

EFFECTO CRIOPROTECTOR DE LA YEMA DE HUEVO DE DIFERENTES ESPECIES SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE CARNEROS EN CONDICIONES DEL ALTIPLANO PERUANO

Cryoprotective effect of the egg yolk of different species on the sperm quality of rams under conditions of the Peruvian Altiplano

Manuel Perez Durand*¹; Liz Apaza Ramos¹; Rolando Rojas Espinoza²; Rolando Alencastre Delgado²; Raul Ramirez Mestas³; Julio Arizabal Guzman⁴; Uri Perez Guerra⁵

¹ Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.

² Centro Investigación y Producción de Chuquibambilla, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.

³ Universidad Nacional de Juliaca Puno-Perú, Corporación Ganadera Ramirez SAC.

⁴ Departamento de Bioseguridad del Cuartel General de III División del Ejército.

⁵ Laboratorio de Anatomía Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional del Altiplano, Puno-Perú.

* Corresponding author: Manuel Perez Durand
E-mail: guidpe@yahoo.es

Recibido: 03/07/2020

Aceptado 09/08/2020

Publicado: 21/08/2020

ABSTRACT

The objective was to evaluate the cryoprotective effect of the egg yolk of different domestic birds on sperm quality of rams in conditions of the Peruvian Altiplano. The semen was collected by using an artificial vagina from 6 Corriedale rams and 63 sheep were used for insemination. The semen volume was conserved with Tris diluent+15% egg yolk according to treatment [quail (TI), creole hen (TII), farm hen (TIII) and pigeon (IV)] csp 100 mL, the collection was diluted 1:1 with fraction A (Tris+yolk) and cooled to 5°C where fraction B (Tris+yolk+glycerol) was added; adjusting the sperm concentration to 300x10⁶ (0.25 mL straw), subjecting to equilibrium for 1.5 h (5°C), then frozen at a rate of -20°C/min until reaching -120°C and stored; cervical artificial insemination was performed in 25 ewes in heat and 38 to synchronized heat. The semen evaluation was carried out at the collection, equilibration and thawing phase, determining total motility (MT), progressive motility (MP), membrane functionality (Host), and membrane integrity (VIT). The thawing results were for treatments I, II, III and IV the percentages of MT of 54.30, 51.86, 57.87 and 44.21 (p> 0.05); MP of 50.03, 51.36, 50.72 and 45.98 (p> 0.05); Host of 59.44, 55.86, 60.50 and 49.3 (p <0.05); VIT 56.08, 57.19, 56.04 and 46.66 (p> 0.05) respectively. The gestation was evaluated at 45 days post insemination resulting in 48% (12/25) and 21.05% (8/38) for natural and synchronized heat respectively (p=0.0245). In conclusion the membrane functionality was greater with quail, creole hen farm egg yolks; as well as a higher gestation rate in sheep inseminated in natural heat.

Keywords: Criopreservation, egg yolk, semen, ram.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto crioprotector de la yema de huevo de diferentes aves domésticas sobre la calidad espermática de carneros en condiciones del Altiplano Peruano. El semen fue colectado mediante la utilización de una vagina artificial de 6 carneros de la raza Corriedale y para la inseminación se utilizaron 63 ovejas. El volumen de semen fue conservado con diluyente Tris+15% yema de huevo según tratamiento [codorniz (TI), gallina criolla (TII), gallina de granja (TIII) y paloma (IV)] csp 100 mL, a la colección fue diluido 1:1 con la fracción A (Tris+yema) y se enfrió hasta 5°C donde se adicionó la fracción B (Tris+yema+glicerol); ajustando la concentración a 300x10⁶ de espermatozoides(pajilla de 0.25 mL) sometiendo a equilibrio por 1.5 h (5°C) seguidamente se congelo a una tasa de -20°C/min hasta alcanzar -120°C y almacenados; la inseminación artificial cervical se realizó en 25 ovejas a celo natural y 38 a celo sincronizado. La evaluación de semen se realizó a la colección, fase de equilibrio y descongelación determinando la motilidad total (MT), motilidad progresiva (MP), funcionalidad de membrana (Host) y la integridad de membrana (VIT). Los resultados a la descongelación fueron para los tratamientos I, II, III y IV, los porcentajes de MT de 54.30, 51.86, 57.87 y 44.21 (p>0.05); MP de 50.03, 51.36, 50.72 y 45.98 (p>0.05); Host de 59.44, 55.86, 60.5 y 49.30 (p<0.05); VIT 56.08, 57.19, 56.04 y 46.66 (p>0.05) respectivamente. La gestación fue evaluada a 45 días post inseminación resultando 48% (12/25) y 21.05% (8/38) para celo natural y sincronizado, respectivamente (p=0.0245). En conclusión, la funcionalidad espermática fue mayor con las yemas de huevo de codorniz, gallina criolla y de granja; como también mayor tasa de gestación en ovejas inseminadas a celo natural.

Palabras clave: Criopreservación, carnero, semen, yema de huevo

INTRODUCCION

La población de ovinos en el Perú es de 9 341 721 de cabezas distribuidos en diferentes cantidades de razas como: Corriedale, Junín, Merino y otras razas (Assaf, Hampshire, Merino Donhe, Friesian, etc) y principalmente el ovino Criollo, siendo uno de los animales de granja importantes que proporciona lana, carne y pieles en medianos y pequeños productores. El departamento de Puno posee el 30% de la población total de ovinos que está en manos de 660 964 productores pequeños (MINAGRI, 2018). En la última década asociaciones de productores, gobiernos centrales y/o regionales y criadores particulares han importado reproductores con la finalidad de continuar el mejoramiento genético en esta especie implementado la inseminación artificial con semen fresco/diluido de carneros nacionales e importados y ovejas sincronizadas.

Los programas de inseminación artificial (IA) a gran escala requieren de la preservación de espermatozoides durante largos periodos de tiempo. El semen criopreservado es usado comúnmente en la inseminación de establos y rebaños, sin embargo, los resultados de la inseminación con semen congelado en ovinos son relativamente menores. La técnica de criopreservación para el almacenaje del semen de carneros tiene muchas ventajas, pero el proceso de congelación/descongelación induce ciertos efectos dañinos en términos de la estructura celular del espermatozoide, daño bioquímico y funcional resultando en una reducción de la motilidad espermática, integridad de la membrana plasmática, acrosoma y fecundación del espermatozoide (Cabrera et al., 2011; Salamon & Maxwell, 1995, 2000).

La conservación a largo plazo de semen sin sustancias crioprotectoras se ven afectados por las proteínas del plasma seminal (BSP) que son perjudiciales para los espermatozoides ya que eliminan los lípidos y colesterol del interior de la membrana plasmática del espermatozoide y afecta su viabilidad posterior (Bergeron y Manjunath, 2006). Sin embargo, la yema de huevo (YH) y la caseína de la leche secuestran a estas proteínas del plasma seminal previniendo o minimizando la pérdida de los lípidos de la membrana que protegen a los espermatozoides durante la conservación (Manjunath, 2012); la yema de huevo dentro su composición posee fosfolípidos, colesterol y principalmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) que proveen protección específica a los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, aunque todavía el mecanismo exacto de protección no es conocido (Kulaksız et al., 2010; Pini et al., 2018).

Existen numerosos reportes de criopreservación de semen de diferentes especies, que utilizan yema de huevo de diferentes especies de aves con la finalidad de encontrar la mejor protección del espermatozoide durante el proceso de congelación/descongelación, en el toro (Su et al., 2008), búfalo (Akhter et al., 2017), carnero (Kulaksız et al., 2010), caprino (Swelum et al., 2018; Tabarez et al., 2017), cerdo (Bathgate et al., 2006), con distintos protocolos, ambientes, altitudes y demás factores que son necesarios ser estandarizados en ambientes con altitudes mayores a los 3500 msnm. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto crioprotector de la yema de huevo de diferentes especies de aves domésticas sobre la calidad espermática y la

tasa de gestación en ovejas post inseminación artificial cervical en el Altiplano Peruano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Centro de Investigación y Producción (CIP) Chuquibambilla y Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno-Perú, ubicado a una altitud de 3974 msnm, presenta un clima templado – frío la mayor parte del año, el trabajo fue realizado durante la época natural de ovinos (abril a julio).

Animales

Se seleccionaron 6 carneros reproductores de raza Corriedale en edad adulta con fertilidad conocida (con crías nacidas en campañas anteriores de inseminación artificial (IA) con semen fresco. Para la IA se seleccionaron 63 ovejas de raza Corriedale en edad adulta (entre 4 a 5 años) con fertilidad conocida (con una cría en la última campaña) divididas según tipo de celo: natural 25 ovejas y sincronizada 38 ovejas, todas con una condición corporal promedio de 2.78 (de una escala de 1: muy flaca a 5: muy gorda) con alimentación en pastos naturales y cultivados con acceso libre al agua.

Colección de semen y preparación del diluyente

La colección de semen fue mediante vagina artificial atemperada a 42°C colectando en 5 ocasiones por reproductor. La preparación del diluyente fue en base a Tris 3.634 g, ácido cítrico 1.99 g, glucosa 0.5 g, yema de huevo 1.5 mL, glicerol 5 mL, agua bidestilada csp 100 mL y 50 ug de gentamicina/mL (Cueto et al., 2016; Evans and Maxwell, 1990) con algunas modificaciones. Al buffer Tris preparado se adicionó 15 mL de yema de huevo de acuerdo con el tratamiento (TI: codorniz, TII: gallina criolla, TIII: gallina de granja y TIV: paloma), esta mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 10 min, el sedimento fue eliminado seguidamente el sobrenadante fue filtrado (papel filtro N°2 Whatman®) y finalmente se adicionó el glicerol en la proporción del 5%.

Criopreservación y evaluación del semen

Para la criopreservación de semen; el volumen de semen colectado fue diluido con la fracción A (tris, ácido cítrico, glucosa y yema de huevo) a una proporción de 1:1 posteriormente se enfrió la mezcla hasta los 5°C (dentro un refrigerador) por un lapso de 2.5 h, momento en que se completó la dilución con la fracción B (tris, ácido cítrico, glucosa, yema de huevo y glicerol a una proporción final del 5%), previamente se ajustó la concentración de los espermatozoides en la pajilla de 0.25 mL a 300 x 10⁶; seguidamente se procedió con la fase de equilibrio (mantener las pajillas a 5°C por una 1.5 h). Para el proceso de criopreservación las pajillas fueron sometidas a una tasa de congelación de -20°C/min hasta llegar a la temperatura -120°C seguidamente las pajillas se introdujeron dentro el nitrógeno líquido y finalmente se almacenaron en tanques de nitrógeno líquido hasta su uso (Pérez et al., 2011; Perez et al., 2011).

La evaluación de semen se realizó en el momento de la colección, fase de equilibrio y descongelación tomando en cuenta los parámetros de motilidad total (MT) y motilidad progresiva (MP) diluyendo el eyaculado 1:1 (semen: fracción A), de esta mezcla se colocó 20 uL sobre un portaobjetos con

cubreobjetos (atemperado a 37°C); test hiposmótico (Host: funcionalidad de membrana) se utilizó una solución hiposmótica (citrato de sodio dihidratado 0.735 g y fructosa 1.351 g csp 100 mL) realizando un dilución de la muestra 1:10 (semen: solución hiposmótica) e incubando por 30 min, la muestra se armó en forma similar a MT y MP; la vitalidad (integridad de membrana) se evaluó con el colorante eosina-nigrosina (1g de eosina, 5g de nigrosina csp 100 mL), colocando 10 uL de semen y 20 uL del colorante sobre un portaobjeto atemperado a 37°C, mezclando y finalmente se realizó un frotis. Para determinar todos los parámetros anteriores se evaluaron 200 células a 400X en un microscopio de contraste de fases Leica ICC50® (Cueto, 2009; Santiani et al., 2004).

Inseminación artificial

Para la inseminación artificial cervical; previamente se realizó la descongelación de la pajilla a 37°C por 45 s, la inseminación artificial se realizó elevando el tren posterior de la borrega por un asistente, antes de colocar el vaginoscopio se higienizó la vulva y una vez ubicada la entrada del cérvix se colocó el aplicador de IA para ovinos (Mintube®), que contenía a la pajilla. La IA en borregas con celo natural fue a 12h posteriores a la presentación de celo (detectadas con machos vasectomizados) y ovejas con celo sincronizado 52 a 56h posterior a la extracción de la esponja, protocolo recomendado (Menchaca y Rubianes, 2004).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a estadística descriptiva (promedio, desviación estándar), la evaluación de los porcentajes de los parámetros (motilidad total, motilidad progresiva, host y vitalidad) fueron sometidos previamente a pruebas de normalidad y homogeneidad y posteriormente a un diseño completamente al azar y para determinar las diferencias de medias fue utilizada la prueba de Tukey. Las tasas de preñez según el tipo de celo se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis empleando el programa estadístico R 3.5.1.(Core, 2018).

RESULTADOS

La tabla 1 muestra el efecto protector de las diferentes yemas de huevo sobre la motilidad total, motilidad progresiva, funcionalidad e integridad de la membrana plasmática, de acuerdo con los resultados las cuatro yemas de huevo generaron protección sobre la motilidad total y progresiva a la descongelación, los mismos que fueron similares ($p > 0.05$), mientras que el efecto protector de las yemas de huevo de codorniz, gallina criolla y gallina de granja fue en mayor proporción sobre la funcionalidad de membrana; mientras que el efecto de protección de la yema de paloma sobre la funcionalidad de membrana fue menor ($p < 0.05$), finalmente las yemas de huevo de las cuatro especies protegieron la integridad de membrana de los espermatozoides a la descongelación en forma similar ($p > 0.05$).

Tabla 1. Motilidad total y progresiva, test hiposmótico y vitalidad en semen descongelado usando yema de huevo de diferentes aves (n= 30).

	Codorniz (TI)	Gallina Criolla (TII)	Gallina Granja (TIII)	Paloma (TIV)
Motilidad Total (%)	54.3 ± 3.87	51.86 ± 8.45	57.87 ± 9.41	44.21 ± 13.21
Motilidad Progresiva (%)	50.03 ± 1.8	51.36 ± 9.47	50.72 ± 8.83	45.98 ± 5.68
Test Hiposmótico (Host: %)	59.44 ± 3.9 ^a	55.86 ± 5.41 ^{ab}	60.5 ± 5.62 ^a	49.3 ± 9.26 ^b
Viabilidad (%)	56.08 ± 3.78	57.19 ± 7.2	56.04 ± 6.0	46.66 ± 15.77

Letras diferentes (superíndice) en filas indica diferencia estadísticamente ($P < 0.05$).

La figura 1 muestra la tasa de gestación de ovejas evaluadas por ultrasonografía a los 45 días tras la inseminación artificial cervical con semen criopreservado a celo natural fue 48.00% y sincronizado 21.05% que muestran diferencia significativa entre los grupos ($p = 0.0245$).

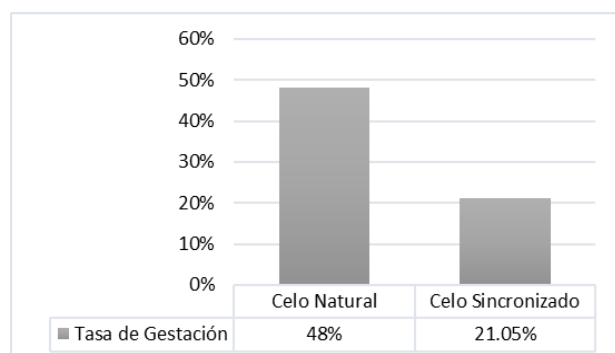


Figura 1. Tasa de gestación en borregas inseminadas con celo natural y sincronizado ($p = 0.0245$)

DISCUSIÓN

Los resultados de motilidad total y progresiva a la descongelación muestran el efecto protector de la yema de huevo de las cuatro especies basado en que la yema de huevo posee diferentes componentes como ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol que proporciona efectos crioprotectores sobre los espermatozoides (Bathgate et al., 2006). Los resultados obtenidos están dentro los parámetros reportados, por varios investigadores que utilizaron yema de huevo de diferentes especies y lograron del 26 al 58% de motilidad a la descongelación (Cabrera et al., 2011; Kulaksız et al., 2010; Saieed et al., 2018). La acción protectora de la yema de huevo de las cuatro especies utilizadas sobre las motilidades resultó ser similar a la descongelación (Tabla 1) a pesar que otros autores reportan diferencias en la acción protectora de las yemas huevo, esta similitud en las motilidades (MT y MP) observadas se debería a que durante la preparación del diluyente Tris con yema de huevo fueron sometidos a procesos de centrifugación y filtración que eliminaron los gránulos de grasa de mayor tamaño, proporcionando un medio purificado con fosfolípidos, ácidos grasos, colesterol y lipoproteínas de

baja densidad (LDL); las cuales se unen a la membrana del espermatozoide para formar una película protectora contra los cristales hielo generados durante la congelación, asimismo actúa contra el shock frío y mejora la calidad del espermatozoide a la descongelación (Hu et al., 2010; Moussa et al., 2002).

La funcionalidad de la membrana es un parámetro crucial para la evaluación de semen revela que la membrana plasmática este intacta, necesaria para la sobrevivencia del espermatozoide y garantiza la motilidad para el transporte en la inseminación artificial (Alcay et al., 2015; Makarevich et al., 2010); la integridad de la membrana plasmática permite diferenciar el total de espermatozoides vivos y muertos, así como alteraciones estructurales en la zona de la cola (Chemes y Rawe, 2003). Durante los procesos de enfriamiento y criopreservación la sobrevivencia de los espermatozoides disminuye y el grado de daño está asociado a varios factores los cuales restringen la supervivencia del espermatozoide, que comprometen la proporción de la motilidad disminuyendo alrededor del 50% a la descongelación que afecta la fecundación del espermatozoide (Alcay et al., 2015; Bag et al., 2002; Jerez-Ebensperger et al., 2015; Luna-Orozco et al., 2019; Peris-Frau et al., 2020; Rekha et al., 2016; Rostami et al., 2020). Los resultados obtenidos en el presente estudio de funcionalidad e integridad plasmática son semejantes a los reportados (Alcay et al., 2015; Jerez-Ebensperger et al., 2015; Luna-Orozco et al., 2019; Peris-Frau et al., 2020; Rostami et al., 2020). En la tabla 1 la funcionalidad plasmática a la prueba hiposmótica, se observó que en las yemas huevo de codorniz, gallina criolla, gallina de granja fueron superiores frente a la yema de huevo de paloma; este resultado se debería a que la proporción de lípidos en la yema de huevo de gallinas y codorniz es el 35%, mientras que en la yema de huevo de paloma es el 30% (Aydin, 2005; Bitman & Wood, 1980). Estudios indican que la protección de la membrana plasmática de los espermatozoides durante la congelación está basada en que los ácidos grasos no saturados de la yema de huevo dan la fluidez plasmática y que es necesario para su supervivencia (Abdi-Benemar et al., 2015), por lo tanto en el presente estudio la suplementación de las yemas de huevo de codorniz y gallinas al poseer mayor proporción de lípidos, también poseen mayor proporción de ácidos grasos no saturados que protegieron mejor la estabilización plasmática del espermatozoide durante la congelación; como indican las acciones de los ácidos grasos no saturados en la congelación (Bathgate et al., 2006; Trimeche et al., 1997), además la funcionalidad y la integridad plasmática del espermatozoide tienen una relación directa con la motilidad (Alcay et al., 2015).

La utilización de inseminación artificial en ovejas con semen congelado, es aprovechar en forma eficiente a los reproductores de alta genética, pero los espermatozoides criopreservados deben de retener su capacidad fertilizante a la post- descongelación (Abdi-Benemar et al., 2015), la tasa de gestación obtenida a la inseminación artificial cervical en ovejas con celo natural fue del 48.00% frente a borregas inseminadas a celo sincronizado el 21.05%, estos resultados son comparables con los rangos reportados (Abdi-Benemar et al., 2015; Fang et al., 2016; R. Masoudi et al., 2016; Reza Masoudi et al., 2017; Pérez et al., 2011; Rekha et al., 2016). La tasa de gestación obtenida en ovejas sincronizadas (21.05%); se debería al metabolismo tardío de la

progesterona exógena que bloquea la liberación de la LH, por lo tanto, también maduración folicular y ovulación, además que produce un ambiente inadecuado para el transporte del espermatozoide (Blaschi et al., 2014).

CONCLUSIONES

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. En la inseminación artificial vía cervical con semen criopreservado la gestación en ovejas con celo natural fue mayor en comparación a las de celo sincronizado.

CODIGO DE ETICA

Los autores declaran que el estudio presentado se ha llevado a cabo de acuerdo con el Código de Ética para los experimentos con animales, tal y como se refleja en la normativa:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores firmantes del presente trabajo de investigación declaran no tener ningún potencial conflicto de interés personal o económico con otras personas u organizaciones que puedan influir indebidamente con el presente manuscrito.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Preparación y ejecución: MPD, RAD, LAR, RRE; Desarrollo de la metodología: UPG, LAR, RRE, RAD, JAD; Concepción y diseño: MPD, RRE, UPG; Edición del artículo: MPD, RRM Supervisión del estudio: RRM, RRE, UPG

REFERENCIAS

- Abdi-Benemar H, Jafaroghli M, Khalili B, Zamiri MJ, Ezazi H, Shadparvar AA. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*. 2015; 130: 166-170.
- Akhter S, Rakha BA, Ansari MS, Husna AU, Iqbal S, Khalid M. Evaluation of quail and turkey egg yolk for cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Theriogenology*. 2017; 87: 259-265. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.002>.
- Alcay S, Berk Toker M, Gokce E, Ustuner B, Tekin Onder N, Sagirkaya H, Nur Z, Kemal Soylu M. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology*. 2015; 71(2): 329-333. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.008>.
- Aydin R. The effect of conjugated linoleic acid on the fatty acid composition of different tissues and yolk lipids in pigeons. *South African Journal of Animal Sciences*. 2005; 35(4): 253-260. <https://doi.org/10.4314/sajas.v35i4.3968>.

- Bag S, Joshi A, Naqvi SMK, Rawat PS, Mittal JP. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2002; 72(3): 175–183. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00118-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00118-5).
- Bergeron A, Manjunath P. New Insights Towards Understanding the Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Molecular Reproduction and Development*. 2006; 73: 1338–1344. <https://doi.org/10.1002/mrd>.
- Bitman J, Wood DL. Cholesterol and Cholesteryl Esters of Eggs from Various Avian Species. *Poultry Science*. 1980; 59(9): 2014–2023. <https://doi.org/10.3382/ps.0592014>.
- Blaschi W, Lunardelli PA, Marinho LSR, Max MC, Santos GMG, Silva-Santos KC, Melo-Sterza FA, Baldassarre H, Rigo TR, Seneda MM. Effects of progestagen exposure duration on estrus synchronization and conception rates of crossbreed ewes undergoing fixed time artificial insemination. *Journal of Veterinary Science*. 2014; 15(3): 433–437. <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.3.433>.
- Cabrera P, Ayulo A, Pantoja C. Efecto del dilutor Tris y Citrato con yema de huevo de codorniz sobre la viabilidad espermática en semen ovino congelado en pajillas. *Rev Inv Vet Perú*. 2011; 22(2): 105-113.
- Chemes HE, Rawe VY. Sperm pathology: A step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update*. 2003; 9(5): 405–428. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg034>.
- Gibbons A, Cueto M. Inseminación artificial con semen congelado en ovinos. 2009. *Presencia* 53: 32-34. Accesado. <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inseminacion.pdf>
- Cueto M, Gibbons A, García J, Arrigo J. Manual De Obtencion, Procesamiento y Conservación. Argentina: INTA; 2016. Accesado. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-obtencion_procesamiento_y_conservacion_semen_ov.pdf
- Evans G, Maxwell W. Inseminación artificial de ovejas y cabra. España: Acribia S.A.; 1990. ISBN: 978-84-200-0675-8.
- Fang Y, Blair H, Zhong R, Sun H, Zhou D. Optimizing the freezing rate for ovine semen cryopreservation: Phospholipid profiles and functions of the plasma membrane and quality and fertilization of spermatozoa. *Small Ruminant Research*. 2016; 139: 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.04.012>.
- Hu JH, Li QW, Zan LS, Jiang ZL, An JH, Wang LQ, Jia YH. The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Animal Reproduction Science*. 2010; 117(12): 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.04.001>.
- Jerez-Ebensperger RA, Luño V, Olaciregui M, González N, de Blas I, Gil L. Effect of pasteurized egg yolk and rosemary honey supplementation on quality of cryopreserved ram semen. *Small Ruminant Research*. 2015; 130: 153–156. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.07.010>.
- Kulaksız R, Akc E, Das A. The protective effect of egg yolk from different avian species during the cryopreservation of Karayaka ram semen. *Small Ruminant Research*. 2009; 88: 12–15. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.11.014>.
- Luna-Orozco JR, González-Ramos MA, Calderón-Leyva G, Gaytán-Alemán LR, Arellano-Rodríguez F, Ángel-García O, Véliz-Deras FG. Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2019; 2:126–130.
- Makarevich AV, Kubovicova E, Sirotkin AV, Pivko J. Demonstration of the effect of epidermal growth factor on ram sperm parameters using two fluorescent assays. *Veterinaria Medicina*. 55; 12: 581–589.
- Manjunath P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. *Anim Reprod*. 2012; 9(4): 809-815.
- Masoudi R, Sharafi M, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Zhandi M, Esmaili V, Shahverdi A. Effect of dietary fish oil supplementation on ram semen freeze ability and fertility using soybean lecithin– and egg yolk–based extenders. *Theriogenology*. 2016; 86(6): 1583–1588. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.018>.
- Masoudi R, Zare Shahneh A, Towhidi A, Kohram H, Akbarisharif A, Sharafi M. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. *Cryobiology*. 2016; 74: 77–80. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.012>.
- Menchaca A, Rubianes E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction*. 2004; 16: 403-413.
- MINAGRI. www.minagri.gob.pe. <https://www.minagri.gob.pe/portal/40-sector-agrario/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion/301-ovinos>. 02/06/1996. Disponible en: www.minagri.gob.pe. 09/05/2020.
- Moussa M, Martinet V, Martinet A, Trimeche A, Tainturier D, Anton M. Low Density Lipoproteins Extrated From Hen Egg Yolk Ny an Easy Method: Cryoprotective Efect on Frozen-Thawed Bull Semen. *Theriogenology*. 2002; 57: 1695–1706.
- Pérez MG, Quispe TL, Málaga J, Quispe Y, Perez U. Inseminación artificial con semen congelado en ovejas por vía vaginal y cervical en el Altiplano Peruano. *SPERMOVA*. 2011; 1: 121-122. Accesado. <http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.No.1Vo11/121-122INSEMINACION-ARTIFICIAL-CON-SEMEN-CONGELADOperez2011-121-122.pdf>
- Perez UH Perez MG, Mellisho E. Viabilidad espermática en semen de carnero congelado por dos métodos. *SPERMOVA*. 2012; 1: 127-128. Accesado <http://spermova.pe/site2/files/Revistas/Rev.No.1Vo11/127-128VIABILIDAD-ESPERMATICA-EN-SEMEN-DE-CARNEROperez2011-127-128.pdf>
- Peris-Frau P, Martín-Maestro A, Iniesta-Cuerda M, Sánchez-Ajofrín I, Cesari A, Garde JJ, Villar M, Soler AJ. Cryopreservation of ram sperm alters the dynamic changes associated with in vitro capacitation. *Theriogenology*.

- 2020; 145: 100–108.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.046>.
- Pini T, Rickard JP, Leahy T, Crossett B, Druart X. Cryopreservation and egg yolk medium alter the proteome of ram spermatozoa. *Journal of Proteomics*. December 2017; 1. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.04.001>.
 - Bathgate R, Maxwell WM, Evans G. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim*. 2006;41(1):68-73. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00623.x
 - Core R. R: a language and environment for statistical computing R. R Foundation for Statistical Computing. 2018.
 - Rekha A, Zohara BF, Bari FY, Alam MGS. Comparison of commercial Triladyl extender with a tris-fructose-egg-yolk extender on the quality of frozen semen and pregnancy rate after transcervical AI in Bangladeshi indigenous sheep (*Ovis aries*). *Small Ruminant Research*. 2015; 134: 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.007>.
 - Rostami B, Ebrahimi D, Sadeghipanah H, Masoumi R, Shahir MH. Effects of supplementation of tris-egg yolk extender with different sugars and antioxidants on freezability of ram semen. *Cryobiology*. 2019; 92: 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.10.198>.
 - Saieed AY, Mahdi ZA, Ibrahim AA. Effect of addition from egg yolk of different avian to tris extender on freezing semen traits of awassi rams. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*. 2018; 49(4): 663–669.
 - Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*. 1995; 38(1–2): 1–36. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(94\)01328-J](https://doi.org/10.1016/0378-4320(94)01328-J).
 - Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*. 2000; 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).
 - Santiani A, Sandoval R; Ruiz L, Coronado L. Estudio de la integridad en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hiposmótico. XXVII Reunión Científica Anual de La Asociación Peruana de Producción Animal. 11/28/2004: 36-38.
 - Su L, Li X, Quan J, Yang S, Li Y, He X, Tang X. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Animal Reproduction Science*. 2008; 104(2–4): 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.06.019>.
 - Swelum AAA, Saadeldin IM, Alanazi MB, Ba-Awadh H, Afifi M, Alowaimer AN. Effects of adding egg yolks of different avian species to Tris glycerol extender on the post-thawing quality of buck semen. *Animal Reproduction Science*. 2018; 195: 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.06.016>.
 - Tabarez A, García W, Palomo MJ. Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*. 2017; 149: 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.01.007>.
 - Trimeche A, Anton M, Renard P, Gandemer G, Tainturier D. Quail egg yolk: A novel cryoprotectant for the freeze preservation of Poitou jackass sperm. *Cryobiology*. 1997; 34(4): 385–393. <https://doi.org/10.1006/cryo.1997.2009>.