mediante la tinción eosina – nigrosina.
5. La selección de las muestras para llevar a cabo el proceso de dilución para la congelación-descongelación, será con aquellas que tengan un volumen de 1 a 2 ml, con una motilidad progresiva hacia adelante superior al 80% y concentraciones mayores a $2,5 \times 10^9$ espermatozoides/ml
6. Después de la evaluación y selección de las muestras se realizará la dilución 1:1 a 37°C, mediante dos réplicas, utilizando el diluyente Triladyl,
7. Para el diluyente comercial se preparará añadiendo 1 vol de Triladyl® (Minitub, Tiefenbach, Alemania); que consiste en agua bidestilada, glicerol, tris, ácido cítrico, fructosa, con antibióticos (espectinomicina, lincomicina, tilosina, gentamicina) a 3 vol de agua desionizada y 1 volumen de yema de huevo el día de la recogida del semen a temperatura ambiente.
8. Una vez diluido se almacenará a 5 °C.
9. Las muestras diluidas, se llevarán inmediatamente al laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Estación experimental IVITA-Maranganí, a temperatura ambiente, para la evaluación de la morfometría espermática mediante el sistema CASA.
10. Posterior a la evaluación se completará la dilución para obtener una dosis de 400×10^6 espermatozoides/ml (Murawski et al., 2015), las muestras diluidas se aspirarán en pajillas de 0.25 ml y se sellarán con alcohol



polivinílico en polvo.

11. Las muestras se procesarán mediante el siguiente protocolo de congelación: Las pajillas se transferirán al refrigerador y se mantendrán a 5°C durante 3 horas, luego se congelarán en vapor de nitrógeno líquido, a 4 cm por encima del nitrógeno líquido, durante 15 minutos y se sumergirán en nitrógeno líquido (Bucak et al., 2007).

Descongelación del semen y evaluación de la morfometría espermática

Las pajillas se descongelarán individualmente a 37°C durante 20 s en un baño maría, para evaluarla la morfometría espermática mediante el sistema CASA después de la congelación.

Para la evaluación de la circunferencia escrotal

- Se medirá la circunferencia escrotal con una vincha antes de cada colecta de semen

Análisis estadístico

La circunferencia escrotal y morfometría espermática se analizarán mediante el paquete SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Los análisis estadísticos se realizarán con pruebas paramétricas y no paramétricas.

X. Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- Anel, L., Alvarez, M., Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Anel, E., & De Paz, P. (2006). Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(SUPPL. 2), 30–42. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00767.x>
- Apaza, L. S. (2017). Efecto protector de yema de huevo en la viabilidad de semen congelado de carnero. *Universidad Nacional Del Altiplano*, 140. <http://repositorio.unap.edu.pe/handle/UNAP/4216>
- Ashrafi, I., Kohram, H., Naijan, H., Bahreini, M., & Mirzakhani, H. (2012). Retraction: Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Research Notes*, 5(December), 4–9. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-319>
- Barroso, G., Morshedi, M., & Oehninger, S. (2000). Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15(6), 1338–1344. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.6.1338>
- Benson, J. D., Woods, E. J., Walters, E. M., & Critser, J. K. (2012). The cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*, 78(8), 1682–1699. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.06.007>
- Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışli, Ö., Yüce, A., Tekin, N., & Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060–1067. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.12.004>
- Bucrkell, B. (2000). *Reproductive technologies*.
- Cabrera V., P., Ayulo L., A., & Pantoja A., C. (2011). Efecto Del Dilutor Tris Y Citrato Con Yema De Huevo De Cordorniz Sobre La Viabilidad Espermática En



- Semen Ovino Congelado En Pajillas. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 22(2), 105–113. <https://doi.org/10.15381/rivep.v22i2.276>
- Cabrera V., P., & Pantoja A., C. (2012). 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*, 19(2), 152–159. <https://doi.org/10.15381/rivep.v19i2.1162>
- Castillo Cevallos, L. A., Páucar Espinoza, E., & Alvarado Malca, E. (2020). Adición de metil- β -ciclodextrina cargada de colesterol en la criopreservación de semen de carnero. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 30(4), 1637–1644. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17160>
- Castro Bedriñana, J. I., Chirinos Peinado, D. M., & Chirinos Orellana, J. A. (2017). Calidad del Semen Refrigerado de Carneros Assaf y Blackbelly. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 28(3), 764. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i3.12581>
- De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. In *Cryobiology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 32–44). <https://doi.org/10.1006/cryo.1993.1005>
- de Paz, P., Estesó, M. C., Alvarez, M., Mata, M., Chamorro, C. A., & Anel, L. (2010). Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology*, 74(4), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.022>
- Evans G, M. W. (1987). *Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19890169622>
- Fiser, P. S., & Fairfull, R. W. (1986). The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology*, 23(6), 518–524. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(86\)90061-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(86)90061-1)
- Fiser, P. S., & Fairfull, R. W. (1989). The effect of glycerol-related osmotic changes on post-thaw motility and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 26(1), 64–69. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(89\)90033-3](https://doi.org/10.1016/0011-2240(89)90033-3)
- Garde, J. J., Soler, A. J., Fernández-santos, M. R., Sánchez-sánchez, R., Carrascosa, C., Cruz, P. De, & Gómez-fidalgo, E. (2019). *Bioteχνologías de la reproducción aplicadas a especies de interés veterinario*.
- Guerrero V., H., Huanca L., W., Raymundo T., F., Huerta O., S., & Ramos D., D. (2012). Uso De Dilutores Hipertónicos En La Criopreservación De Semen Ovino. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 20(1), 41–46. <https://doi.org/10.15381/rivep.v20i1.529>
- Hafez, E. S. E. (1996). *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales* (Tercera Ed).
- Halliwell, B., & Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance | The American Journal of Clinical Nutrition | Oxford Academic. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715–725.
- HAMMERSTEDT, R. H., GRAHAM, J. K., & NOLAN, J. P. (1990). Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *Journal of Andrology*, 11(1), 73–88. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1990.tb01583.x>
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., & Zamiri, M. J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, 96(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.11.010>
- Jerez-Ebensperger, R. A., Luño, V., Olaciregui, M., González, N., de Blas, I., & Gil, L. (2015). Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey



- supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *Small Ruminant Research*, 130, 153–156. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.07.010>
- Jha, P. K., Shahi Alam, M. G., Mansur, A. AL, Naher, N., Islam, T., Uddin Bhuiyan, M., & Bari, F. Y. (2019). Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. *Cryobiology*, 89(June), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.06.001>
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., & Garde, J. J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 167, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
- Marcondes, M; Silva- Santos, K; Marinho, L. (2016). *Biotechnology of Animal Reproduction*.
- Masoudi, R., Sharafi, M., Zareh Shahneh, A., Towhidi, A., Kohram, H., Esmaeili, V., Shahverdi, A., & Davachi, N. D. (2016). Fertility and flow cytometry study of frozen-thawed sperm in cryopreservation medium supplemented with soybean lecithin. *Cryobiology*, 73(1), 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.010>
- Maxwell, W. M. C., Evans, G., Rhodes, S. L., Hillard, M. A., & Bindon, B. M. (1993). Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(1), 57–63. <https://doi.org/10.1071/RD9930057>
- Melendez Pino, N. C. (2019). *Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión Facultad De Ingeniería*. 92. http://repositorio.undac.edu.pe/bitstream/undac/629/1/T026_71393625_T.pdf
- Minitube. (2020). Manual Triladyl® Verdünner für Bullensamen Culture Medium for Bull Semen Diluyente de Semen Bovino. *Minitub Manual*, 49(0), 0–3.
- Miranda, F. F. (2019). *Bases fisiológicas de la reproducción*.
- Murawski, M., Schwarz, T., Grygier, J., Patkowski, K., Oszczyda, Z., Jelkin, I., Kosiek, A., Gruszecki, T. M., Szymanowska, A., Skrzypek, T., Zieba, D. A., & Bartlewski, P. M. (2015). The utility of nanowater for ram semen cryopreservation. *Experimental Biology and Medicine*, 240(5), 611–617. <https://doi.org/10.1177/1535370214557219>
- Naim, P., Cueto, M., & Gibbons, A. (2009). Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. *Archivos de Zootecnia*, 58(223), 435–440. <https://doi.org/10.21071/az.v58i223.5184>
- Ollero, M., Perez-Pe, R., Muiño-Blanco, T., & Cebrian-Perez, J. A. (1998). Improvement of Ram Sperm Cryopreservation Protocols Assessed by Sperm Quality Parameters and Heterogeneity Analysis. *Cryobiology*, 37(1), 1–12. <https://doi.org/10.1006/cryo.1998.2092>
- Parkinson, T. J., & Morrell, J. M. (2009). Artificial Insemination. In *Veterinary Reproduction and Obstetrics* (Tenth Edit). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-7233-8.00043-4>
- Peña, F. J., Johannisson, A., Wallgren, M., & Rodriguez Martinez, H. (2004). Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: Changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*, 12(2), 117–124. <https://doi.org/10.1017/S096719940400262X>
- Perez, Guido; Apaza, Liz; Rojas, Rolando; Ramirez, Raul; Alencastre, Rolando; Arizabal, J. P. U. (2020). EFECTO CRIOPROTECTOR DE LA YEMA DE HUEVO DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE CARNEROS EN CONDICIONES DEL ALTIPLANO PERUANO. *Spermova*.
- Purdy, P. H., Barbosa, E. A., Praamsma, C. J., & Schisler, G. J. (2016). Modification of trout sperm membranes associated with activation and cryopreservation. Implications for fertilizing potential. *Cryobiology*, 73(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.05.008>



Ramón, M., Pérez-Guzmán, M. D., Jiménez-Rabadán, P., Estesó, M. C., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Anel-López, L., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., & Garde, J. J. (2013). Sperm Cell Population Dynamics in Ram Semen during the Cryopreservation Process. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059189>

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01327-I](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01327-I)

Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77-111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)

Salmani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M., & Sharafi, M. (2014). In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen. *Cryobiology*, 68(2), 276-280. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.008>

Sun, L., Fan, W., Wu, C., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D. (2020). Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation. *Cryobiology*, 92(August 2019), 146-150. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.12.004>

Trounson, A. O. (1998). Reproduction, fertility and development. *Reproduction, Fertility and Development*, 10(7-8), 515.

XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

Al conocer el efecto de la estacionalidad en reproductores machos de ovinos criollos, se podrán plantear biotecnologías reproductivas en diferentes estaciones reproductivas

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Conocimiento de la fisiología reproductiva del ovino criollo en nuestra área geográfica en condiciones de altura.

ii. Impactos económicos

Mayor obtención de número de crías al aplicarse biotecnologías reproductivas con el uso de machos probados y sin efecto estacional

iii. Impactos sociales

Mejor conocimiento del desempeño reproductivo del ovino criollo.

iv. Impactos ambientales



Implementación de sincronización de celo utilizando el efecto macho en cualquier época del año, sin el uso de hormonas.

XIII. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)

- Equipo de colecta de semen
- Tubos falcon
- Camara de neubauer
- Dilutor triladyl
- Equipo CASA
- Vincha
- Pajillas
- Nitrógeno líquido

XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El trabajo de muestreo en campo se realizará en el Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla, perteneciente a la Universidad Nacional del Altiplano, dirigida por la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar, región de Puno a 156km de la ciudad de Puno, geográficamente se encuentra sobre las coordenadas 13°47'37", latitud sur y 70°47'50", longitud oeste a 3974 m.s.n.m. Se caracteriza por presentar un clima frio templado, la zona presenta una temperatura máxima de 20.4°C en el mes de diciembre y una temperatura mínima de -18.4°C en el mes de junio, con un promedio anual de 8°C, la humedad relativa promedio anual es de 53% (máxima 81%, mínima 18%); presentando una precipitación pluvial anual promedio de 659mm (SENAMHI, 2016).
El trabajo de análisis en laboratorio se realizará en la estación experimental IVITA-Maranganí perteneciente a la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

XV. Cronograma de actividades

Actividad	Trimestres											
	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Planificación del proyecto	X											
Selección de animales		X										
Suplementación de los animales			X									
Muestreo y entrenamiento				X								
Colecta de semen					X	X	X	X	X	X	X	
Evaluación de circunferencia escrotal					X	X	X	X	X	X	X	
Evaluación de morfometría espermática					X	X	X	X	X	X	X	
Redacción de artículo											X	X

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
Vagina artificial	Unidad	500	2	S/. 1000.00
Fundas de látex	Unidad	80	4	S/. 320.00
Vaso colector	Unidad	60	4	S/. 240.00



de vidrio				
Tubos falcón	Bolsa	500	1	S/. 500.00
Pajillas de 0.5 ml	Unidad	1.00	100	S/. 100.00
Alcohol polivinílico	grs	150.0	200	S/. 150.00
Microscopio portátil	Unidad	500.0	1	S/. 500.00
Agua bidestilada	Frasco	25	5	S/. 125.00
Nitrógeno líquido	Kg.	25.00	8	S/. 200.00
Papel toalla	Unidad	10.00	8	S/. 80.00
Laminas portaobjeto y cubreobjeto	Caja	10.00	4	S/. 40.00
Papel aluminio	Rollo	10.00	4	S/. 40.00
Agitador magnético	Unidad	500	1	S/. 500.00
				S/. 3795.00