

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS PECUARIAS

EFFECTO DE DOS DILUYENTES SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN OVINO
CONSERVADO A 4°C EN DIFERENTES TIEMPOS

POR:

ITZEL ARELIS SALDAÑA G.
4-736-2474

DAVID, CHIRIQUI

REPUBLICA DE PANAMA

2013

i

**EFFECTO DE DOS DILUYENTES SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN
OVINO CONSERVADO A 4°C EN DIFERENTES TIEMPOS**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN
PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL
DEBE SER OBTENIDO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

APROBADO

RODERICK GONZALEZ. M. M.Sc.
Director

PEDRO GUERRA M.Sc.
Comité

CARLOS SALDAÑA. M.Sc.
Comité

David, Provincia de Chiriquí, República de Panamá.
2013.

Agradecimiento

En primer lugar deseo agradecerle a **Dios Todopoderoso** por haberme dado la sabiduría, salud y la fortaleza para culminar mis estudios.

A mis padres **Francisco** y **Ana** a los cuales debo todo, gracias por darme la luz de la vida, a mis hermanos **Francisco, Erick** y **Madeleine** que han servido de compañía en el recorrer de mi infancia.

A mis abuelos **Mita** y **Pedro**, por darme tanto cariño, los quiero!

A ti **Nito**, por tu ayuda y palabras de ánimo cuando más las necesite.

Un reconocimiento muy sincero al **Personal Técnico** de la **Estación Experimental de Gualaca** por el apoyo brindado en la realización de este trabajo de graduación.

A mis asesor; el **Ing. Roderick A. González**, director del trabajo y a quien le agradezco el apoyo brindado. A mis consejeros el **Ing. Pedro Guerra** y al **Lic. Carlos Saldaña**, por sus observaciones y recomendaciones.

También deseo agradecerles al **Sr. Henry Ortega** y **José de la Rosa** el apoyo brindado durante los periodos de tomas de datos, al **Personal del Laboratorio de Biotecnología Animal**, en especial a la **Ing. Kristel Flores** y a la **Ing. Virginia Vigil**, por su apoyo en los análisis de las muestras.

Un agradecimiento muy especial al **Ing. Raúl De León**, quien apoyó y supervisó los trabajos de laboratorio y la ejecución del trabajo en campo y además realizó la revisión técnica del documento final. Muchas gracias.

¡A todos Ustedes y a aquellos que creyeron en mi Muchas Gracias y que Dios los bendiga!

Itzel

Dedicatoria

Este primer logro profesional está dedicado a mis padres **Francisco Saldaña** y **Ana María González de Saldaña**, hermanos **Francisco, Erick y Madeleine**, esperando que este trabajo sirva de ejemplo de que todo en la vida, con un poco de esfuerzo y la ayuda de Dios, se puede lograr.

Itzel

EFFECTO DE DOS DILUYENTES SOBRE LA VIABILIDAD DEL SEMEN OVINO CONSERVADO A 4°C EN DIFERENTES TIEMPOS

Saldaña, G., I. A. 2012. *Efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen ovino conservado a 4°C en diferentes tiempos. Tesis para optar por el título de Ingeniero Zootecnista. Universidad Nacional de Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. David, Chiriquí.*

RESUMEN.

Con la finalidad de evaluar el efecto de dos diluyentes seminales sobre la viabilidad del semen ovino conservado a 4°C en diferentes periodos, se evaluaron 20 eyaculados procedentes de 4 sementales ovinos de las razas Dorper, Katahdin, Pelibuey y F₁ (Dorper x Pelibuey) obtenidos mediante vagina artificial tres veces por semana, siempre en presencia de una hembra en celo. Inmediatamente después de la colecta, se procedió a evaluar cada eyaculado y aquellos que fueron aptos, se dividieron en dos partes iguales y a cada una se le agregó uno de los dos diluyentes en evaluación.; el T₁ compuesto por una fórmula desarrollada por Duverger (1998) y el T₂ el diluyente comercial **Two-Step** (Continental Plastic Corp. USA) utilizando para ello una tasa de dilución de $30 \times 10^6/0.5\text{cc}$ del volumen total diluido. Las muestras se conservaron en refrigeración a 4°C y los muestreos para determinar la viabilidad del mismo se hicieron a las 24, 48, 72 y 96hrs tomando una alícuota y de cada tratamiento y colocándola en baño maría para su incubación. El porcentaje de motilidad espermática (masal e individual), viabilidad espermática (vivos y muertos) y porcentaje de patologías se determinaron a los 30min y 2hrs post-incubación. Como los resultados no presentaron una distribución normal, fueron transformados a \log_{10} y se procedió a correr el análisis estadístico, mediante un modelo completamente al azar, con comparación de medias por Tukey (0.05). El análisis mostro diferencias significativas entre tratamiento (P<0.05) para la motilidad espermática masal a las 24 (30min) y 96hrs (30min y 2hrs), siendo el T₂ el que mayor motilidad masal presento. También se encontró diferencias significativas (P<0.05) para la motilidad individual entre los tratamientos para las 24hrs (2hrs) y 96hrs (2hrs). No se encontraron diferencias significativas (P>0.05) para la viabilidad espermática (vivos y muertos) entre tratamientos ni entre razas. Las patologías espermáticas para todos los periodos se mantuvieron por debajo del 15%. Con base a estos resultados se concluye que es factible conservar semen refrigerado a 4°C, hasta por 96hrs con capacidad fecundante utilizando el diluyente comercial **Two-Step** (Continental Plastic Corp. USA)

Palabras claves: semen ovino, diluyente, motilidad, viabilidad espermática, patologías.

EFFECT OF TWO DILUENT ON THE FEASIBILITY OF OVINE SEMEN STORAGE AT 4 ° C IN DIFFERENT TIMES

Saldaña, G., I.A. 2012. Effect of two diluent on the feasibility of ovine semen storage at 4°C in different times. Thesis to be eligible for the title of Ingeniero Zootecnista. Panama National University. Agricultural Sciences School. David, Chiriquí.

ABSTRACT

With the purpose of evaluating the effect of two seminal diluents on the feasibility of ovine semen storage at 4 ° C in different periods, were evaluated 20 ejaculates from four rams; Dorper, Katahdin, Pelibuey and F1 (Dorper x Pelibuey) obtained by artificial vagina three times a week, always in the presence of a female in heat. Immediately after collection, proceeded to evaluate each ejaculate and those who were eligible, were divided into two equal parts and each was added one of two diluents in evaluation.; the T₁ composed by a formula developed by Duverger (1998), and the T₂ commercial diluent **Two-Step (Continental Plastic Corp. USA)** using a rate of dilution of 30 x 10⁶/0.5cc of the diluted total volume. The samples were preserved in refrigeration at 4 ° C and samplings to determine the feasibility of the same were made at 24, 48, 72 and 96hrs taking one aliquot of each treatment and placing it in water bath for incubation. The percentage of sperm motility (masal and individual), sperm viability (live and dead), and percentage of pathologies were identified to the 30 min and 2hrs post-incubation. As the results did not show a normal distribution, were transformed to log₁₀ and proceeded to run statistical analysis, using a model completely at random, with Tukey mean comparison (0.05). The analysis showed significant differences between treatment (P<0.05) for sperm motility masal at 24 (30 min) and 96hrs (30 min and 2hrs), being the T₂ which present greater motility masal. We also found significant differences (P<0.05) for individual motility among treatments for 24hrs (2hrs) and 96hrs (2hrs). No significant differences were found (P>0.05) for the sperm viability (living and dead) between treatments or between races. Sperm pathology for all periods was kept below 15%. Based on these results it was concluded that it is feasible to preserve semen cooled to 4 ° C, up to 96hrs with fertilization ability using commercial diluent **Two-Step** (Continental Plastic Corp. USA)

Key words: sheep, diluent semen, motility, sperm viability and pathologies.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
INDICE DE CONTENIDO	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICAS	xv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCION	1
1.1. Planteamiento del Problema a Investigar	3
1.2. Antecedentes	4
1.3. Justificación	6
1.4. Objetivos	7
1.4.1. General	7
1.4.2. Específico	7
1.5. Hipótesis	8
1.6. Alcances y Limitaciones del Estudio	9
CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA	10
1. Antecedentes	10
2. Métodos de obtención del semen	10
2.1. Con Electro-eyaculador	12
2.2. Con vagina artificial	12
3. Características del semen	17
4. Valoración del semen	18
4.1. Factores que influyen en la valoración del esperma	20
4.1.1. Factores externos al análisis	20
4.1.2. Factores intrínsecos del análisis	21
4.2. Análisis físico.	21
4.3. Análisis microscópico	22
4.3.1. Concentración espermática	22
4.3.1.1. Error de medición de la cámara	23
4.3.1.2. Cubre cámaras calibradas	26
4.3.2. Motilidad espermática	26
4.3.2.1. Motilidad masal	26
4.3.2.2. Motilidad individual	27
4.3.3. Estado del acrosoma	28

4.3.4. Morfología espermática.	30
5. Aspectos generales de la crio-conservación de semen.	34
6. Dilución del semen	36
6.1. Razones de la dilución del semen	37
6.1.1. Razones Técnicas	37
6.1.2. Razones biológicas	38
6.1.3. Procedimiento para la dilución.	39
7. Concepto de diluyente.	39
8. Características del diluyente.	40
9. Generalidades de los diluyentes.	41
10. Tipos de diluyentes.	43
10.1. Diluyentes para semen refrigerado.	43
10.2. Diluyentes para semen congelado	46
CAPITULO 3. MATERIALES Y METODO	48
1. Localización.	48
2. Animales experimentales	49
3. Manejo de los animales	49
4. Metodología de muestreos.	50
4.1. Colecta del semen.	50
4.2. Evaluación del semen	52
4.2.1. Evaluación macroscópica del semen	53
4.2.1.1. Color y olor	53
4.2.1.2. Volumen	53
4.2.1.3. Densidad	53
4.2.2. Características microscópicas.	53
4.2.3. Motilidad Masal	54
4.2.4. Motilidad individual.	54
4.2.5. Concentración Espermática.	55
4.2.6. Viabilidad Espermática (vivos y muertos).	57
4.2.7. Preparación del colorante	57
4.2.8. Procedimiento para la coloración y el conteo de vivos y muertos	57
4.2.9. Patologías Espermáticas	59
4.2.10. Preparación de los colorantes	59
4.2.11. Metodología para la determinación de la morfología espermática	60
4.3. Determinación de la tasa de dilución	61
4.3.1. Determinación de la Concentración Espermática Viable	61
4.3.2. Dilución del semen	61
5. Evaluación del efecto de los tratamientos a diferentes periodos de tiempo	62
6. Tratamientos.	63
6.1. Metodología de la dilución	63

7. Variables de respuesta	64
8. Análisis estadístico.	64
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSION.	66
1. Aspecto físico del eyaculado	66
2. Motilidad masal inicial	69
3. Motilidad individual inicial	70
4. Concentración espermática. (ce)	71
5. Viabilidad espermática (Prueba de vivos y muertos)	75
6. Patologías	77
7. Calculo de la concentración espermática viable. (cev)	77
8. Tasa de dilución	77
9. Efecto del diluyente sobre la motilidad masal a diferentes periodos de tiempo (24; 48; 72 y 96 horas).	78
10. Efecto del diluyente sobre motilidad individual a diferentes periodos de tiempo.	83
11. Viabilidad espermática a diferentes periodos de tiempo (0; 24; 48; 72 y 96 horas).	86
CONCLUSIONES	90
RECOMENDACIONES	91
LITERATURA CONSULTADA	92

ÍNDICE DE CUADROS

No.	TÍTULO	Pág.
I	CARACTERISTICAS DEL EYACULADO OVINO.	17
II	ESTIMACION DE LA CONCENTRACION ESPERMATICA DE ACUERDO A LA APARIENCIA Y CONSISTENCIA DEL EYACULADO	23
III	FORMULACION DE DILUYENTE UTILIZANDO YEMA DE HUEVO	45
IV	ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE VOLUMEN ENTRE RAZAS	67
V	ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE CONCENTRACION ESPERMATICA ENTRE RAZAS	72
VI	ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE MOTILIDAD MASAL	79
VII	ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE MOTILIDAD INDIVIDUAL	84
VIII	ANALISIS DE VARIANZA PARA VIABILIDAD ESPERMATICA POR PERIODO	86
IX	PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA MOTILIDAD MASAL	89
X	PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA MOTILIDAD INDIVIDUAL	89

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	TÍTULO	Pág.
1	Vagina artificial.	15
2	Evaluación física del eyaculado	22
3	Determinación de la concentración espermática mediante la cámara de Neubauer	25
4	Determinación del estado del acrosoma de los espermios mediante la tinción eosina/nigrosina.	29
5	Estructura del espermatozoide	31
6	Anomalías de la cabeza del espermatozoide	32
7	Anomalías del cuello y la parte media del espermatozoide	32
8	Anomalías de la cola y trastornos del espermatozoide	33
9	Fachada del edificio administrativo de la Estación experimental de Gualaca	48
10	Macho de la raza Dorper utilizado para extracción de semen	49
11	Machos excitados con hembras en celo durante las extracciones	50
12	Partes de la vagina artificial utilizada en la colecta de semen	51
13	Llenado de la vagina con agua caliente	51
14	Verificación de la temperatura de la vagina artificial antes de la extracción	52
15	Momento de la obtención del eyaculado	52
16	Muestra de semen colocada sobre una platina calentable para determinar la motilidad individual con un aumento de 100x	54
17	Sperma-Cue. Equipo utilizado para determinar la concentración espermática	56
18	Micro-cubeta para fotómetro Sperma-Cue	56

19	Procedimiento correcto en la preparación del frotis para determinación de la viabilidad espermática.	58
20	Observación de vivos y muertos en el microscopio	59
21	Eyaculados mantenidos en baño María hasta realizar los cálculos para la dilución final	60
22	Muestra de un eyaculado con características ideales para la dilución	68
23	Motilidad masal observada al microscopio con aumento de 40x	69
24	Colocación de la gota de semen en la microcubeta del fotómetro Sperma-Cue para la determinación de la C.E	72
25	Lectura de la concentración espermática en el fotómetro Sperma-Cue.	73
26	Observación de la viabilidad espermática (vivos y muertos) en el microscopio con aumento de 100x	76

ÍNDICE DE GRÁFICAS

NO.	TÍTULO	PÁG.
1.	VOLUMEN PROMEDIO EYACULADO POR RAZA.	68
2.	MOTILIDAD INDIVIDUAL POR RAZA.	70
3.	RELACION ENTRE LA MOTILIDAD MASAL Y LA MOTILIDAD INDIVIDUAL.	71
4.	CONCENTRACION ESPERMÁTICA OBSERVADA POR RAZA	74
5.	RELACION ENTRE MOTILIDAD MASAL Y CONCENTRACION ESPERMÁTICA.	74
6.	RELACIÓN ENTRE MOTILIDAD INDIVIDUAL Y CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA	75
7.	MOTILIDAD MASAL POR TRATAMIENTO POR PERIODO	80
8.	EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS GRUPOS RACIALES SOBRE LA MOTILIDAD MASAL	81
9	COMPORTAMIENTO DE LA MOTILIDAD MASAL POR GRUPO RACIAL POR PERIODO Y TIEMPO DE EVALUACIÓN	82
10.	VIABILIDAD ESPERMÁTICA (VIVOS) POR PERIODO.	78
11	COMPORTAMIENTO DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL POR GRUPO RACIAL POR PERIODO Y TIEMPO DE EVALUACIÓN	85
12	COMPOSICIÓN DE ESPERMIOS VIVOS POR PERIODO CON OTROS AUTORES	87
13	VIABILIDAD ESPERMÁTICA (VIVOS) POR PERIODO	89

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Bioteχνologías como la transferencia de embriones (TE) y la inseminación artificial (IA) son una excelente alternativa para mejorar la calidad genética de los ovinos, pues permiten acelerar el flujo de material genético superior de los rebaños elites hacia los rebaños multiplicadores y comerciales, además de que nos facilitan el transporte de material genético a nivel internacional, evitándonos el traslado de los reproductores y disminuyendo los riesgos sanitarios.

Sin embargo, la IA utilizando semen congelado en ovinos presenta dificultades, debido a la reducción de la viabilidad espermática producida por el proceso de congelamiento y descongelamiento.

Diversas investigaciones han demostrado que la refrigeración y la criopreservación de semen ovino producen diversos cambios en la estructura y función de los espermatozoides, parecido a lo que sucede en el tracto reproductor de la hembra durante la capacitación espermática (CE). Un efecto similar se ha observado en cuanto al tiempo de conservación en el semen fresco o refrigerado, lo cual puede resultar en una baja capacidad de fertilización (**Salamon y Maxwell, 2000**).

Por otra parte, la crio-conservación del semen a través del empleo de dilutores con diferentes componentes hace posible la perpetuación de las características deseables, aun después de la muerte o sacrificio de los reproductores seleccionados (**Aisenet et al., 1995**), por lo que el procedimiento de dilución del esperma del macho ovino requiere del uso de un semen de alta calidad durante todo el proceso a fin de alcanzar mejores resultados, es decir, el mayor número posible de espermatozoides móviles y fecundantes después de la dilución y su posterior congelación-descongelación. De acuerdo a **Pérez y Pérez (1999)**, un semen obtenido del carnero con motilidad superior a 85% y menos de 10% de espermatozoides anormales se considera de alta calidad.

La conservación de semen favorece un uso más eficiente y prolongado de los carneros asignados a programas de mejoramiento genético, pues permiten su utilización durante y fuera de la estación reproductiva (**Colas, 1975, 1984; Gibbonset et al., 1993; Gibbons y Cueto, 2004**). Sin embargo, los carneros utilizados en estos programas, se ven sometidos a períodos de intensa actividad, siendo sometidos a condiciones de estrés, riesgo físico y sanitario, que en muchas ocasiones afectan la calidad seminal (**Olivera et al., 2005**).

De acuerdo a **Vázquez et al. (2010)**, en los últimos años, multitud de trabajos han intentado incrementar la viabilidad espermática profundizando en el conocimiento de las necesidades de los espermatozoides ovinos e incorporando nutrientes y sustancias diversas a los diluyentes seminales ya

existentes. Productos hormonales, azúcares, antioxidantes, lipoproteínas de extractos vegetales (LDL), plasma seminal, etc., son parte de una amplia lista de sustancias empleadas intentando prolongar la motilidad y funcionalidad espermática y mantener su poder fecundante en el tiempo. Los resultados obtenidos han sido poco alentadores y pocos estudios efectuados en laboratorio han sido contrastados con resultados en campo. El descenso térmico de 15°C a 5°C como método de conservación seminal también ha sido estudiado con el objetivo de reducir la actividad celular, observándose una diferente susceptibilidad individual de los sementales al enfriamiento seminal. Por este motivo también se han incorporado protectores celulares frente al frío a diferentes concentraciones a los diluyentes.

Ante este panorama, y en vista de la poca información con que se cuenta en Panamá sobre efecto de los diluyentes sobre la viabilidad de semen ovino, nos propusimos realizar este trabajo de grado con el objetivo de evaluar el efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen ovino conservado a 4°C e diferentes periodos

1.1. Planteamiento del problema

La base genética de los sistemas de producción ovina en Panamá lo constituyen animales de razas de pelo (Pelibuey y BlackBelly), los que, de acuerdo a **Saldaña y Ortega (2009)**, a pesar de una gran capacidad de adaptación y excelente reproducción, son animales de tamaño mediano,

ganancias de peso intermedias y bajo rendimiento en canal, caracterizados por un bajo nivel de producción, medidos en términos de ganancia de peso diaria, calidad y rendimiento de la canal y bajo desarrollo, debido al escaso manejo técnico e intensivo, lo que ha generado una erosión genética debido a la consanguinidad, trayendo como consecuencia una pérdida de la diversidad genética.

La introducción de razas altamente productoras de carne como la Dorper y la Katahdin, por parte del IDIAP, plantea una solución a este problema, sin embargo, se requiere del desarrollo y masificación de técnicas biotecnológicas, como la inseminación artificial, que permitan un mejor aprovechamiento del material genético con que se cuenta.

1.2. Antecedentes

El objetivo fundamental de la ganadería ovina no es solo incrementar la productividad del hato, sino llegar a ser competitiva ante una economía globalizada, de manera tal que el empleo de las biotecnologías de la reproducción, para lograr grandes avances en el mejoramiento genético, representa una importante herramienta.

El cruzamiento interracial en ovinos se está utilizando ampliamente y para nuestros sistemas de producción es una alternativa viable dado que se cuenta con una de las razas de mayor capacidad de adaptación a las condiciones

tropicales y a través de este medio se puede lograr, rápidamente, complementar el aspecto productivo de los hatos ovinos nacionales. Según **Salinas et al. (2008)**, animales cruzados (Pelibuey x Dorper) reportan rendimiento en canal superior al 50%, con excelente proporción de carne magra, lo que demuestra el potencial de los ovinos Pelibuey en programas de cruzamiento.

En los programas de mejoramiento se deben distinguir dos etapas: la primera consiste en lograr la mejora a través de la selección de individuos superiores tomando en cuenta su superioridad genética con relación a una característica determinada y la segunda es la diseminación de este valor genético dentro de una población comercial. Es en esta segunda etapa donde la biotecnología juega un papel importante.

La contribución de un individuo al progreso genético de su especie esta condicionado por el número de descendientes que se puedan obtener de él durante su vida reproductiva o en un periodo de tiempo determinado y dentro de las biotecnologías de la reproducción, la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones (TE) han resultado ser las más importantes en la producción de material genético superior.

La inseminación artificial data de mediados de del siglo pasado y ha sido motivo de numerosas investigaciones, las cuales han logrado simplificar y elevar considerablemente los resultados obtenidos en la aplicación de la misma. Constituye la primera generación de las biotecnologías de la

reproducción y su contribución a la selección animal no admite discusión. Los programas reproductivos basados en la IA han sido de los mejores instrumentos de selección y han permitido reducir el número de reproductores incrementando el número de descendientes de los de mayor valor productivo. Sin embargo esta técnica no ha alcanzado el mismo desarrollo en los programas de mejoramiento genético ovinos debido a las limitaciones que se presentan en la crío-conservación del semen ovino.

1.3. Justificación

La producción de carne ovina en Panamá es una actividad no tradicional que constituye una alternativa viable no solo para el auto consumo sino, como una fuente de ingresos que contribuye a elevar el nivel socio-económico de las familias rurales a través de su comercialización. Sin embargo, para ello se requiere de una alta eficiencia reproductiva a fin de asegurar la sostenibilidad de estos sistema de producción (**Samaniego, 2007**).

Cada vez son más los productores panameños que se involucran a la ovinocultura, lo que exige, no solo la formación de personal altamente calificado, sino también de la implementación de herramientas biotecnológicas de reproducción asistida, que contribuyan a mejorar la eficiencia reproductiva del hato nacional.

Una de estas herramientas es la Inseminación Artificial, sin embargo la misma no es utilizada en los programas de mejoramiento genético ovino debido a la dificultad que representa la congelación del semen ovino.

En Panamá, es muy poca la información que se ha generado en cuanto a la crio-conservación del semen ovino, ya sea congelado o refrigerado a 4°C, por lo que es necesario generar información local que nos permita identificar una metodología para la conservación de semen ovino por largo periodo de tiempo con capacidad fecundante.

Por lo anteriormente expuesto, se hace necesario generar información local que nos permita identificar una metodología, para la conservación de semen ovino con capacidad fecundante.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen ovino conservado en refrigeración a 4°C.

1.4.2. Objetivo Específico

- 👉 Determinar el efecto de dos diluyentes sobre la motilidad masal de los espermatozoides en el ovino refrigerado a 4°C.

- ☞ Determinar el efecto de dos diluyentes sobre la motilidad individual de los espermatozoides en el semen ovino refrigerado a 4°C.
- ☞ Determinar el efecto de la refrigeración de semen a 4°C sobre la viabilidad de los espermatozoides en el semen ovino.
- ☞ Determinar el efecto de la refrigeración a 4°C sobre las patologías espermáticas de los espermatozoides en el semen ovino

1.5. Hipótesis

Ho: Los diluyentes utilizados no tienen efecto sobre los indicadores de viabilidad espermática del semen ovino refrigerado a 4°C.

Ha: De los diluyentes utilizados, al menos uno tiene efecto sobre los indicadores de viabilidad espermática del semen ovino refrigerado a 4°C.

Ho: Al menos uno de los diluyentes no es útil para la conservación de semen ovino refrigerado a 4°C bajo nuestras condiciones.

Ha: Uno de los diluyentes es útil para la conservación del semen ovino refrigerado a 4°C bajo nuestras condiciones.

1.6. Alcances y limitaciones del estudio

La principal limitación que confronta el presente estudio es la poca información que se tiene acerca de diluyentes para semen ovino. Por otro lado el personal técnico que conoce de los procedimientos para la crioconservación y los protocolos de trabajo, en nuestro país, son escasos. Sin embargo, de lograr los objetivos propuestos en nuestro trabajo, el alcance que tendrá esta investigación será enorme, puesto que pondremos en manos de los pequeños y medianos productores ovinos, un protocolo para la conservación del semen refrigerado con capacidad fecundante, lo que contribuirá con los programas de mejoramiento genético que viene desarrollando el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.

CAPITULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Antecedentes

La inseminación artificial (IA) es una de las biotecnologías de la reproducción que ha alcanzado una gran relevancia en los últimos años, ya que nos permite lograr avances genéticos rápidos al poder aprovechar características superiores de los sementales utilizados en los programas de mejoramiento genético (**Fernández-Abella et al., 2003**). Sin embargo, la técnica depende en gran medida del desarrollo de diluyentes que permitan incrementar el volumen del eyaculado, proteger la integridad de los espermatozoides durante el enfriamiento y prolongar su vida con un mínimo efecto en la fertilidad (**Martínez, 2009, Maxwell y Salamon, 1993; Gil y Olivera, 2005; Evans y Maxwell, 1987**).

Las tecnologías de crio-conservación de semen se basan en la preservación del semen por largos períodos de tiempo (semen congelado) o períodos cortos (semen refrigerado y enfriado). Sin embargo, el proceso de congelación reduce la viabilidad y fertilidad de los espermatozoides (**Sánchez-Partida et al., 1999**), por lo que el uso de semen refrigerado o enfriado se justifica no solo por lo práctico y fácil de implementar (**Paulenzet al., 2003**), sino que, aunado a su bajo costo, debemos tener en cuenta que solo entre el 20 y el

40% de los sementales responde adecuadamente al proceso de congelamiento seminal (**Vidamentet al., 1997**).

Siendo la inseminación artificial una herramienta imprescindible para desarrollo de los esquemas de mejora genética ovina, la misma no se ha generalizado debido a multitud de factores limitantes, entre los que cabe destacar la baja fertilidad lograda empleando semen refrigerado por vía cervical, (37,5%) (**Alvarez y Anel, 2007 citado por Vásquez et al. 2010**), así como la escasa viabilidad del semen refrigerado que obliga a utilizarse dentro de las 6- 12 horas siguientes a su recogida, cuando se conserva a 15°C (**Evans y Maxwell, 1990**), siendo este último factor un condicionante de los horarios para la elaboración de las dosis seminales en los Centros de Inseminación.

Algunos investigadores (**Fernández Abella, 2003**) consideran que la conservación del semen ovino a 15°C (semen enfriado) resulta más adecuada para períodos breves de tiempo (6-12 h), en comparación con la preservación a 5°C (semen refrigerado), que se adaptaría mejor para lapsos de tiempo más prolongados (12-24 h), Sin embargo, de acuerdo con **Salamon y Maxwell (2000)**, ambos métodos de conservación seminal requieren de un aumento considerable de la concentración espermática por dosis inseminante respecto al semen fresco.

La búsqueda de nuevas formulaciones que prolonguen cada vez más el tiempo de conservación del esperma, constituye una meta para los especialistas e investigadores dedicados a esta temática (**Martínez, 2007**) por lo que, numerosos diluyentes se han diseñado con el propósito de reducir las reacciones metabólicas que se producen en el eyaculado diluido durante la conservación si afectar la motilidad espermática (**AbdElhakeam, 2000**) y los mismos van a depender del tiempo que se desee conservar la viabilidad y calidad seminal, de manera tal que se garantice la fecundación de la hembra .

2. Métodos de obtención del semen

La recogida del semen bovino normalmente se realiza utilizando dos métodos: el electro-eyaculador o la vagina artificial. Siendo utilizado este último con mayor frecuencia en los centros de inseminación artificial. Excepcionalmente en casos muy concretos, como pueden ser sementales con problemas físicos que no puedan realizar la monta, animales jóvenes o machos mal entrenados que se niegan a saltar, se puede utilizar el electro-eyaculador.

2.1. Con electro-eyaculador

Este método se basa en la aplicación de descargas eléctricas a diferentes intensidades y con frecuencias programables. Con este método podemos obtener un eyaculado sin que el macho experimente la excitación sexual, al provocar la contracción brusca de las vesículas seminales. El procedimiento se realiza vía rectal y es una técnica muy utilizada en otras especies (bovinos

o en especies salvajes) para la creación de bancos genéticos (**Crump y Crump, 1994**), Sin embargo es muy poco utilizada en ovinos por el trauma que causa en los carneros y en equinos puede causar hasta la muerte (**Mc Donnell y Odian, 1994**). Además la muestra que se obtiene es de mala calidad por lo que es más recomendable el uso de la vagina artificial.

Actualmente existen diferentes tipos de estimuladores eléctricos, siendo los más comunes los que poseen un electrodo bipolar para el recto. El más utilizado es el RuakuraRamProbe (RRP) que tiene un estimulador accionado por baterías que proporciona una salida entre 10 y 15 voltios.

Para la colección del semen con el electro-eyaculador, el macho se debe colocar en posición decúbito lateral sobre el suelo y se deben recortar el pelo que bordea el prepucio y limpiarlo. La sonda se lubricará con vaselina y se insertará por el recto a una profundidad entre los 15 y 20cm procurando no lesionar la mucosa. El pene se extenderá por enderezamiento de la flexura sigmoidea de forma tal que el glande se pueda sujetar con la mano limpia y liberar el pene del prepucio. Por la parte de atrás se colocará una gasa y se introducirá el glande y el proceso uretral en un tubo de ensayo estéril. Se recomienda sujetar el pene y el tubo de ensayo con la misma mano, dejando la otra libre para dar masaje al pene en dirección adelante con cada estímulo eléctrico (**Bearden y Fuquay, 1982; Salamon, 1990; Mejía y Hernández, 1990**).

Según **Bearden y Fuquay, (1982); Salamon, (1990) y Mejía y Hernández, (1996)** existe una amplia variedad entre los estímulos que necesitan los sementales hasta producir un eyaculado satisfactorio, sin embargo, si se exceptúa lo poco confortable que deben ser las contracciones musculares al aplicar la corriente, no existen efectos nocivos atribuibles a la técnica.

2.2. Con vagina artificial

Es el método más extendido para la obtención de semen, en la medida en que mediante el uso de la misma se puede obtener una muestra del eyaculado con las mismas características que el obtenido con la monta natural (**Crump y Crump, 1988; Mc Donnell y Love, 1990; Mc Donnell y col., 1991; Yates y Witacre, 1993; Gómez-Cuetaro, 1993; Mateos, 1996**). Además, la mayoría de los sementales aceptan la vagina artificial sin que esto afecte su comportamiento sexual, pudiéndose alternar la vagina artificial con monta natural.

La vagina artificial (VA) (**Figura I**) es una imitación de la vagina de la oveja que proporciona el estímulo térmico y mecánico para la erección del pene del macho y que son necesarios para producir la eyaculación.



Figura 1: Vagina artificial.

La VA utilizada para la extracción de semen a carneros es similar a la utilizada en toros su tamaño va a estar en dependencia de la longitud del pene, siendo en el macho cabrío más corta.

Existe una gran variedad de modelos de vaginas artificiales en el mercado, sin embargo, la mayoría está constituida por un cilindro rígido a cuyos lados se fija la camisa de caucho que delimita una cámara interior. El espacio interior se rellena hasta la mitad de agua a 45°C a través de una válvula, pudiendo insuflarse también aire con el objeto de incrementar la presión y facilitar la eyaculación del semental, ya que si se llena demasiado, esta se saldrá cuando se coloque la VA en posición vertical, lo que podría ser causa de mortalidad de los espermatozoides (**Arthur et al., 1991; Chemineau, et al., 1991; Wallance, 1992; Cambell et al., 1996; Ishwar y Momon, 1996**).

En uno de los extremos del cilindro se acopla un embudo de caucho unido a un tubo de vidrio graduado, protegido de la luz y del frío por una funda protectora. El pene en erección se introduce en el interior de la vagina artificial y debido a condiciones de temperatura y presión, se desencadena la eyaculación del macho.

Si la temperatura o la presión interior de la vagina no son las adecuadas o la recogida la realiza personal no entrenado, se pueden causar lesiones en el pene que pueden llegar a suprimir la libido y el rechazo de la monta. En la recogida del semen se facilitará la extracción si se utiliza un animal entrenado para realizar las funciones de maniquí, para lo cual suele emplearse un semental que ha terminado su etapa reproductiva y que se encuentra en buena condición corporal. La recogida de semen puede realizarse dos veces a la semana, con un intervalo de 4 días entre los dos días de la monta. En los días de extracción normalmente se realizan dos falsas montas sobre el semental que permanece como maniquí, con el fin de estimular al donante y obtener un semen con buena concentración espermática; en la tercera monta, se introduce el pene en la vagina artificial con el fin de provocar la eyaculación. En cada día de recogida se recolectan dos eyaculados con un intervalo de 20 minutos entre cada monta. En animales jóvenes únicamente se hace una extracción semanal, en la que también se recolectan dos eyaculados. **(Corteel, 1977; Pickett y Back, 1973; Furman y col., 1975; Salisbury y col., 1978)**. Este es un método muy eficaz que, realizado

apropiadamente, puede utilizarse a lo largo de la vida reproductiva del semental.

3. Características del semen

Según **Sorensen (1986)**, los machos ovinos, son animales que a los 4 meses de edad presentan la pubertad, es decir cuando el macho es capaz de aparearse y liberar un eyaculado fértil. En este momento empiezan a liberar andrógenos, y por lo tanto comienza la producción de espermatozoides en los testículos (**González-Reyna et al., 1991**). El tiempo necesario para completar un ciclo en el túbulo seminífero es de 10.4 d, mientras que la espermatogénesis tarda 49 días (**Sorensen, 1986**). Posteriormente llegan a la madurez sexual entre 6y 12 meses después del nacimiento. Aunque solamente son considerados en sí adultos cuando llegan a los 2 años de edad. Un reproductor puede actuar activamente como donador de semen hasta los 7 u 8 años de edad (**Ferreira y Pérez, 2001**). El semen está formado por plasma seminal donde se encuentran ácido cítrico, fosfolípidos, fructosa, gliceril-fosforilcolina, inositol, prostaglandinas, proteínas y sorbitol, y espermatozoides (**Evans y Maxwell 1990**).

CUADRO 1. CARACTERISTICAS DEL EYACULADO OVINO.

PARAMETRO	INDICE
Volumen del eyaculado (ml)	0,5-2,0
Consistencia del eyaculado	Cremosa
Color	Marfil
Concentración de espermatozoides (en 10^6 /mm ³)	2,0-5,0
Concentración total (en 10^9)	1,0-5,0
Cantidad mínima para la I. A. por medio de laparoscopia (en millones)	10-50
Concentración mínima para I.A. intracervical (en millones)	40-100

Fuente: **G. Palma, 2008**

4. Valoración del semen

Los eyaculados varían en sus características y calidad biológica, no solo entre las razas de los sementales, sino también entre la misma raza y aún más, en un mismo individuo. Por tanto, en los Centros de Inseminación Artificial (I.A.), sólo se procesan los mejores eyaculados, los que reúnen las características y criterios biológicos y que ofrecen la garantía de cierto grado de eficiencia en su utilización (**Montes, 2007**)

En la evaluación de las características seminales, pre-congelación y post-congelación, se emplean diferentes técnicas que facilitan el examen microscópico subjetivo y objetivo lo cual requiere de personal especializado.

El examen subjetivo, trae consigo errores, que se minimizaran en la medida en que los técnicos tengan experiencia en el trabajo que realizan, que el protocolo de trabajo sea el adecuado, que el personal sea lo más estable posible y que los métodos que se empleen, estén estandarizados (**Montes, 2007**). Al asegurar que todos estos aspectos se cumplan, no solo se minimizan las posibilidades de errores, sino que también se logran resultados más uniformes y reales.

Actualmente, el análisis seminal clásico ha mejorado mediante la introducción de nuevas técnicas analíticas procedentes de otros campos de la investigación científica. Así, el estudio de la motilidad espermática, la concentración espermática y las anomalías morfológicas que anteriormente se hacían de manera subjetiva, pueden realizarse hoy en día mediante el uso de

métodos computarizados de análisis. La incorporación de estos métodos informáticos atenúa en gran parte el factor subjetivo del análisis seminal y garantiza una mejor correlación con la capacidad fecundante del espermatozoide.

La evaluación del semen para su congelación es una condición indispensable para estimar su posible capacidad fertilizante después de la descongelación y en consecuencia determinar su aptitud para la congelación. Esta evaluación permite determinar además impurezas en el eyaculado, que puede hacerlo no apto para su congelación. El espermiograma es el conjunto de pruebas de laboratorio encaminadas a evaluar la capacidad fertilizante potencial de una muestra de semen y, por tanto, valorar la calidad de un eyaculado y la funcionalidad del semental como reproductor.

El método más preciso para valorar la calidad del esperma es estimar el porcentaje de gestaciones y producción de descendencia viable tras una monta natural o inseminación artificial. Sin embargo, esta valoración de la fertilidad in vivo requiere desarrollar ensayos de campo que suponen un importante consumo de tiempo y mano de obra, por esto, habitualmente se recurre al espermiograma para evaluar in vitro una serie de parámetros espermáticos relacionados con la fertilidad.

En cambio, el principal inconveniente que encuentran los laboratorios en la evaluación de una muestra seminal es determinar qué parámetros seminales nos proporcionarían una mayor información de la muestra, en base a su

correlación con la fertilidad. Asimismo, existe la necesidad de usar varias técnicas en la valoración de la calidad seminal, debido a la inexistencia de una única prueba que determine con exactitud la capacidad fecundante del espermatozoide, función biológica extremadamente compleja e influenciada además por multitud de factores externos. Además, la detección de diferentes grados de sub-fertilidad en caballos es compleja porque algunos de estos individuos sub-fértiles muestran parámetros seminales dentro de los límites normales para la especie.

4.1. Factores que influyen en la valoración del esperma

Independientemente de la razón por la que una muestra seminal va a ser evaluada debemos controlar una serie de factores que pueden modificar los resultados obtenidos en nuestra valoración. Entre ellos destacamos:

4.1.1. Factores externos al análisis

- 👉 Estación del año: en general en épocas de máxima temperatura la calidad del eyaculado reduce al disminuir la eficacia espermatogénica
- 👉 Edad.
- 👉 Actividad sexual: la calidad seminal mejora cuando la actividad sexual aumenta
- 👉 Alimentación: estados carenciales disminuyen la calidad seminal
- 👉 Terapia hormonal (progesterona y esteroides anabolizantes) y no hormonal (corticoides fundamentalmente): debemos procurar no

administrar ningún fármaco entre 7 y 10 días antes de la recogida de esperma

- ☞ Frecuencia de eyaculación: la sobreutilización de los machos disminuirá la calidad seminal
- ☞ Métodos de recogida distintos proporcionan eyaculados de características diferentes
- ☞ Tiempo transcurrido entre la recogida y valoración.

4.1.2. Factores intrínsecos del análisis

- ☞ Diluyente empleado para la valoración del esperma y temperatura de análisis, recomendándose el uso de temperatura de entre +35° y 38°C
- ☞ Experiencia del técnico sobre todo ante valoraciones subjetivas
- ☞ Técnica de valoración empleada para la evaluación de un determinado parámetro espermático, como por ejemplo las diferencias encontradas entre las distintas técnicas de tinción usadas para el estudio morfológico y morfo-métrico del espermatozoide equino (**Hidalgo y col., 2005**).

4.2. Análisis físico

El volumen varía de 0.5 a 2 ml (**Ferreira y Pérez, 2001**). El color normal puede ir de un blanco lechoso hasta un blanco cremoso (**López, 1999 y Hafez, 2000**). (Figura II) El semen con aspecto de “requesón” es indicativo de

infección en el aparato reproductor del macho (**Hafez, 2000**). Una coloración rosa o rojiza muestran la presencia de sangre y un color amarillo es el color característico de la contaminación del semen con orina (**Evans y Maxwell, 1990**).



Figura 2. Evaluación física del eyaculado

Foto: R. De León, 2008

4.3. Análisis microscópico

4.3.1. Concentración espermática

Se define *concentración espermática* a la cantidad de espermatozoides que se encuentran en una unidad de volumen determinado.

Las características del semen varían entre especies, en los ovinos los parámetros seminales normales son los siguientes: concentración espermática, indica la cantidad de espermatozoides por ml de semen, existen de 3,500 a 6,000 millones de espermatozoides por ml (**Evans y Maxwell, 1990 y Hafez, 2000**). La determinación de este valor es importante, en combinación

con el volumen se determinan cuantas hembras se podrían inseminar (**Hafez, 2000**). El volumen varía de 0.5 a 2 ml (**Ferreira y Pérez, 2001**).

Existen 3 métodos de evaluación de la concentración de semen

- ☞ Por medio de la apariencia y consistencia del eyaculado. este método de evaluación subjetiva requiere experiencia.

CUADRO 2. ESTIMACION DE LA CONCENTRACION ESPERMATICA DE ACUERDO A LA APARIENCIA Y CONSISTENCIA DEL EYACULADO, (Fuente: G. Palma, 2008)

CONSISTENCIA-APARIENCIA	VOLUMEN (cc)	CONCENTRACION (x 10 ⁹ /cc) Rango
Clara-acuosa	0.2	0.1-0.3
Opaca	0.7	0.3-1.0
Lechosa	2.0	1.0-2.5
Lechosa - cremosa	3.0	2.5 - 3.5
Cremosa	4.0	3.0 - 4.5
Cremosa espesa	5.0	4.5 - 5.5

- ☞ Determinación por medio del método espectro-foto-colorimétrico.

El espectrofotómetro mide la densidad espermática por dificultad que ofrece la suspensión de espermatozoides en una solución que los inmoviliza (por ej. formol citrato) al pasaje de los haces de luz. El aparato está acompañado de una tabla, confeccionada a partir de la curva de turbidez y de la espermática, medida en una cámara cuenta glóbulos. El valor indicado en la tabla en la tabla es expresado x10⁶/mm³.

- ☞ Determinación de la concentración en la cámara cuenta glóbulos (hemo-citómetro).

Existen diferentes tipos de cámaras para el recuento de espermatozoides. Todas fueron desarrolladas para el recuento hemocitométrico: Neubauer, Thoma, Thomaneu, Bürker, Dürner-Türk/Türk, Fuchs-Rosenthal. Las más conocidas para la determinación del número de espermatozoides son la de Neubauer y Thoma (Thomaneu).

El principio de la determinación de la concentración espermática está establecido por el recuento de los espermatozoides de una muestra de semen diluido bajo condiciones estandarizadas. El mismo tiene en cuenta la superficie y la altura de la cámara como así también el grado de dilución al que se sometió la muestra de semen.

De una dosis de semen se toma una muestra que se diluye en agua destilada en una relación 1:20 (por ejemplo, 50µl de semen + 950µl de agua destilada). Después de la homogeneización durante 5 segundos en un agitador mecánico o en forma manual, se coloca una muestra de la dilución en cada hemicámara. El recuento se lleva a cabo en un microscopio a 400x.

El recuento y cálculo de la concentración de espermatozoides difiere según el tipo de cámara empleado. Existen en el mercado varios tipos de hemocitómetros, razón por la cual se darán las indicaciones con un tipo de cámara variando el cálculo según las instrucciones de uso de cada cámara (i. e. altura de la cámara y superficie total)

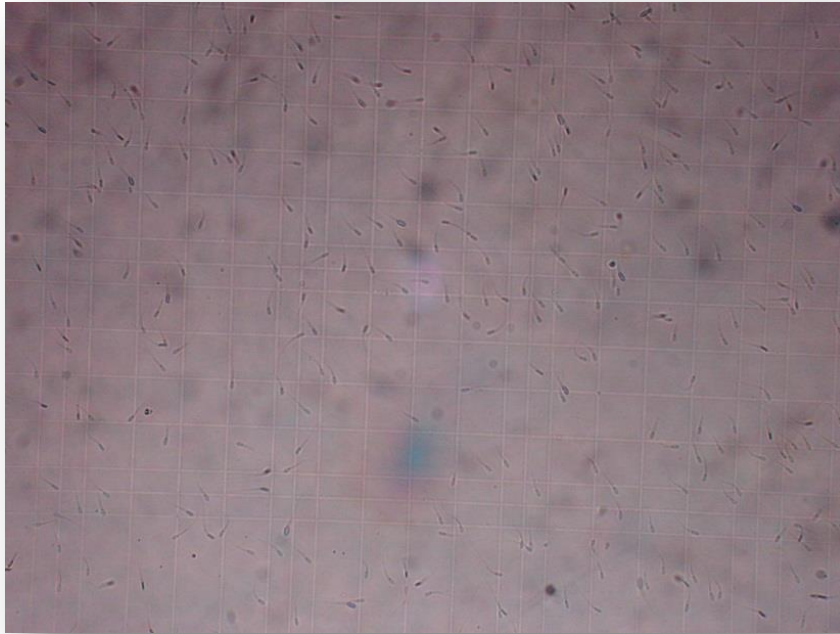


Figura 3. Determinación de la concentración espermática mediante la cámara de Neubauer.

Foto: R. De León, 2007

4.3.1.1. Error de medición de la cámara

La determinación de la concentración espermática por medio de estas cámaras tiene un considerable error que varía en relación directa con la reducción de la superficie considerada en el recuento. El error aumenta con la concentración de la muestra (eyaculado 7 a 10%). Si además se emplean cubreobjetos no calibrados éste puede ser mayor aún.

La cámara tiene, bajo competentes condiciones de uso y con personal experimentado, una alta repetibilidad ($r^2=98.9$). Posteriores estudios indicaron que la variación podía ser significativamente menor (Coeficiente de variación, CV= 12,3), indicando que la exactitud de la determinación varía con los laboratorios y el personal.

4.3.1.2. Cubre cámaras calibradas

Se diferencian de los portaobjetos comunes por sus superficies planas y pulidas. La tolerancia de los mismos es de 3µm (Brand, Alemania). El tamaño recomendado para las cámaras tratadas es de 20 X 26 X 0,4 mm. Su empleo evita uno de los factores de variabilidad

4.3.2. Motilidad espermática

Otro parámetro importante a considerar en el semen ovino es la motilidad espermática, esta se divide en dos: motilidad masal y motilidad progresiva. La determinación del tipo y grado de movimiento de los espermatozoides, es evidentemente de importancia práctica.

El movimiento de los espermatozoides por sí solo, no basta para probar con certeza la conservación de la capacidad fecundante. Un estado de inmovilidad irreversible es sin embargo, expresión de muerte; mientras que sin llegar a este extremo, la comprobación de una cinética o motilidad alterada, con numerosos espermatozoides inmóviles o escasamente móviles, predispone a una reducida o nula capacidad fecundante.

4.3.2.1. Motilidad masal

La motilidad masal, es el porcentaje de células móviles o vivas (**Sorensen, 1986**) y se puede clasificar en una escala de 0 a 5, la cual se muestra en el Cuadro1 (**Evans y Maxwell; 1990**). Las muestras que presentan una

clasificación de 4 o 5 son aquellas que pueden ser usadas para congelación e inseminación artificial (**Maxwell et al., 1994**).

4.3.2.2. Motilidad individual

La motilidad progresiva es la capacidad del espermatozoide para moverse hacia delante y en línea recta. Su clasificación puede ser por dos diferentes metodologías: la primera, es en una escala de 1 a 4 donde, 1 = Todos muertos o sin movimiento, 2 = Movimiento lento progresivo, 3 = Movimiento progresivo moderado y 4 = Movimiento rápido progresivo. Al igual que la motilidad masal, los valores más altos son los que se emplean para procesamiento de la muestra (**López, 1999**). La segunda metodología, es por medio de evaluación visual de una gota de semen al microscopio con el objetivo 40 X, de manera que se puedan observar las células espermáticas en forma individual (**Evans y Maxwell, 1990**).

Esta una técnica de evaluación subjetiva, que permite identificar el movimiento individual de los espermatozoides, luego de la dilución. Su comprobada relación con la fertilidad de los machos la constituye en un método práctico de valor en la evaluación del semen diluido, particularmente antes pero también después de la congelación. La correcta evaluación requiere de experiencia. Para el observador inexperto puede resultar difícil determinar, en un golpe de vista si en una gota con 100-200 espermatozoides, si se mueven en forma progresiva 50% - 70% u 80%, y qué porcentaje se mueve en su lugar o no lo hace.

4.3.3. Estado del acrosoma

El acrosoma juega un papel fundamental en la fecundación y esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con un borde apical, la zona post-acrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Las muestras seminales con alta proporción de acrosomas alterados o ausentes suelen tener una fertilidad baja.

Para determinar el estado del acrosoma se han usado desde hace mucho tiempo diferentes tinciones. Entre éstas tenemos la tinción de eosina/verde rápido, Giemsa y la de eosina/nigrosina, las dobles y triples tinciones, basadas en la combinación del azul tripán con otros colorantes y tinciones comerciales como el Spermac®.

Recientemente, se han utilizado anticuerpos acrosomales específicos marcados con fluorescencia. En el caso de los espermatozoides bovinos, su tamaño permite poder valorarlos mediante un microscopio óptico de contraste de fases con un objetivo de gran aumento.

La determinación de los espermatozoides vivos en el momento de preparar el extendido, se realiza mediante la prueba de absorción de colorantes. Dado

que los espermatozoides inmóviles pueden estar vivos, solo una coloración supravital de eosina nigrosina puede establecer esa diferencia.

Esta prueba denominada *vivos y muertos*, coloración vital o supravital, debe llevarse a cabo en el intervalo de 1 minuto y se basa en el hecho de que los espermatozoides muertos o en proceso de muerte, poseen sus membranas permeables a los colorantes. (Figura IV). Por tal razón se emplea esta propiedad para la determinación de los espermatozoides vivos.

Esta prueba es un complemento en la evaluación de la motilidad o más bien de la viabilidad y nos define el estado físico de la membrana espermática, lo que puede ser determinado al emplear la técnica de tinción *Eosina/Nigrosina*, una de las técnicas más corrientemente usada.

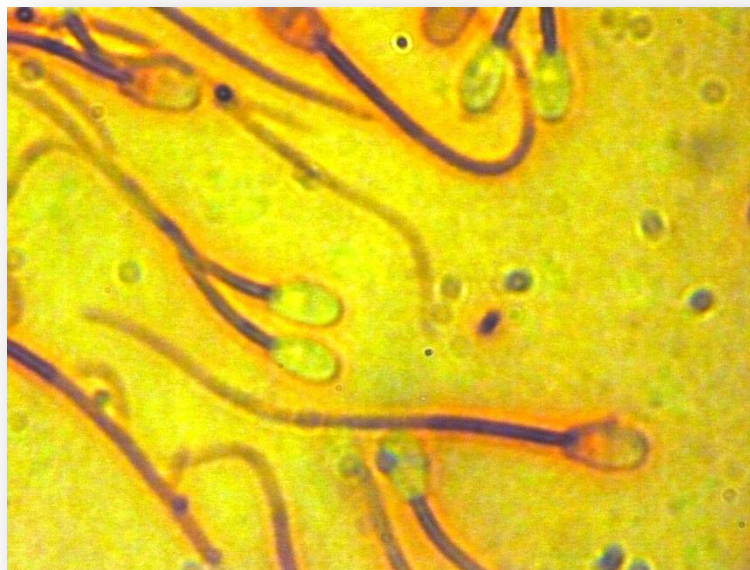


Figura 4. Determinación del estado del acrosoma de los espermios mediante la tinción eosina/nigrosina.

4.3.4. Morfología espermática

El análisis morfológico de los espermatozoides es uno de los principales componentes de la evaluación de las características de una muestra seminal. La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que haya entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad in vivo de los toros.

Atendiendo a una clasificación estrictamente morfológica, las anomalías que puedan generarse se clasifican en anomalías en la cabeza, en el tracto intermedio y en la cola. Según el órgano donde pueden haberse generado diferenciamos las anomalías primarias y secundarias.

Esta evaluación de la morfología espermática puede ser utilizada para eliminar sementales con pobre calidad seminal y refleja la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias, por lo que siempre deben estar incluidas en las pruebas de evaluación espermática.

En sentido general, el semen seleccionado para ser congelado posee un porcentaje de anomalías espermáticas mínimo (menos del 20 % de patologías totales), no obstante, es aceptable realizar este examen, ya que el semen congelado puede estar sometido a factores estresantes y sufrir alteraciones que pueden ser causantes de una baja capacidad fecundante. Sin embargo,

es importante aclarar que al llevar acabo las extensiones, se pueden provocar cambios morfológicos en los espermatozoides, tales como desprendimiento del capuchón, de la cabeza y doblamiento de la cola, por la colocación y presión del cubre-objeto sobre el portaobjeto y arrastre de la gota de semen, incorrectamente.

Para el estudio de la morfología de las células espermáticas, existen una serie de métodos que han sido descritos en los libros de textos que tratan sobre el tema de la inseminación artificial, reproducción y biología de la reproducción.

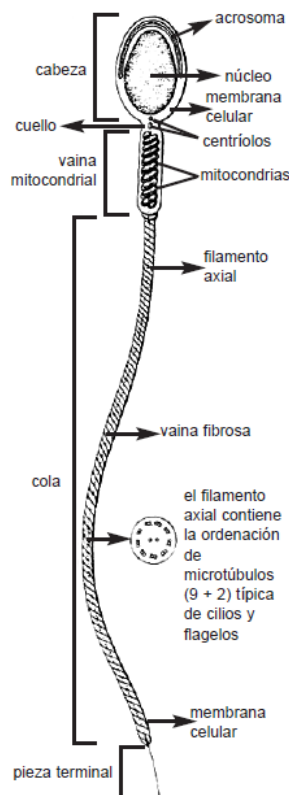


Figura 5. Estructura del espermatozoide.

Fuente: Hidalgo *et al.*

En lo que respecta a la morfología, la proporción de espermatozoides anormales no debe sobrepasar de 15%, si se excede de este porcentaje el semen no es de buena calidad y no puede ser utilizado en ningún proceso biotecnológico (Evans y Maxwell, 1990 y Ferreira y Pérez, 2001). López (1999) indica que más del 20 % de anormales refleja la presencia de un animal infértil, debido a que los espermatozoides anormales pierden la capacidad de fecundar a la hembra.

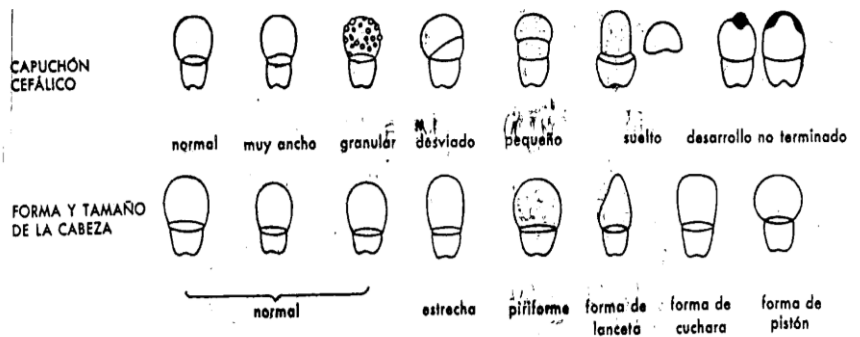


Figura 6. Anomalías de la cabeza del espermatozoide.

Fuente: Montes, 2007.

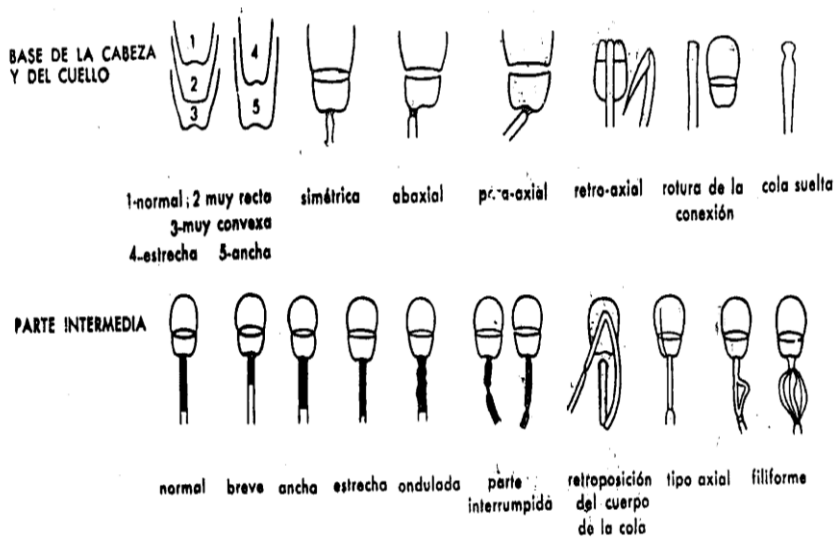


Figura 7. Anomalías del cuello y la parte media del espermatozoide.

Fuente: Montes, 2007.

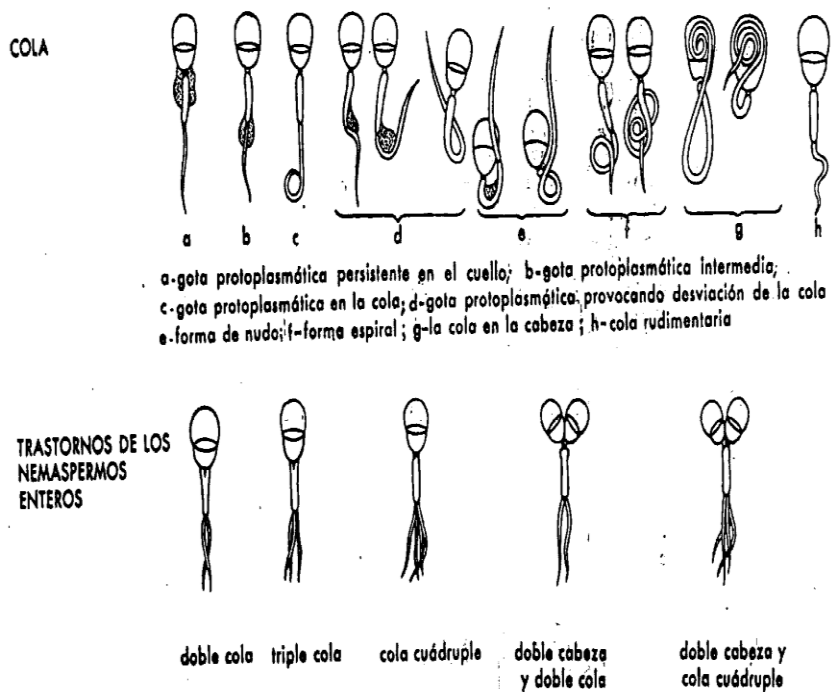


Figura 8. Anomalías de la cola y trastornos del espermatozoide.

Fuente: Montes, 2007.

Todos estos parámetros pueden variar dependiendo de la edad, alimentación, manejo del animal y de la muestra colectada, frecuencia de colección, estrés, temperatura, estación del año, condición corporal entre otros (**Evans y Maxwell, 1990**).

El diámetro testicular está relacionado con la concentración espermática y ambos se ven afectados o beneficiados dependiendo de la edad y el estado nutricional del animal, ya que animales extremadamente delgados u obesos presentan problemas reproductivos (**Fernández y Villegas, 1995**). Otro valor influenciado por el estado nutricional es el volumen, ya que la desnutrición afecta a los testículos, disminuyendo la producción de semen (**Thwaites,**

1995), y si a esto se le adiciona la frecuencia de colección, edad y mal manejo, dicho parámetro disminuye todavía más (**Fernández y Villegas, 1995**).

5. Aspectos generales de la crio-conservación de semen

Distintos investigadores (**Corteel, 1992, Huang *et al.* 1997, Maxwell *et al.* 1997, Pellicer *et al.* 1994 y 1997, Ritar y Salamon, 1982**) coinciden en que el plasma seminal no constituye el medio adecuado para mantener la viabilidad espermática post-eyaculación, razón por la cual la crio-conservación se presenta como una alternativa.

El objetivo de la crio-conservación del semen es interrumpir el metabolismo celular por un tiempo determinado, con lo cual los espermatozoides se mantienen en una *anabiosis artificial* (**Gorlach, 1999**) con el propósito de conservar material genético valioso sin importar la época del año, distancia y lugar donde se encuentre la hembra o el semental (**Zarco y Boeta, 2000**).

Los principios de crio-conservación son iguales para todas las células vivas, siendo el aspecto más importante la eliminación del agua del interior de la célula antes de congelar (**Gordon, 1999**). En el caso del semen, el procedimiento involucra una serie de pasos: dilución, crio-protección, refrigeración o congelamiento, almacenamiento y descongelado, aspectos

estos que pueden afectar la estructura y función de los espermatozoides (**Hammerstedt et al., 1990**); teniendo en cuenta que el momento crítico del procedimiento es al inicio de la congelación y al momento del descongelado, ya que es este momento donde se presentan un sinnúmero de procesos físico-químicos influenciados por las diferencias de temperatura y transporte de agua entre las células y el medio (**Gorlach, 1999**).

Una vez colectado el semen, es diluido en un medio apropiado, normalmente basado en yema de huevo o leche (**Bailey et al., 2000**). **Maxwell y Jonhson (1999)**, señalan que el alto nivel de dilución produce un fenómeno llamado “*efecto de dilución*” que reduce las funciones del espermatozoide lo cual puede deberse a una reducción del contacto entre los espermatozoides y los componentes del tracto reproductor del macho (**Garner et al., 2001**).

Tradicionalmente, la dilución del semen se ha hecho a temperatura corporal (entre los 30° y los 39° C), para posteriormente refrigerarlo a 5° C y luego agregarle un crio-protector. La adición del crio-protector, comúnmente glicerol para semen de mamífero, es esencial para la supervivencia de la célula durante la crio-conservación y su eficacia es parcialmente debida al efecto osmótico marcado, pero transitorio, que produce rápidos cambios en el volumen celular, lo cual no parece perjudicar la función del espermatozoide (**Liu y Floote, 1998**). Por lo tanto, el glicerol actúa directamente sobre la membrana plasmática del espermatozoide, posiblemente para reducir algunas

de las fases de transición e incrementa la fluidez de la membrana durante la refrigeración (**Noileset al., 1995**).

En mamíferos, los protocolos óptimos de crio-conservación de semen parecen ser capaces de mantener el 50% de los espermatozoides vivos; sin embargo, estudios recientes sobre congelamiento de semen mencionan que los espermatozoides al congelarse y descongelarse se ven alterados en sus propiedades estructurales de la membrana plasmática, lo cual se asemeja a un estado de capacitación prematura y reacción acrosomal (RA) que puede resultar en bajas tasas de preñez (**Watson, 1995**).

6. Dilución del semen

La finalidad de diluir el semen es aumentar el volumen del eyaculado y facilitar la preservación de la viabilidad del espermatozoide por un tiempo mayor. Un diluyente eficiente mantiene o mejora el medio que rodea al esperma suministrándole energía y protección contra productos del metabolismo y variaciones de temperatura (**Gordon, 1997**). En tal sentido, la crio-conservación del semen a través del empleo de dilutores con diferentes componentes hace realidad la perpetuación de las características deseables, aun posterior a la muerte o sacrificio de los reproductores seleccionados (**Aisen et al., 1995**).

Con el fin de evitar el daño durante el proceso de congelamiento, se han desarrollado numerosos diluyentes en base a amortiguadores de pH (tris, ácido cítrico), azúcares de bajo peso molecular (fructuosa, glucosa) que pasan a través de la membrana celular sirviendo como fuente de energía para el esperma, agentes protectores de membrana (yema de huevo, leche descremada) que contienen macromoléculas que proveen protección contra el shock por frío, y crio-protectores (glicerol y otros polialcoholes, aminoácidos) que reducen la formación intracelular de cristales de hielo durante el proceso de congelado- descongelado (**Molinia et al., 1994; Salamon y Maxwell, 1995**).

6.1. Razones de la dilución del semen

La dilución del semen del semen se realiza por dos razones principales;

6.1.1. Técnicas

Una de las mayores ventajas de la aplicación de la técnica de inseminación artificial (IA) es el aprovechamiento de sementales de alto valor genético, los cuales pueden ser utilizados para cubrir un mayor número de hembras, que si se usaran en monta natural.

En la monta natural, el carnero deposita millones de espermatozoides en la vagina de la hembra, sin embargo, de ese número, solo entre 100 y 140 millones logran atravesar el cérvix. Cuando se utiliza ala IA en ovejas, tanto el

número de espermatozoides, como el volumen a utilizar se reducen considerablemente con respecto a la monta natural.

De acuerdo a **Bearden y Fuquay, (1982); Salamon, (1990); Mejía y Hernández, (1996)** el límite inferior aceptado para que ocurra una fertilización es de 100 millones de espermios/dosis, mientras que el volumen por dosis está entre los 0.05 y los 0.5cc. Disminuir el volumen de la dosis por debajo de los 0.05cc no resulta práctico debido a la dificultad en depositar cantidades tan pequeñas en el cérvix o útero de la oveja. Si se utiliza el semen sin diluir, el volumen contendría un número mayor de espermatozoides, superior al límite mínimo, lo que resultaría en un método poco económico. Reducir el número de espermatozoides a la dosis requerida manteniendo el volumen adecuado, solo se puede lograr a través de la dilución adecuada del eyaculado.

6.1.2. Razones biológicas

La principal razón es que los diluyentes apropiados proporcionan a los espermatozoides nutrientes, un sistema amortiguador a los cambios de pH y un ambiente isotónico, además de proteger al espermio del shock térmico cuando se enfrían o cuando se congelan (**Bearden y Fuquay, 1982; Salamon, 1990; Mejía y Hernández, 1996; Evans y Maxwell, 1990**).

6.1.3. Procedimiento para la dilución

La dilución debe realizarse lo tan pronto como se pueda, una vez colectado y analizado el eyaculado de manera rutinaria. Tanto el semen como el diluyente debes colocarse en un baño maria a 30° C para que al momento de la dilución ambos tengan la misma temperatura y evitar shock térmico (**Bearden y Fuquay, 1982; Salamon, 1990; Mejía y Hernández, 1996**). Un diluyente frio puede ocasionar shock por frio con la consiguiente reducción de la fertilidad.

Para realizar la dilución se deben utilizar pipetas estériles y secas debidamente calibradas. La dilución se realizara pipeteando la cantidad adecuada y adicionándola lentamente al semen. No agregando el seme al diluyente ya que esto puede alterar a los espermios aumentando su mortalidad. Una vez diluido el semen se toma una muestra y se observa la microscopio para comprobar la motilidad y la mortalidad de los espermatozoides

7. Concepto de diluyente

De acuerdo a **Gadea (2003)** se entiende por diluyente a una sustancia acuosa que nos permite aumentar el volumen de un eyaculado, preservar las características funcionales de los espermatozoides y mantener el nivel de fertilidad adecuado.

En la actualidad contamos con diluyentes que nos permiten la crioconservación de semen congelado a -196°C , en nitrógeno líquido, y otros que nos permiten conservarlo en hielo seco a -79°C (**Sorensen, 1984**). Estos son utilizados como una forma de proteger a los espermatozoides de la formación de cristales de hielo intracelular, que se dan durante el proceso de congelación, y que afectan la estructura físico-química de la célula causando daño en la membrana, en el acrosoma y en el metabolismo (**Alberti, 2004; Cole, 1984; Galina, 1995**)

8. Características del diluyente

Para que un diluyente sea completo y eficiente debe estar compuesto por sustancias iónicas y no iónicas que mantengan la osmolaridad, lipoproteínas de peso molecular alto que prevengan los shocks, además de un agente crioprotector intracelular, además de una fuente de energía y otros aditivos y antibióticos.

De acuerdo a **Bearden (1982)**, otras características que deben tener los diluyentes son los que a continuación se detallan;

- ☞ Deben ser isotónicos al semen (tener la misma concentración de iones libres)
- ☞ Capacidad amortiguadora (evitar cambios de pH al neutralizar ácidos producidos por el metabolismo de los espermatozoides).

- 👉 Proteger a los espermatozoides de las lesiones producidas por el shock térmico, especialmente en el acrosoma.
- 👉 Proporcionar nutrientes para el metabolismo de los espermatozoides.
- 👉 Controlar contaminantes microbianos.
- 👉 Debe preservar la vida de los espermatozoides con un mínimo de efecto sobre la fertilidad.

Además de estas características, los diluyentes deben ser estables, de fácil preparación y económicos (**Salisbury, 1982**)

9. Generalidades de los diluyentes

La gran mayoría de los diluyentes disponibles en el mercado y que se usan para la congelación de semen ovino, fueron desarrollados para su uso en semen bovino y los pocos específicos con que se cuentan, limitan su uso para semen fresco (**Aguirre, 2006**).

Anteriormente se pensaba que los diluyentes eran los responsables de las bajas tasas de fertilidad que se lograban, pero actualmente, con el uso de nuevas técnicas de IA se han logrado mejorar la fertilidad, sobre todo con el uso de la IA intrauterina por endoscopia, lo cual demostró que la baja fertilidad no se debía a los diluyentes (**Tron y Arbiza, 2004**), sino a las dificultades que

tienen los espermatozoides para atravesar el tracto femenino y a las alteraciones que sufren durante el proceso de congelación.

Para la crio-conservación del semen ovino se pueden utilizar diversos compuestos, pero solo con algunos de ellos se han logrado parámetros aceptables, como con la leche descremada y la yema de huevo.

En el caso de la yema de huevo, esta se viene utilizando desde hace varias décadas, sin embargo, lo único que se conoce es que su adición mejora la fertilidad del semen, pero también se han encontrado actividades de tipo enzimático potencialmente dañinas para los espermios (**Phillips, 1940**)

De acuerdo a **Palacios (1994)** se supone que la acción de las lipoproteínas de la yema de huevo o de la leche descremada en los diluyentes, así como de los crio-protectores como el dimetil-sulfoxido (DMSO) y el glicerol, es el de reducir el número de poros en la membrana del espermatozoide y también de las funciones de ATP-dependientes así mismo la agregación proteínica y una reducción en la formación de bloques lipídicos.

El problema de estos crio-protectores es que también producen toxicidad y esta toxicidad disminuye la concentración de otros aditivos que se pueden utilizar reduciendo la eficiencia de los mismos.

Recientemente se han realizado investigaciones en las que se utilizan alternativas proteínicas dentro de los diluyentes como albumina sérica bovina (BSA), suero equino, suero bovino, proteína de soya, calostro, alcohol

polivinílico, entre otros, que remplazan la yema de huevo proveyendo la oportunidad de realizar estudios de semen diluido con mejor visibilidad en el microscopio (**Palacios, 1994**)

10. Tipos de diluyentes

Los diluyentes para semen van a estar en dependencia del tipo de crio-conservación que se vaya a practicar. Así tenemos entonces:

10.1. Diluyentes para semen refrigerado

De acuerdo a **Alberti (2004)**, estas son soluciones amortiguadoras tipo acuosa a las que se les agrega un crio-protector no penetrante. Este diluyente debe prepararse poco antes de la recolección del semen y enfriado a 4°C y tiene un periodo útil de 2 a 3 días (**Galina, 1955**) y los de mayor uso son los preparados a base de leche.

La leche ha sido utilizada como parte de los diluyentes por su capacidad de mantener la fertilidad de 14 a 16 horas a 15°C con una tasa de pariciones entre el 65 y el 75% (**Tron y Arbiza, 1994**).

De acuerdo a estos autores, para la preparación de diluyentes a base de leche, según publicaciones de **Salomón y col. (1994)**, se recomienda utilizar leche reconstituida, isotónica y descremada y calentarla antes de utilizarla ya que contiene la proteína *lactenina* que es lesiva para los espermatozoides,

aunque también se ha determinado que la *caseína* es la responsable de la protección contra el shock frío.

Otros diluyentes para semen fresco están basados en el uso de yema de huevo, los cuales, para ser usados deben ser frescos no habiendo transcurrido más de cuatro días desde su postura.

La yema de huevo, como diluyente de semen ovino y caprino, debe ser utilizada en menores concentraciones que en otras especies debidos a que la fosfolipasa A en presencia de calcio puede hidrolizar la lecitinas de la yema de huevo en ácidos grasos libres y lisolicetinas, lo cual resulta tóxico para los espermatozoides (**Mateo, 1990; Evans y Maxwell, 1990**), aunque para algunos autores (**Palomino et al. 2001; Cole, 1984**) los mejores resultados en cuanto a diluyentes para semen refrigerado, se han obtenido utilizando la yema de huevo como diluyente, por la cantidad de fosfolípidos, lecitinas, lipoproteínas y cefalinas, sustancias que parecen tener una mayor acción protectora cuando se compara con los diluyentes a base de leche. Por otra parte, trabajos realizados por **Pérez (1996)** han demostrado que una fracción proteica del plasma seminal (BUIII) procedente de las glándula bulboretreales produce reacciones desfavorables con la leche utilizada en los dilutores.

Algunas formulaciones de diluyentes a base de yema de huevo se presentan a continuación:

CUADRO 3. FORMULACIÓN DE DILUYENTE UTILIZANDO YEMA DE HUEVO.

INGREDIENTE	CANTIDAD REQUERIDA
Tris	3.60gr.
Fructuosa	0.50 gr.
Ácido Cítrico	1.99 gr.
Yema de huevo	14.00 cc.
Agua destilada	100.00cc.

Según **El Gaafary (1990)** el uso de tris/acido cítrico/fructuosa proporciona mejores resultados que diluyentes que utilizan rafinosa/lactosa ya que en evaluaciones microscópicas se observa una mayor integridad acrosómica al igual que mejor motilidad de los espermatozoides.

Otra alternativa para diluir el semen lo es el agua de coco (**Nunes, 1993**), ya que al estar libre de fosfolípidos se considera un diluyente favorable. El agua de coco esta compuesta por aminoácidos, azucares, vitaminas y vitaminas, con una osmolaridad, en la fase inicial de maduración, entre 500 miliosmoles y un pH de 4.5. Además, del agua de coco se ha logrado separar el acido 3-Indol-Acético (pertenecientes al grupo de las auxinas), el cual ha demostrado su actividad sobre el metabolismo de los espermatozoides, por lo que ha sido incorporado en los diluyentes convencionales.

En trabajos realizados por **Gutiérrez et al. (2006)** al comparar diluyentes a base acido cítrico con las mismas proporciones de agua de coco y leche, se

han encontrado resultados similares con las proporciones 20:60 ácido cítrico/agua de coco que la proporción 10:70 ácido cítrico/leche.

En trabajos recientes, se agregó gelatina a un diluyente a base de leche para hacer un medio semi-sólido lo cual resultó en dos efectos positivos:

- ☞ Se redujo la sedimentación celular con la consecuente reducción de los cambios en las características del medio (**Nagy y Kóvacs, 2002**)
- ☞ Se produjo la inmovilización de los espermatozoides disminuyendo su agotamiento metabólico y preservando su potencial fecundante (**López y col. 2005**).

Este semen se conservó a 15°C y luego se utilizó para la fertilización *in vitro* de ovocitos madurados *in vitro*, lográndose una tasa de fertilización con el semen tratado con este medio de 51.82%, mientras que con muestra no tratada se logró el 37.26% de fertilización (**Yañiz, et al. 2005**).

10.2. Diluyentes para semen congelado

A diferencia de los diluyentes para semen refrigerado, el diluyente para semen congelado utiliza un crioprotector penetrante o anti-congelante (**Sorensen, 1982**).

Los crio-protectores penetrantes son sustancias que, por su bajo peso molecular, pueden atravesar la membrana plasmática, donde tienen la función de evitar la formación intracelular de cristales de hielo, así como evitar la excesiva deshidratación causada por la congelación lenta (**Medeiros et al., 2002**).

Entre los más utilizados está el glicerol y el etilenglicol, siendo el primero el que ha mostrado mejores resultados en estudios de crio-preservación de semen ovino en relación a la motilidad progresiva post-descongelamiento (**Salamon y Maxwell, 2000**).

En ese sentido, la proporción de glicerol necesaria en el diluyente, para protección de los espermatozoides, va a estar en dependencia del método de congelación y de la composición y la tonicidad del diluyente. **Martínez (1994)**, indica que el uso de glicerol en diluyentes hipertónicos, resultan en un mayor porcentaje de motilidad espermática (22.3%) que cuando se agrega a diluyentes isotónicos (21.2%).

CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODO

1. LOCALIZACIÓN

El estudio se realizó en la Unidad Ovina de Estación Experimental Carlos Manuel Ortega del IDIAP, localizada en Gualaca, a 70 msnm entre los 8° 39'20" de latitud norte y los 82° 10'10" de longitud oeste. (Figura IX).

La zona se caracteriza por poseer un clima de bosque húmedo pre-montano con una temperatura anual promedio de 26° C, precipitación anual promedio de 3,500 mm y humedad relativa de 80%.



Figura 9. Fachada del edificio administrativo de la Estación Experimental de Gualaca.

2. Animales Experimentales

Para el estudio se utilizaron machos importados de la raza Dorper y Katahdin, machos de razas nativas como Pelibuey y machos F₁ (Dorper x Pelibuey). Todos ellos maduros sexualmente y utilizados como reproductores en los programas de mejoramiento genético que desarrolla la institución.



Figura 10. Macho de la raza Dorper utilizado para extracción de semen

3. Manejo de los animales

Los animales experimentales se mantenían pastoreando en praderas de *Brachiaria brizantha* cv. Híbrido Mulato y recibían una suplementación energético-proteica a base de maíz y harina de soya.

4. Metodología de muestreos

La metodología utilizada para obtener las muestras seminales y su posterior evaluación se detallan a continuación:

4.1. Colecta del semen

Se tomaron tres muestras seminales por semana, preferiblemente en horas de la mañana para evitar el estrés calórico de la tarde y siempre por la misma persona. Las colectas de semen se realizaron con vagina artificial (VA), ya que ofrece condiciones de presión y temperatura, semejante a las del salto natural, además de que el eyaculado se aproxima al obtenido en condiciones cercanas a las fisiológicas, mientras que para la excitación de los machos se utilizaron hembras en celo (Figura XI). Esta VA tenía ≈ 15 cm. de largo y ≈ 6 cm. de ancho y estaba revestida con un tubo interno de goma, al cual se conectó un tubo colector de plástico.



Figura 11. Machos excitados con hembras en celo durante las extracciones.

El tubo interno se lleno con agua a 40°C (\pm) 5°C de temperatura y luego se insufla con aire para dar la presión ideal. Como colector se utilizo un tubo de ensayo de plástico de 15cc graduado (Ver Figura XII). Para facilitar la colecta, la vagina se lubrico con crema neutra.

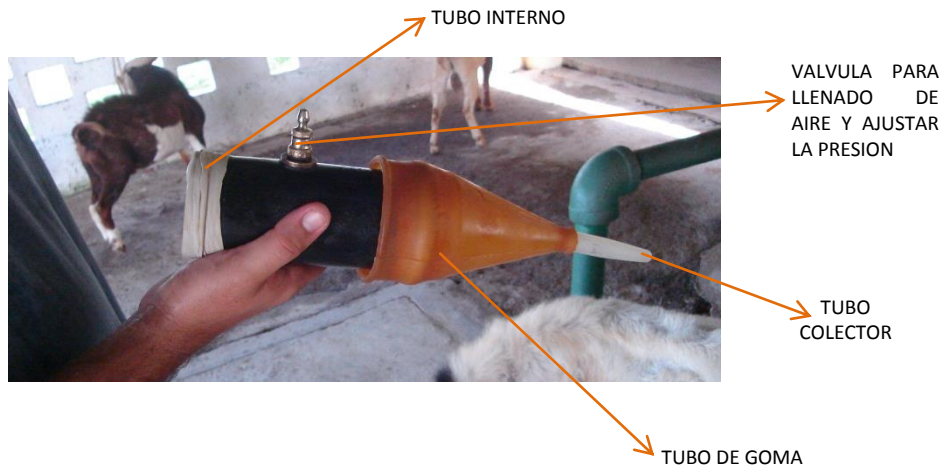


Figura 12. Partes de la vagina artificial utilizada en la colecta de semen



Figura 13. Llenado de la vagina con agua caliente



Figura 14. Verificación de la temperatura de la vagina artificial antes de la extracción.

4.2. Evaluación del semen

Inmediatamente obtenida la muestra se procedió a realizar las evaluaciones macroscópicas y microscópicas del eyaculado. Los parámetros al evaluados en cada una de las pruebas fueron las siguientes:



Figura 15. Momento de la obtención del eyaculado.

4.2.1. Evaluación macroscópica del semen

4.2.1.1. Color y olor

La evaluación del color y el olor fueron subjetivos, pero teniendo en cuenta que la tonalidad del semen de carnero es de un color blanco lechoso y el olor es característico. Cualquier anomalía en la muestra es indicativa de problemas con el eyaculado, por lo cual habría que descartarla.

4.2.1.2. Volumen

Para determinar el volumen del eyaculado se utilizó un tubo de ensayo de 15cc de plástico, graduado en centímetros en donde se hizo la lectura del volumen colectado.

4.2.1.3. Densidad

Esta prueba también es subjetiva, y, al igual que la colecta, siempre fue realizada por la misma persona para minimizar el error experimental. Esta evaluación recibe una puntuación de cero a cinco; en donde cinco corresponden al mayor grado de turbidez y cero el menor grado.

4.2.2. Características microscópicas

Las principales características microscópicas que se evaluaron fueron las siguientes;

4.2.3. Motilidad Masal

La prueba se realizó colocando una gota del eyaculado obtenido sobre un porta-objeto, el cual se mantuvo sobre una platina calentable para mantener una temperatura adecuada a los espermatozoides (Figura), y luego se observó al microscopio con un aumento de 40x. La motilidad la determinamos en base al movimiento y el oleaje observado. La prueba recibe una puntuación de 0 a 100, en donde cero corresponde ninguna motilidad y 100 se observan grandes oleajes producidos por el movimiento de los espermios.

4.2.4. Motilidad individual

La misma muestra obtenida para determinar la motilidad masal se observó con un aumento de 100x para determinar la motilidad individual y establecer el porcentaje del movimiento progresivo en la muestra examinada.



Figura 16. Muestra de semen colocada sobre una platina calentable para determinar la motilidad individual con un aumento de 100x

Bajo las condiciones antes señaladas, se pueden distinguir los siguientes tipos de movimientos:

- 👉 Movimiento progresivo o rectilíneo.
- 👉 Movimiento oscilatorio.
- 👉 Movimiento circular.
- 👉 Movimiento rotatorio.
- 👉 Movimiento de Zig-Zag.
- 👉 Movimiento vibratorio.
- 👉 Movimiento retroactivo.
- 👉 Sin movimiento.

4.2.5. Concentración Espermática

La concentración espermática se determino a través de un fotómetro SPERMA-CUE (MINITÜB Abfüll-undLabortechnikGmbH&Co. KG. Alemania) (Figura XVII). Para ello se calibro el equipo y, una vez calibrado, se coloco una gota de semen en una micro-cubeta para fotómetro (Figura XVIII) la cual se introdujo en la ranura para este fin y se cerró. Pasado unos segundos, la concentración fue determinada automáticamente y el resultado apareció en la pantalla digital.



Figura 17. Sperma-cue. Equipo utilizado para determinar la concentración espermática.

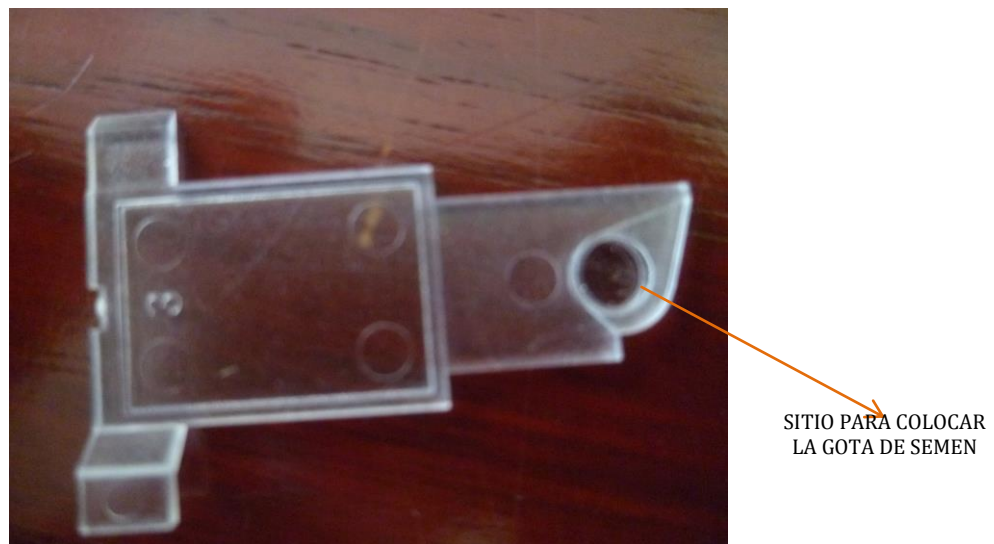


Figura 18. Micro-cubeta para fotómetro sperma-cue

4.2.6. Viabilidad Espermática (vivos y muertos)

Esta prueba denominada vivos y muertos o de coloración vital o supravital, se llevo a cabo en un intervalo de 1 minuto. Es un complemento en la evaluación de la motilidad o más bien de la viabilidad y define el estado físico de la membrana espermática, lo que se determina al emplear la técnica de tinción Eosina–Nigrosina, que es la técnica más usada.

A continuación el procedimiento para la determinación de la viabilidad espermática;

4.2.7. Preparación del colorante

(Eosina-Nigrosina)

Nigrosina	0.67 g.
Eosina	5.00 g.
Agua destilada	100.00 ml

Hervir, enfriar y filtrar. Este es una tinción de larga duración.

4.2.8. Procedimiento para la coloración y el conteo de vivos y muertos

Primeramente se deposito una gota de semen en un portaobjeto limpio y se le añaden de 1 a 2 gotas del colorante, el cual se mantuvo en baño de María a 38°C ó 39°C. Luego mezclamos el semen con el colorante con suaves movimientos giratorios, utilizando una de las esquinas de un portaobjeto o cubre-objeto.

Posteriormente se hicieron extensiones con esta mezcla en portaobjetos, limpios y libres de grasa, se dejaron secar al aire. Finalmente realizamos el conteo de vivos y muertos, a través de un microscopio de luz con un aumento de 100x.

Todo este proceso se realizó tan rápido como sea posible (1 min.), pues a medida que se prolonga el tiempo, los espermatozoides vivos van muriendo y se falsea el resultado.

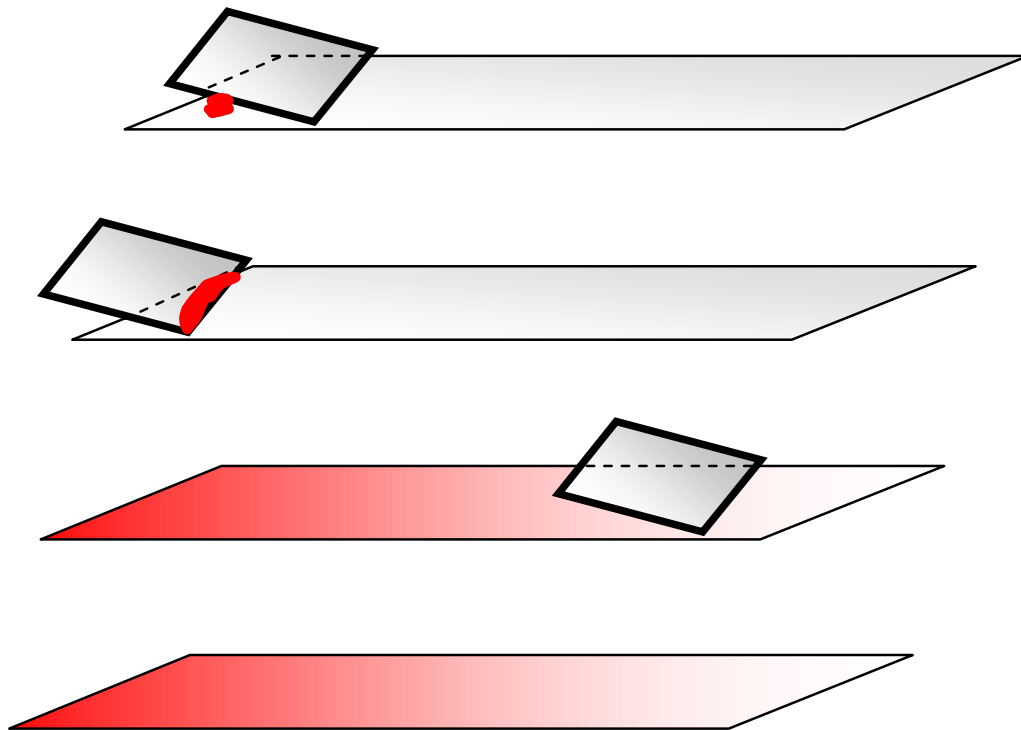


Figura 19. Procedimiento correcto en la preparación del frotis para determinación de la viabilidad espermática.

Fuente: Montes, 2007



Figura 20. Observación de vivos y muertos en el microscopio

Fuente: R. De León, 2008

4.2.9. Patologías Espermáticas

Para el estudio de la morfología de las células espermáticas, existen distintas metodologías, sin embargo para este estudio realizamos el método de tinción Rosa Bengala el cual detallamos a continuación.

4.2.10. Preparación de los colorantes

TINCIÓN ROSA BENGALA		TINCIÓN AZUL VICTORIA (sol. Madre)		TINCIÓN AZUL VICTORIA	
Rosa Bengala	3.00g	Azul Victoria	3.00g	Azul Victoria	17.00 cc
Formalina al 40%	1.00 cc	Alcohol metílico	100.00 cc	Agua Destilada	99.0 cc
Agua destilada	99.00 cc				

4.2.11. Metodología para la determinación de la morfología espermática

Primeramente se hizo la extensión del semen en un portaobjeto limpio y libre de grasa y se seco al aire. Luego se lavo con agua destilada y lo secamos en la llama. Una vez seca, se procedió a la tinción con la solución Rosa Bengala, para posteriormente lavarlos con agua destilada. Aún húmeda, la extensión se cubrió con una solución de Azul Victoria, durante 30seg. Finalmente se lavo con agua corriente, se seco con papel filtro y se observaron en el microscopio con un aumento de 100x donde se procedió al conteo de 100 espermios y se determino el tipo de patología.

Tomada las muestras para realizar estas evaluaciones, el resto del eyaculado se diluyo en proporción de 1:1 y se coloco en baño maría a 38°C hasta realizar los cálculos para la determinación de la tasa de dilución final. Determinada la tasa de dilución final, se prepararon alícuotas de 1cc y se colocaron en refrigeración a 4°C para las posteriores evaluaciones.



Figura 21. Eyaculados mantenidos en baño María hasta realizar los cálculos para la dilución final.

4.3. Determinación de la tasa de dilución

4.3.1. Determinación de la concentración espermática viable

Una vez obtenidos los resultados de la evaluación del eyaculado, se procedió a calcular la concentración espermática viable (CEV) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CEV} = \text{Vol. (cc)} \times \text{Motil (\%)} \times \text{Conc (x10}^6\text{/cc)} \times \% \text{ esper. No patolog. / 100}$$

Donde:

- 👉 Vol.= volumen total del eyaculado en cc.
- 👉 Motil= motilidad masal en porcentaje
- 👉 Conc.= es la concentración espermática leída en el SPERMA-CUE
- 👉 % esper no patolog.= es el porcentaje de espermatozoides normales observados al microscopio.

Este valor se utilizó para estimar la tasa de dilución final del eyaculado.

4.3.2. Dilución del semen

Una vez se determinó la CEV, se procedió a calcular la tasa de dilución del semen utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de diluyente} = (\text{C.E.V.}) (0.5)/30$$

En nuestro ensayo se estimó una concentración de 30×10^6 espermatozoides por pajuela de 0.5 cc por lo que la formula se describe de la siguiente manera:

CEV= concentración espermática viable calculada anteriormente.

0.5= volumen de semen en la pajuela.

30= concentración de espermatozoides (expresada en 10^6) en la pajuela.

5. Evaluación del efecto de los tratamientos a diferentes periodos de tiempo

Una vez calculada la dilución final del eyaculado, se procedió a diluir el semen y separar alícuotas de 1cc y colocarlas en refrigeración a 4°C por 96 horas.

Las lecturas de motilidad masal, motilidad individual, viabilidad espermática (vivos y muertos) se realizaron las 24, 48, 72 y 96 y para ello, las muestras fueron sacadas de refrigeración y colocadas en baño maría, realizando a primera lectura a los 30 minutos y una segunda a las 2hrs.

Los datos obtenidos se registraron en una hoja de campo para su posterior análisis estadístico.

6. Tratamientos

Los tratamientos evaluados en este ensayo fueron los siguientes:

T₁; ODT (modificado)		T₂; TWO-STEP (Parte A)	
Lactosa	7,5 gr.	Tris	12.1 gr.
Leche descremada	20 cc.	Acido cítrico	6.9 gr.
Citrato de sodio	0,5 gr.	Fructuosa	5.0 gr.
Agua destilada	100 cc.	TWO-STEP (Parte B)	
		Tris	12.1 gr.
		Acido cítrico	6.9 gr.
		Fructuosa	5.0 gr.
		Glicerol	70 cc.

6.1. Metodología de dilución

Los eyaculados fueron divididos en dos partes iguales. Una fracción fue diluida en proporción de 1:1 con el T₁ (ODT modificado) y la otra fracción se le agregó el T₂ (parte A) también en proporción de 1:1.

Una vez calculada la tasa final de dilución, se agregó el T₁ hasta completar la dilución, mientras que al T₂ se le añadió la fracción B para completar la dilución final de 30×10^6 espermatozoides/cc.

7. Variables de respuesta

Las variables de respuesta que se consideraron en este estudio son las siguientes:

- 👉 Aspecto físico del eyaculado.
- 👉 Motilidad masal.
- 👉 Motilidad individual.
- 👉 Concentración espermática.
- 👉 Viabilidad Espermática.
- 👉 Patologías.
- 👉 Tasa de dilución.
- 👉 Motilidad masal a diferentes periodos de tiempo (0; 24; 48; 72 y 96 horas).
- 👉 Motilidad individual a diferentes periodos de tiempo (0; 24; 48; 72 y 96 horas).
- 👉 Viabilidad espermática a diferentes periodos de tiempo (0; 24; 48; 72 y 96 horas).

8. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados a través de un modelo de bloques completamente al azar (BCA) con un arreglo jerárquico o también conocido como la técnica de Sub-Muestras Repetidas o Muestras Anidadas, el cual se representa mediante la siguiente ecuación matemática:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \tau_i + v_j(\tau)_i + \rho_k(\tau_i * v_j)$$

Donde:

Y_{ijk} = es la variable de respuesta

μ = media general

β_i = efecto del bloque (día de muestreo)

τ_i = efecto del primer nivel o jerarquía (raza)

$v_j(\tau)_i$ = efecto del segundo nivel dentro del primer nivel o jerarquía (tratamiento)

$\rho_k(\tau_i * v_j)$ = efecto del tercer nivel dentro del segundo nivel y dentro del primer nivel o jerarquía (periodo).

El análisis de las variables volumen y concentración espermática se realizó utilizando un diseño completamente al azar (DCA) y se procedió a un análisis de varianza para la determinación del grado de significancia.

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos del estudio fueron analizados previamente y al no presentar una distribución normal, se procedió a realizar una transformación logarítmica (\log_{10}) y luego se procedió a realizar el análisis estadístico.

Para la evaluación del eyaculado se utilizó una tasa de dilución de 30 x $10^6/0.5\text{cc}$ del volumen total diluido. Una vez diluido el semen, se prepararon alícuotas de 3cc y se conservaron en refrigeración a 4°C.

Las alícuotas se sacaron de refrigeración a las 24, 48, 72 y 96 horas y colocadas en baño maría para su incubación y las evaluaciones se realizaron a los 30 minutos y a las 2 horas post incubación. Los resultados de la investigación los detallamos a continuación.

1. Aspecto físico del eyaculado

Los eyaculados obtenidas (10) tuvieron una coloración entre blanco lechoso y blanco acuoso, todas dentro de la normalidad. No se observaron coloraciones grises o marrones que indicaran suciedad, presencia de orina o de infecciones en el tracto genital. (Figura 22). El olor también fue característico (*Sui generis*) lo cual corroboro que ninguno de los sementales seleccionados para el

ensayo presentaban infecciones genitales que pudieran afectar la calidad de los eyaculados. Con base a estos resultados, todas las muestras se consideraron como aptas y fueron procesadas.

El volumen promedio para las 10 muestras fue de 1.22cc, superior a los reportado por **Córdova-Izquierdo et al. (2006)** y **De León et al. (2010)** que promediaron de 1.11cc y 0.80cc respectivamente, utilizando vagina artificial y la misma metodología.

Estos valores también son superiores a los obtenidos por **Córdova-Izquierdo et al. (2006)** cuando realizaron la colecta directamente de la vagina (0.57cc).

El volumen colectado, está dentro de los parámetros normales para la especie y aunque no se encontró diferencia significativa (Cuadro 4.) ($P > 0.05$), se pudo observar que en los machos F_1 el volumen colectado fue mayor (1.28cc), seguido por los Dorper (1.25cc) y por último los Pelibuey y Katahdin (1.0cc) (Grafico 1.).

CUADRO IV. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE VOLUMEN ENTRE RAZAS.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	TIPO III SS	CUADRADO DE LA MEDIA	F-VALOR	PR > F
Raza	3	0.12266667	0.04088889	0.17	0.9121

R-cuadrado: 0.078835

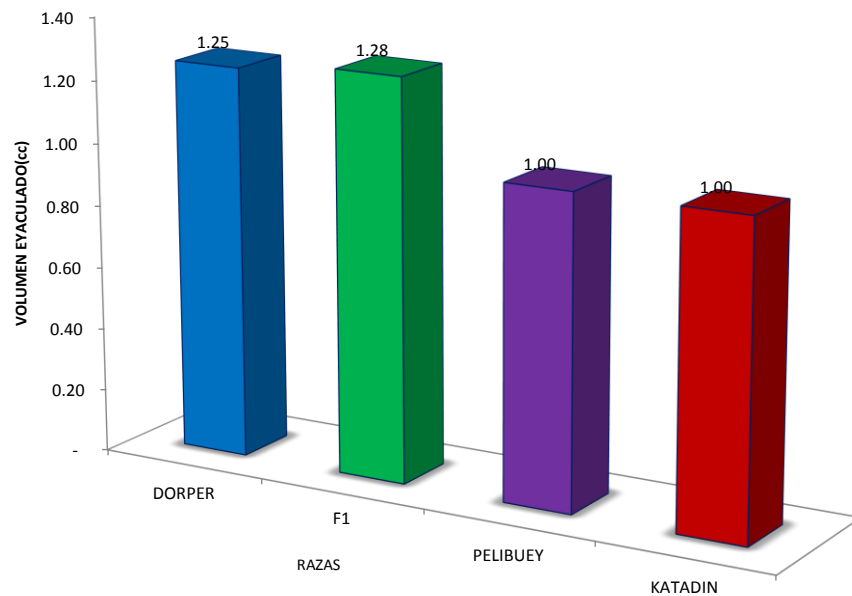
Coef. Var.: 40.0625

Vol. Media: 1.220



Figura 22. Muestra de un eyaculado con características ideales para la dilución.

GRAFICO 1. VOLUMEN PROMEDIO EYACULADO POR RAZA.



2. Motilidad masal inicial

La motilidad masal promedio, para los 10 eyaculados, fue de 87.4%, superior al señalado por **Pérez y Pérez (1999)** para ser considerado un eyaculado apto para la congelación. Sin embargo, son inferiores al reportado por **De León y col. (2010)** quienes observaron motilidad masal subjetiva de 90.0%, lo cual podría estar asociado a la mayor frecuencia de extracción que realizaron estos investigadores, ya que a mayor frecuencia, menor es la fagocitosis y mayor el número de espermios vivos, lo que redundaría en un mayor porcentaje de motilidad. Los valores para la motilidad masal encontradas en este estudio son superiores a los reportados por **Córdova-Izquierdo et al. (2006)**, quienes reportaron un 64.5% de motilidad individual.

Los porcentajes más altos para la motilidad masal se observaron en los machos Pelibuey y Katahdin (98.0%) y los más bajos en los F₁ (83.5%). Los machos Dorper presentaron motilidad de 90%.

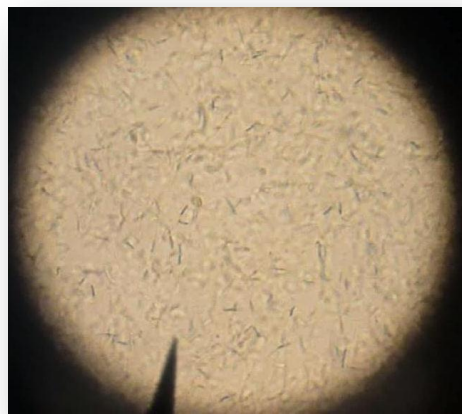


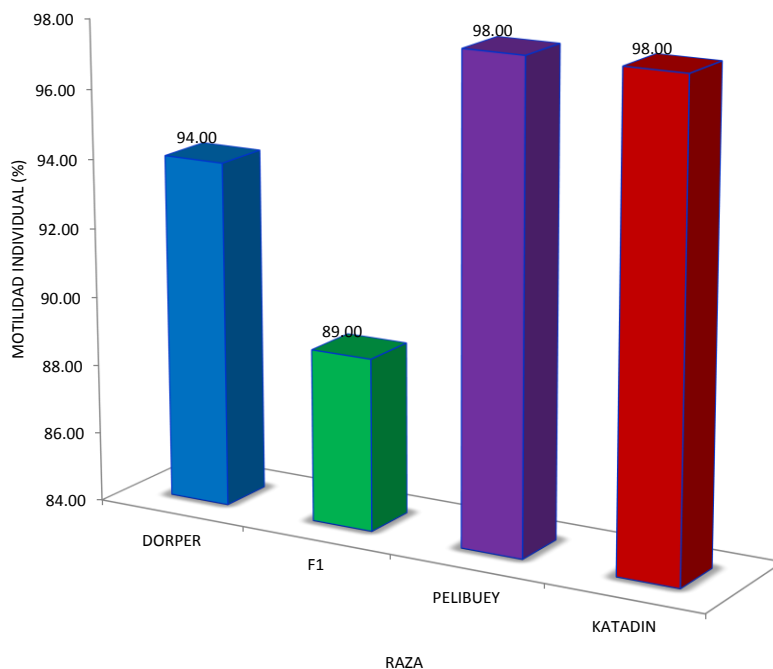
Figura 23. Motilidad masal observada al microscopio con aumento de 40x.

3. Motilidad individual inicial

El promedio, para la característica motilidad individual, fue de 91.8%, pudiendo observarse al microscopio una *normocinesis* (movimiento normal) de los espermatozoides. Este movimiento se caracterizó por ser activo y enérgico, en el cual los espermatozoides tendían a desplazarse hacia delante, lo cual, de acuerdo al tipo de movimiento se califica como Progresivo.

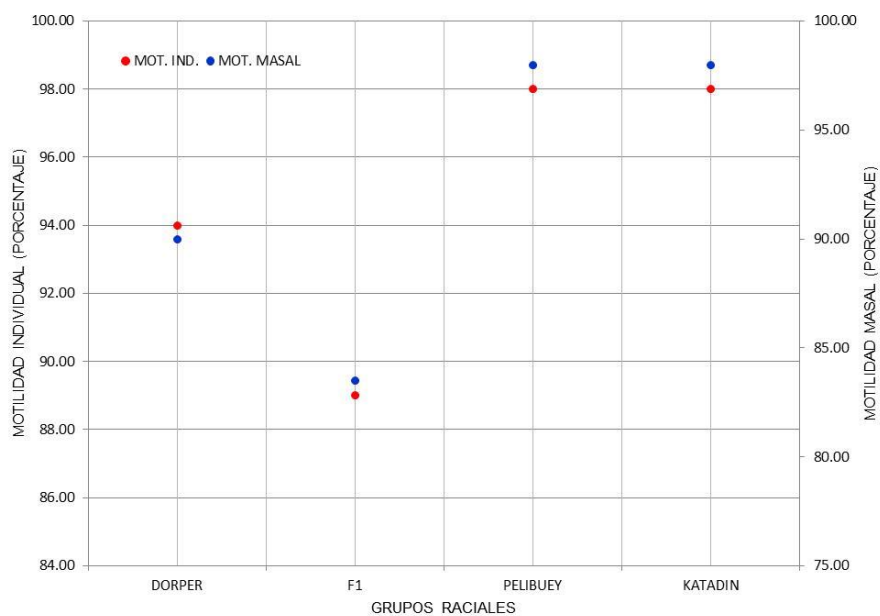
En cuanto a la motilidad individual por raza (Grafico 2.), se observó que en los Pelibuey y los Katahdin fue de 98.0%, siendo la más alta, y, al igual que para la variable motilidad masal, los F₁ presentaron la más baja (89.0%) y los Dorper la intermedia (94%).

GRÁFICO 2. MOTILIDAD INDIVIDUAL POR RAZA.



Tal como se observa en el Grafico 3 la motilidad masal estuvo estrechamente relacionada con la motilidad individual; a mayor motilidad masal, mayor motilidad individual.

GRAFICO 3. RELACION ENTRE LA MOTILIDAD MASAL Y LA MOTILIDAD INDIVIDUAL.



4. Concentración espermática. (CE)

La CE promedio fue de $252.6 \times 10^6 / \text{ccy}$ aunque no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las razas, se observó una tendencia en machos Katahdina presentar mayores CE ($372.0 \times 10^6 / \text{cc}$) seguido de los F_1 ($246.3 \times 10^6 / \text{cc}$), los Pelibuey ($240.0 \times 10^6 / \text{cc}$) y los Dorper ($218.0 \times 10^6 / \text{cc}$), tal como se observa en el Gráfico 4.

Estos valores son similares a los reportados por **De León et al. (2010)**, que fueron de 215.2×10^6 , pero inferiores a los obtenidos por **Córdova-Izquierdo et al. (2006)**, quien obtuvo concentraciones espermáticas de 206.4×10^6 /cccon vaginaartificial y 176.02×10^6 recogidas directamente de la vagina.

CUADRO V. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA ENTRE RAZAS.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	TIPO III SS	CUADRADO DE LA MEDIA	F-VALOR	PR > F
Raza	3	1684106.667	561368.889	0.20	0.8919

R-cuadrado: 0.091397

Coef. Var.; 65.66178

Conc Media: 2544.00



Figura 24. Colocación de la gota de semen en la microcubeta del fotómetro Sperma-Cue para la determinación de la C.E.

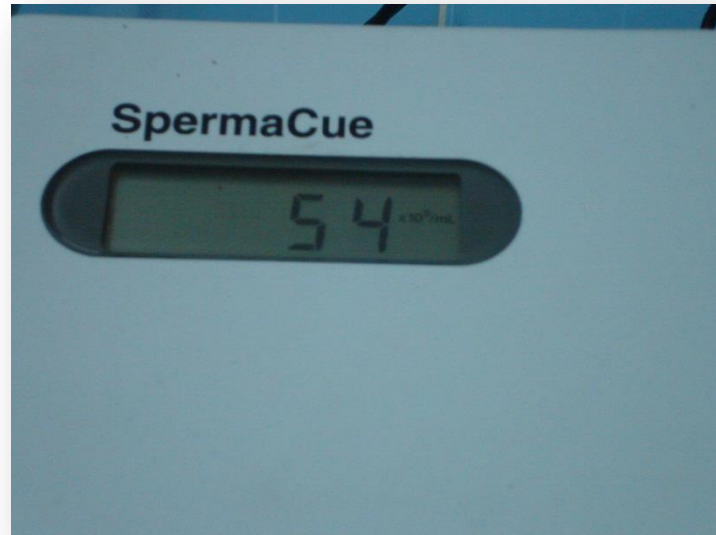


Figura 25 Lectura de la concentración espermática en el fotómetro Sperma-Cue.

Por otra parte, no se observó ninguna relación entre las variables motilidad masal (Gráfico 4) e individual y concentración espermática por G.R. (Gráficos 5 y 6), lo cual nos indica que, para este ensayo, la concentración es una variable independiente de la motilidad masal y la motilidad individual. Esta situación tendría su explicación en que para la determinación de la C.E se incluyen vivos y muertos y para la determinación de los porcentajes de motilidad solo se consideran los espermatozoides viables (vivos), lo que al final reduce la concentración espermática viable (CEV) que es la que se utiliza para determinar la tasa de dilución y la concentración final en la pajuela de semen.

GRAFICO 4. CONCENTRACION ESPERMÁTICA OBSERVADA POR RAZA.

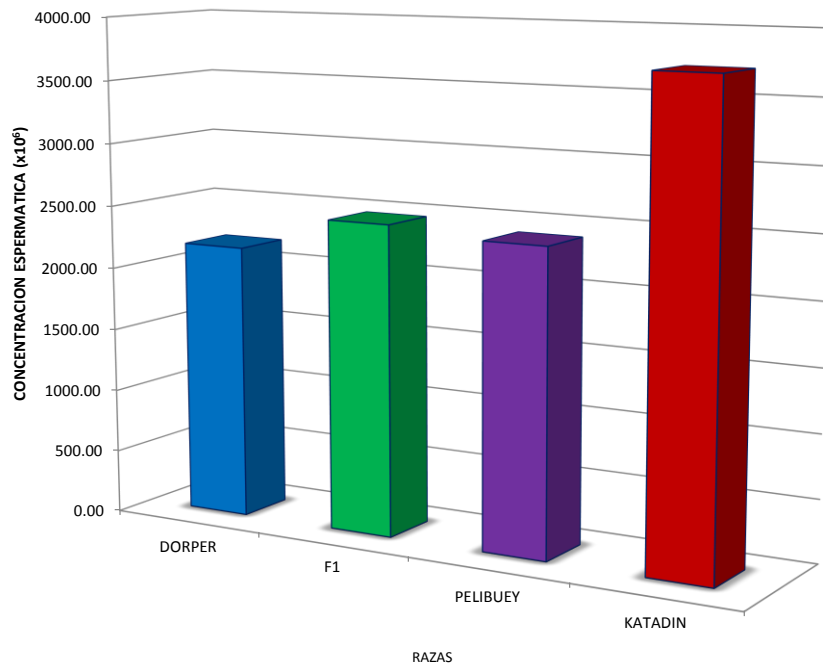


GRAFICO 5. RELACION ENTRE MOTILIDAD MASAL Y CONCENTRACION ESPERMÁTICA.

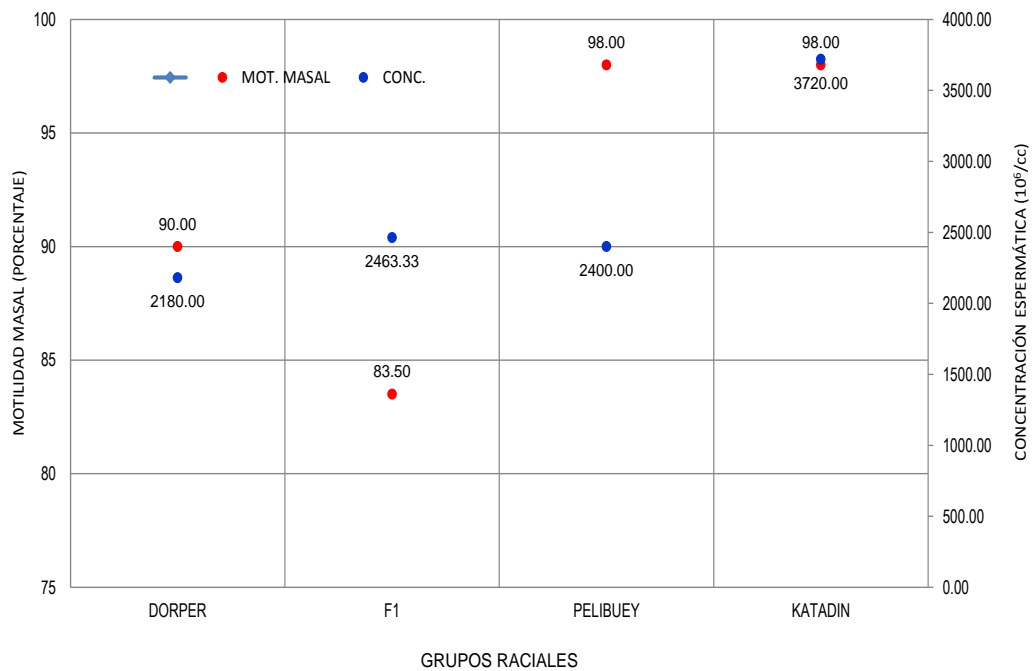
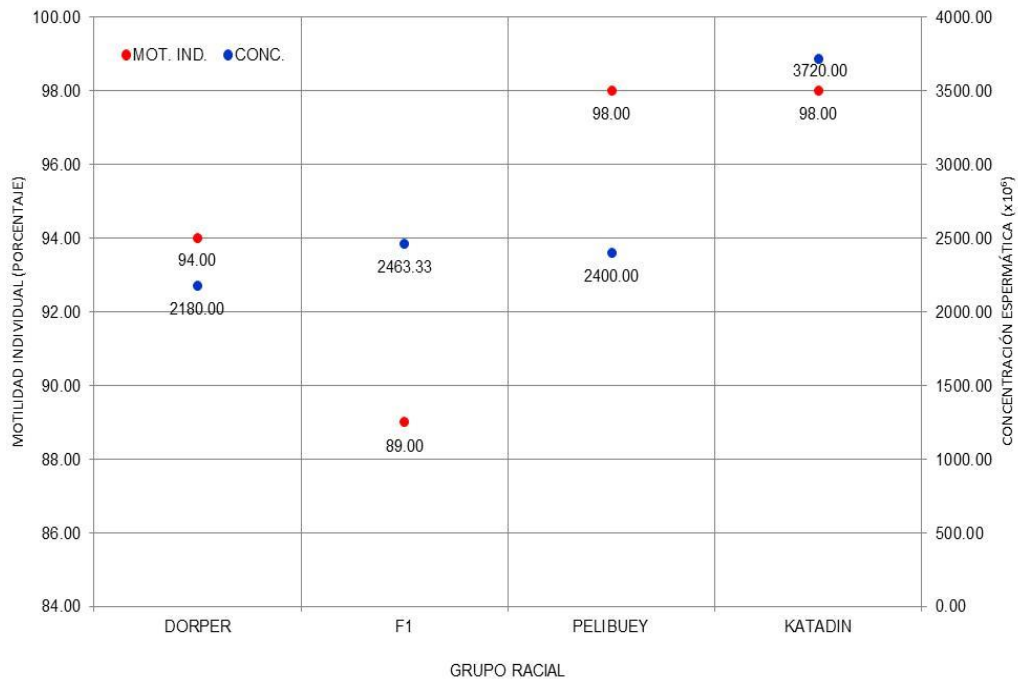


GRAFICO 6. RELACION ENTRE MOTILIDAD INDIVIDUAL Y CONCENTRACION ESPERMÁTICA.



5. Viabilidad espermática (Prueba de vivos y muertos)

Esta prueba se realizo utilizando la metodología propuesta por **Montes (2007)**, la cual se realiza con la tinción eosina/nigrosina. Los resultados indicaron una viabilidad espermática (vivos) promedio de 56%, lo que esta muy por debajo de lo señalado por **Pérez y Pérez (1999)** quien señala que el porcentaje de vivos, para un semen que se va a congelar, debe ser superior al 75%. Este bajo porcentaje de espermatozoides viables corrobora los resultados que indican que no hay una relación entre concentración espermática y los porcentajes de motilidad.

En trabajos similares realizados por **De León et al. (2010)** y **Córdova-Izquierdo et al. (2006)**, tampoco se alcanzaron porcentajes de viabilidad espermática superiores al 75% en sus estudios. **De León et al. (2010)** reportan promedio de 67.0%, mientras que **Córdova-Izquierdo et al. (2006)**, encontraron que la misma fue de 68.5%.

Este alto porcentaje de espermatozoides muertos, pudiera estar asociado a la fagocitosis, producto de la poca actividad sexual que tenían estos machos, pues al momento del estudio, se encontraban en periodo de descanso.

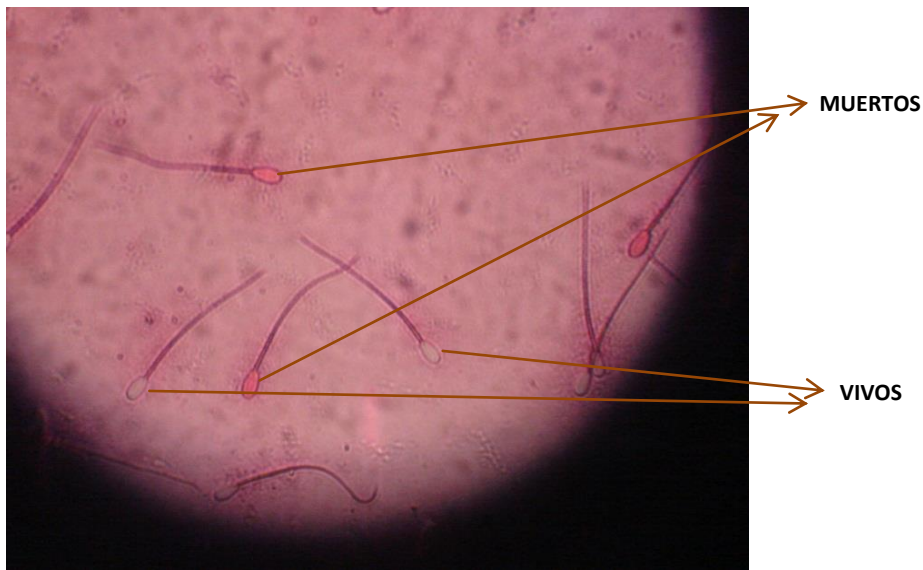


Figura 26. Observación de la viabilidad espermática (vivos y muertos) en el microscopio con aumento de 100x.

Foto: R. De León

6. Patologías

Los resultados de la evaluación de las patologías indicaron que estas no superaron el 8% en todas las muestras de los eyaculados.

7. Calculo de la concentración espermática viable. (CEV)

Para determinar la tasa de dilución se utilizo la siguiente fórmula:

$$\text{CEV} = \text{Vol. (cc)} \times \text{Motil (\%)} \times \text{Conc (x10}^6\text{/cc)} \times \text{\% esper. No patolog. / 100}$$

Remplazando los valores en la formula;

$$\text{CEV} = 1.22 \times 0.874\% \times 2,526 \times 10^6 \times 0.92$$

$$\text{CEV} = 2,477.95 \times 10^6.$$

8. Tasa de dilución.

La tasa de dilución se estimo con la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen de diluyente} = (\text{C.E.V.}) (0.5)/30$$

Remplazando los valores tenemos;

$$\text{Volumen de diluyente} = (2,477.95 \times 10^6.) (0.5\text{cc})/30 \times 10^6.$$

$$\text{Volumen de diluyente} = 41.30\text{cc}$$

Esto nos indica que en promedio debíamos añadir 41.30 cc de diluyente al eyaculado. Esta cantidad de diluyente debe restarse al que se le agrego al inicio cuando el eyaculado se diluyo en proporción de 1:1.

Con esta cantidad final de diluyente, se podrían producir ≈ 83 dosis/eyaculado en pajuelas de 0.5cc, con una concentración de 30×10^6 /cc que es lo recomendado para inseminaciones intrauterinas.

9. Efecto del diluyente sobre la motilidad masal a diferentes periodos de tiempo (24; 48; 72 y 96 horas)

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) para las variables tratamiento (Trat.) y grupo racial (G.R.) lo que nos indica las independencias de estas variables en este estudio. (Cuadro VI.)

Para la interacción Trat.*G.R. el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.001$), al igual que para el anidamiento Tiempo (Trat.), pero no para el anidamiento Periodo (Trat.*Tiempo) (Ver Cuadro 6 de ANOVA).

El coeficiente de variación (CV) (16.78), aunque un poco alto, se encuentra dentro de los límites permisibles que es de 15%, lo que también nos indica la poca variabilidad que hubo en este ensayo

La motilidad masal promedio fue de 63.23%, siendo mayor en el T₂ (65.10% ±10.38) que en el T₁ (45.25% ±15.26) para todos los periodos. (Ver Grafico 7)

CUADRO VI. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE MOTILIDAD MASAL.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	TIPO III SS	CUADRADO DE LA MEDIA	F-VALOR	PR > F
Tratamiento (Trat.)	1	1.78634698	1.78634698	2.72	0.1974
Grupo Racial (GR)	3	1.95738005	0.65246002	0.99	0.5017
Trat.*Gr	3	1.96772100	0.65590700	8.30	<.0001
Tiempo(Trat.)	6	2.40335595	0.40055933	5.07	.0001
Periodo(Trat.*Tiempo)	8	0.29483631	0.03685454	0.47	0.8778

R-cuadrado:0.437000

Coef. Var.; 16.78577

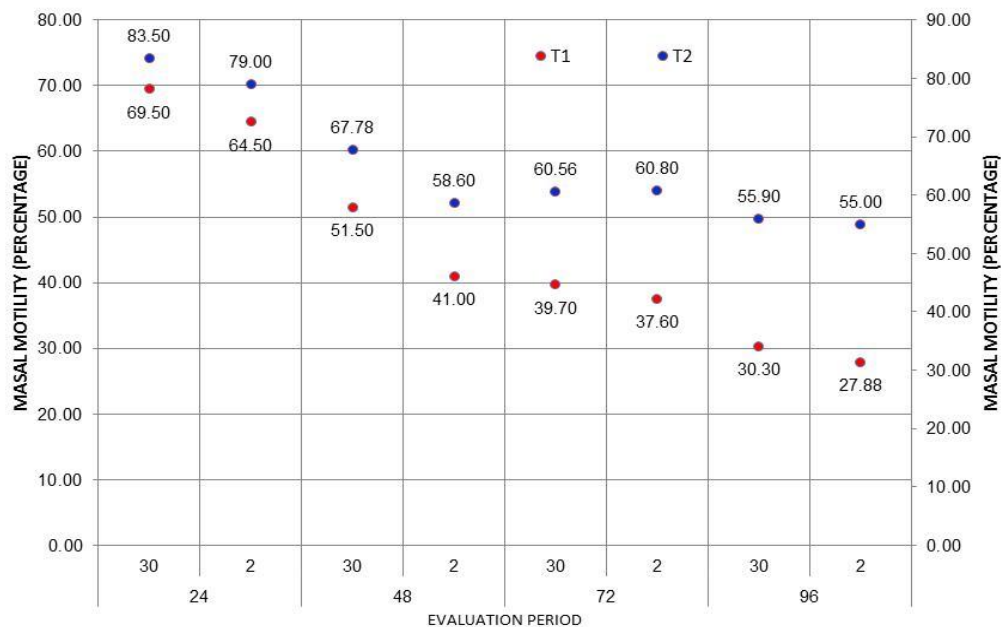
M.Masal Media: 1.674350

Los valores promedios para motilidad masal *post* incubación, encontrados en este estudio, son superiores a los que se reportan en otros trabajos de investigación (**Martínez et al. (2007)** (62.8%), **Martínez et al. (2009)** (53.56%) y **De León et al. (2010)**(49.9% ± 19%) en donde se evaluó el efecto del diluyente sobre parámetros seminales utilizando la misma metodología, sobre todo para los periodos de 48 y 72hrs las medias de motilidad masal fueron muy superiores en nuestro ensayo, que los reportados por estos mismos autores, lo cual podría deberse a que ninguno de estos autores incluyó un crio-protector en sus tratamientos.

Igualmente, nuestros valores para motilidad masal, son superiores a los reportados por **Cortes et al. (s.f.)** quien indican que utilizando un diluyente a base de leche descremada y Triladyl se logran porcentajes de motilidad masal de 56.6 y 52.5% respectivamente.

En todos los periodos de evaluación, el T₂ resulto ser el mejor, lo cual podría confirmar lo beneficioso de agregar un crio-protector no penetrante al diluyente ya que el mismo favorece la protección del espermatozoide al proceso de refrigeración.(Ver Gráfico 7.)

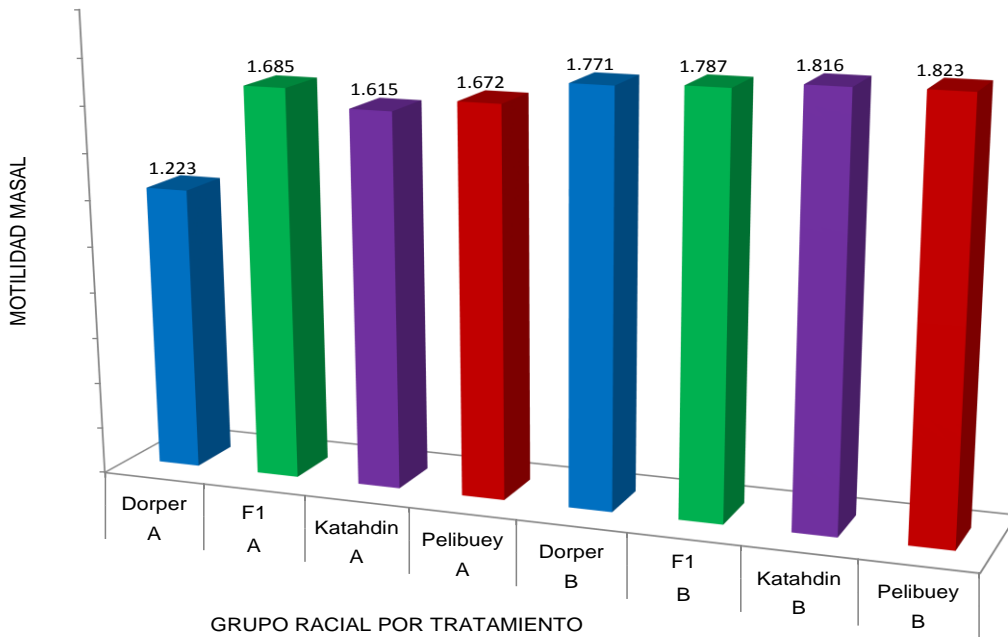
GRAFICO 7.MOTILIDAD MASAL POR TRATAMIENTO POR PERIODO.



Al analizar el efecto del tratamiento aplicado a los grupos raciales sobre la motilidad masal, se pudo observar que el T₂ tuvo un mejor efecto sobre la

motilidad que el T₁, observándose porcentajes de motilidad superiores al 60%, mientras que en el T₁ la misma solo fue de 45.2% (ver Gráfico)

GRAFICA 8. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A LOS GRUPOS RACIALES SOBRE LA MOTILIDAD MASAL

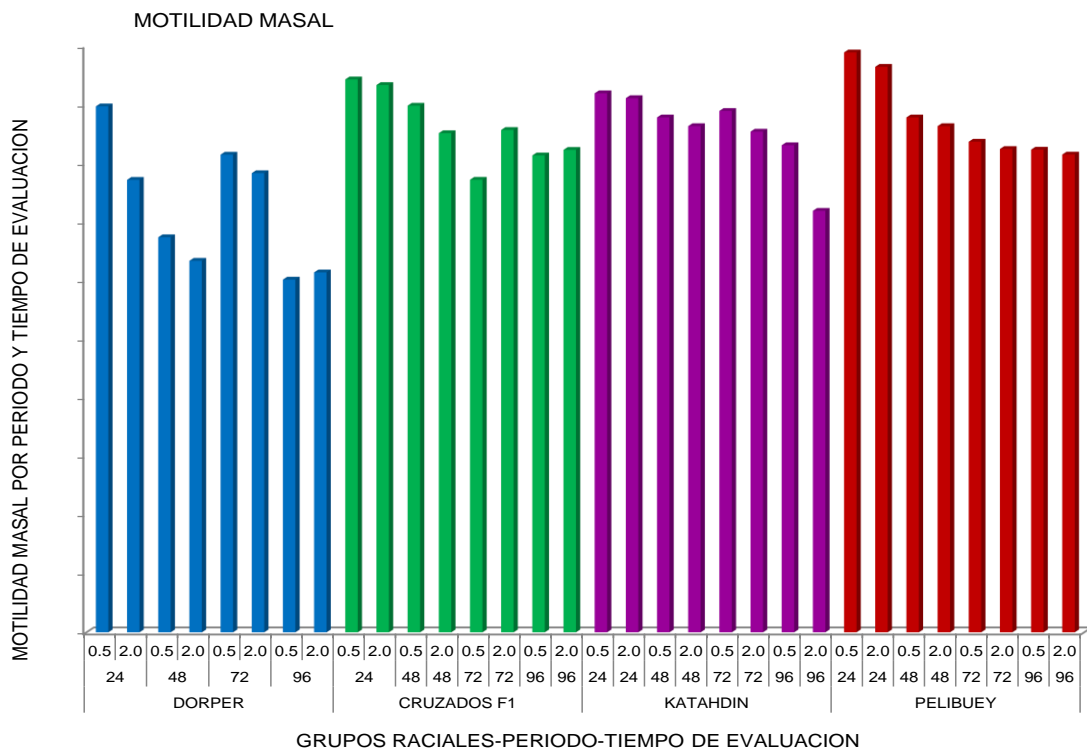


Los mejores porcentajes de motilidad se observaron en el grupo racial F₁ cuando se les aplicó el T₁, mientras que el T₂ presentó los mejores valores de motilidad en el grupo Pelibuey. Aunque no hay una explicación para este comportamiento, es importante señalar que en ambos grupos raciales el común denominador es la raza Pelibuey, que está más adaptada a las condiciones de estrés calórico que predomina en la zona que las otras razas utilizadas en el ensayo, lo que concuerda con lo señalado por **EI-Darawany (1999)** quien encontró bajos porcentajes de motilidad bajo condiciones estrés

calórico, asociados a una baja concentración espermática en razas no adaptadas.

Cuando se analiza el comportamiento de la motilidad masal por periodos de evaluación (Gráfico 9), se observa un comportamiento similar para todos los grupos raciales; la motilidad, disminuye a medida que transcurren las horas, lo cual se explica ya que a medida que transcurren los periodos de evaluación, los espermatozoides van muriendo, afectando la motilidad masal, observándose que, a las 96 horas de evaluación, los mejores porcentajes de motilidad se observaron en los grupos raciales F₁ y Pelibuey, grupos estos que están más adaptados al estrés calórico de la zona.

GRÁFICA 9. COMPORTAMIENTO DE LA MOTILIDAD MASAL POR GRUPO RACIAL POR PERIODO Y TIEMPO DE EVALUACION.



10. Efecto del diluyente sobre motilidad individual a diferentes periodos de tiempo

El análisis de varianza, al igual que para la motilidad masal, no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) para las variables Trat. y G.Rtratamiento, lo que confirma nuevamente la independencia de estas variables.

La interacción Trat*GR y el anidamiento Periodo (Trat) resultaron altamente significativos ($P < 0.001$) pero la interacción Periodo (Trat*Tiempo) no fue significativa.

El promedio para motilidad individual fue de 65.70%, observándose la mejor motilidad individual en el T_2 ($67.9\% \pm 10.35$) que en el T_1 ($49.10\% \pm 16.20$), que son superiores a los reportados por **De León y col. (2010)** ($45.18\% \pm 22.02$) y concuerdan con lo reportado por **Sánchez y Tsutsui (2002)** quienes al evaluar dos diluyentes para preservación refrigerada de espermatozoides, encontraron que la motilidad progresiva (individual) era superior al 50% a las 72hrs. También son valores superiores a los promedios encontrados por **Gil y Olivera (2004)** quienes reportan motilidad individual subjetiva en semen refrigerado a 5°C de 64.2 y 56.7% para las 48 y 72hrs respectivamente.

CUADRO 7. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE MOTILIDAD INDIVIDUAL.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	TIPO III SS	CUADRADO DE LA MEDIA	F-VALOR	PR > F
Tratamiento (Trat.)	1	2.10276837	2.10276837	2.05	0.2427
Grupo Racial (GR)	3	3.91661231	1.30553744	1.28	0.4231
Trat.*Gr	3	3.07077437	1.02359146	14.20	<.0001
Tiempo(Trat.)	6	2.26177496	0.37696249	5.23	<.0001
Periodo(Trat.*Tiempo)	8	0.19760819	0.02470102	0.34	0.9477

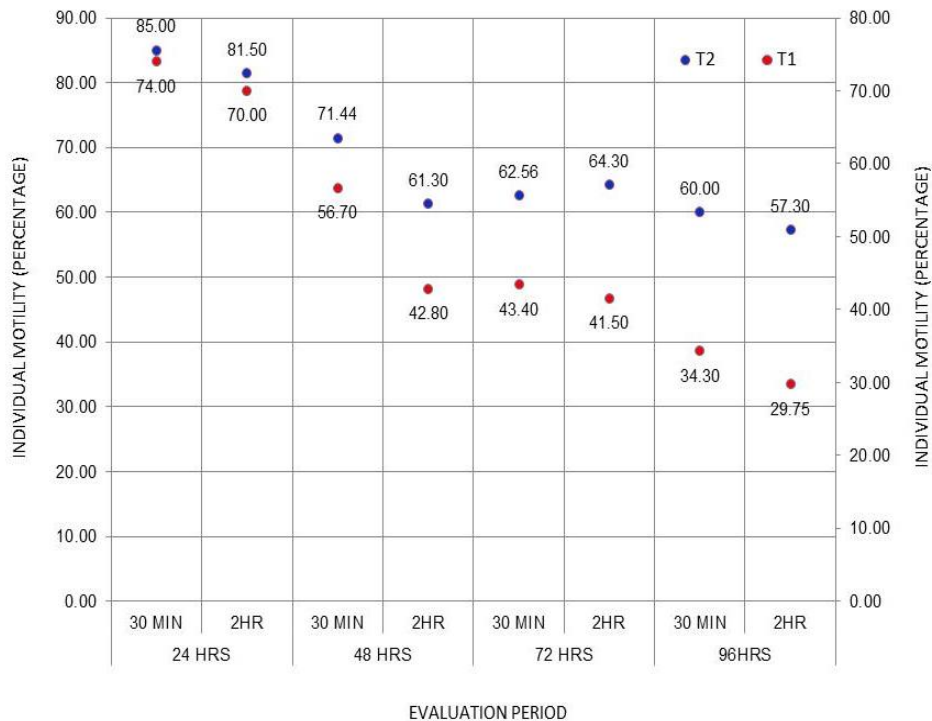
R-cuadrado: 0.550932

Coef. Var.; 15.90262

M.Indiv. Media: 1.688222

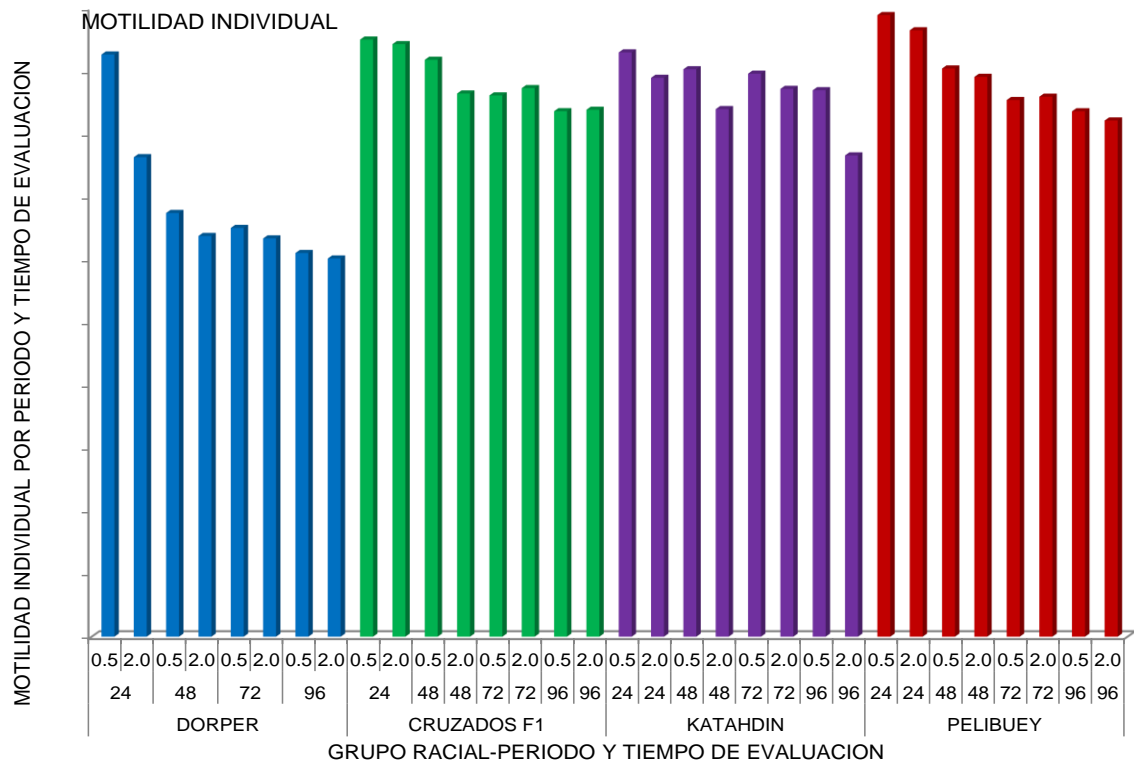
Los valores de motilidad individual disminuyeron a medida que el tiempo transcurrió, coincidiendo este comportamiento con lo reportado por **De León et al (2010)** y **Martínez et al (2007 y 2009)**. (**Grafico 10**) y, en todos los periodos, los valores para el T₂ fueron superiores a los del T₁.

GRAFICO 10. MOTILIDAD INDIVIDUAL POR TRATAMIENTO POR PERIODO.



Cuando se analiza el comportamiento de la motilidad individual por grupo racial/periodo/tiempo (Grafico 11), observamos un comportamiento similar al de la motilidad masal: a medida que transcurren los periodos, la motilidad individual disminuye debido a la mortalidad de los espermatozoides que no soportan el periodo de conservación en refrigeración.

GRÁFICA 11. COMPORTAMIENTO DE LA MOTILIDAD INDIVIDUAL POR GRUPO RACIAL POR PERIODO Y TIEMPO DE EVALUACIÓN.



11. Viabilidad espermática a diferentes periodos de tiempo (0; 24; 48; 72 y 96 horas)

Para la viabilidad espermática no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos, entre los grupos raciales ni para la anidamiento Periodo(Trat), sin embargo para la interacción Trat*GR si se encontró diferencias altamente significativas ($P < 0.001$), lo que nos indica una alta dependencia del tratamiento sobre el grupo racial.

CUADRO 8. ANALISIS DE VARIANZA PARA VIABILIDAD ESPERMATICA POR PERIODO.

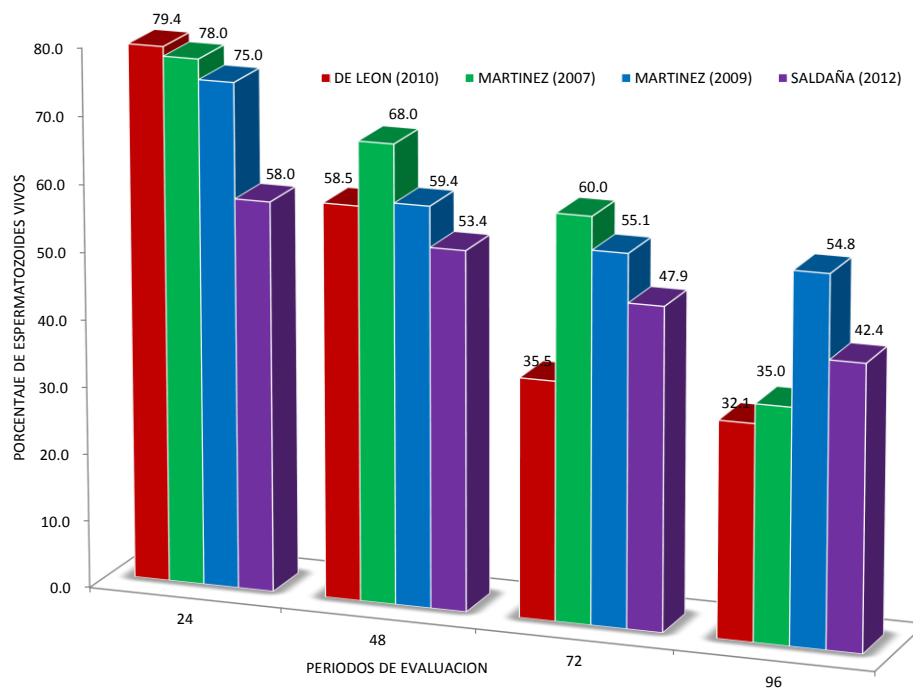
FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	TIPO III SS	CUADRADO DE LA MEDIA	F-VALOR	PR > F
Tratamiento (Trat.)	1	0.75025563	0.75025563	1.01	0.3899
Grupo Racial (GR)	3	1.62720347	0.54240116	0.73	0.6002
Trat.*Gr	3	2.23846943	0.74615648	14.20	<.0001
Periodo(Trat.)	6	0.62526815	0.10421136	5.23	0.2132

Los valores promedios para la viabilidad espermática fueron 53.8%, 50.6%, 45.0% y 39.3, para el T₁ y 62.1%, 56.2%, 50.8% y 45.4% para el T₂ a las 24, 48, 72 y 96hrs respectivamente. Estos valores, al compararlos con los obtenidos por **De León y col (2010)**, para los mismos periodos, son más

bajos para las 24 y 48hrs (79.4% y 58.5% respectivamente), pero superiores para las 72 y 96hrs (37.5% y 32.1%).

Cuando comparamos estos mismos valores con los reportados por **Martínez et al. (2007)**, se observa que para las 24, 48 y 72hrs son inferiores (78, 68 y 60% respectivamente), pero superiores a los encontrados a las 96hrs que solo fue de un 35% de vivos. Con respecto a los valores de espermatozoides vivos reportados por **Martínez et al. (2009)**, se observa que todos los porcentajes de espermatozoides vivos son inferiores. (Ver Gráfico 12).

GRÁFICA12. COMPARACIÓN DE ESPERMIOS VIVOS POR PERIODO CON OTROS AUTORES.

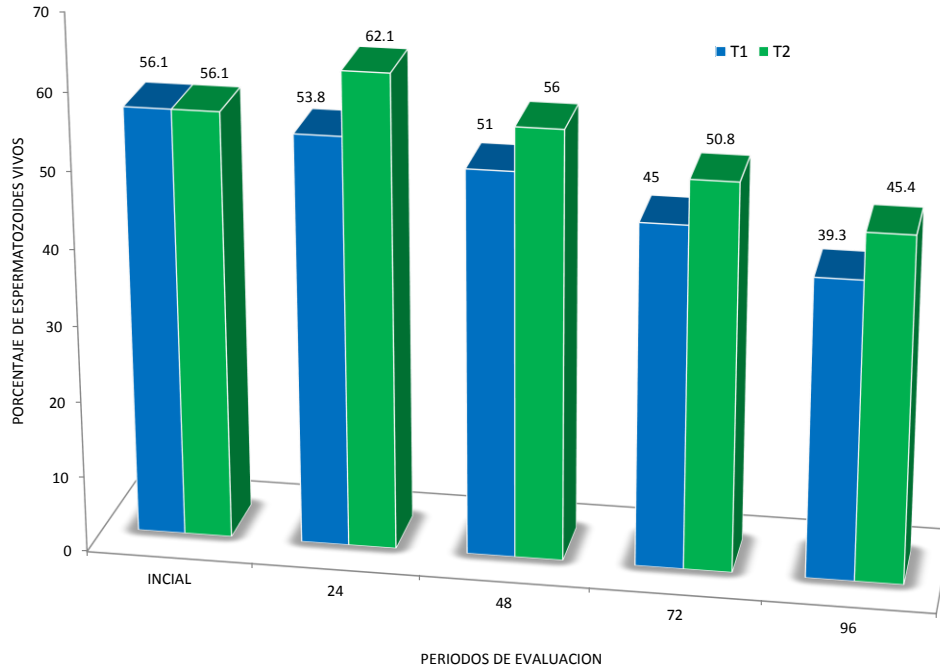


Durante el periodo de evaluación, se pudo observar que la proporción de espermatozoides con la integridad de la membrana intacta (vivos) fue decreciendo con el tiempo, presentando este parámetro igual comportamiento que motilidad masal e individual. Estos resultados coinciden con lo señalado por **Gil y Olivera (2004)** (Ver Gráfico 13).

Para este estudio se le dio importancia a los periodos de evaluación y a los tiempos de evaluación ya que nuestro objetivo era determinar la posibilidad de crio-conservar semen ovino en refrigeración por periodos largos de tiempo. Los resultados de las evaluaciones de viabilidad y motilidad, que son los aspectos que determinan la capacidad de fecundación del semen, demuestran que en todos los periodos y tiempos de evaluación, se mantuvieron porcentajes aceptables que garantizan que el semen refrigerado a 4° C puede provocar gestaciones en hembras con celo.

Tal como se observa en el Grafico 13, el porcentaje más bajo de espermatozoides con integridad acrosómica al final del periodo de evaluación (96hr) fue de 45.4%, lo que indica que habían vivos aproximadamente 13.620×10^6 espermatozoides/cc, que son más que suficiente para lograr una preñez.

GRAFICA 13. VIABILIDAD ESPERMÁTICA (VIVOS) POR PERIODO.



En este estudio, al realizar la prueba de hipótesis se observa que el efecto del tratamiento es altamente significativo ($P < 0.001$), lo que nos indica que el tipo de diluyentes tiene efectos sobre la motilidad masal y la individual.

CUADRO 9. PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA MOTILIDAD MASAL

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	TIPO III SS	CUADRADO DE LA MEDIA	F-VALOR	PR > F
TRAT	1	1.78634698	1.78634698	18.32	<.0037**

CUADRO 10. PRUEBA DE HIPOTESIS PARA LA MOTILIDAD INDIVIDUAL.

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	TIPO III SS	CUADRADO DE LA MEDIA	F-VALOR	PR > F
TRAT	1	2.10276837	2.10276837	22.06	<.0022**

CONCLUSIONES

Con base a los resultados de este estudio concluimos lo siguiente;

- 👉 Se rechazan las hipótesis nulas planteadas para este estudio y se aceptan las alternativas que plantean que si hay un efecto del diluyente sobre los indicadores de viabilidad espermática y que al menos un diluyente es útil para la conservación del semen ovino refrigerado.
- 👉 Es posible conservar semen refrigerado a 4°C hasta por 96hrs con capacidad fecundante utilizando el diluyente TWO STEP[®].
- 👉 Para periodos cortos de conservación en refrigeración (hasta 24hrs) se puede utilizar el diluyente ODT ya que nos brinda buenas características de viabilidad como lo es motilidad masal e individual y porcentaje de viabilidad espermática (vivos), además, es de más bajo costo que el comercial.
- 👉 La adición de un crio-protector no penetrante pudiera estar asociada a una mayor viabilidad espermática para periodos de más de 24 horas.

RECOMENDACIONES.

Con los resultados obtenidos en este estudio, surgen nuevas interrogantes sobre todo en el cuanto al beneficio de agregar o no un crio-protector a los diluyentes para refrigeración de semen por lo que recomendamos continuar con este tipo de estudios y evaluar otros aspectos de los diluyentes, no solo para la crio-conservación de semen fresco refrigerado, sino para la congelación. Los resultados que de allí se obtengan ya contribuirána masificar la técnica de inseminación artificial como herramienta de mejoramiento genético en los hatos ovinos del país.

LITERATURA CONSULTADA

- ABD ELHAKEAM, A. A. 2000.** Effect of extension technique of goat semen on sperm storage-ability: A cold extension method for improving storageability. *Minia J. of Agric Res. and Develop.* 20:497-514, 2000.
- AISEN E, ÁLVAREZ H, VENTURINO A, LARREGUY D. 1995.**Efecto comparativo de los diluyos conservadores de diferente composición y tonicidad sobre la crio-preservación de semen ovino. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animal* 10: 223-231.
- ALBERTY, K. 2004.**Congelacao de semen bovino. Novos enfoques en meios diluentes (en línea). Monografía del Seminario emReproducao animal. I. Posgraduacao en medicina veterinaria.
- ARTHUR G, H., NOAKES D.E., PEARSON H. 1991.** Reproduccion y obstetrician en veterinaria. 6ª Ed. Interamericana McGraw-Hill. España.
- BAILEY, J. L., J. F. BILODEAU, Y N. CORMIER. 2000.** Semen cryopreservation in domestic animals; a damaging and capaciting phenomenon. *J. Androl.* 21:1-7.
- BEARDEN H. J., FUQUAY J., 1982.** Reproducción animal aplicada. Manual Moderno. Mexico D.F. pp 135-250.
- CAMBELL, W., J. HAVEY, G.T., Mc DONALD, F.M., SPARKMAN, I.R. 1996.** Transcervical insemination in sheep: an anatomical evaluation. *Theriogenology* 45: 1535-1544.
- CHEMINEAU, P., CAGNIE, Y., GUERIN, Y. P., VALLET, J.C. 1991.** Training Manual on Artificial Insemination in sheep and goats.Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO) Roma.
- COLAS, G. 1975.**The use of progestagen SC9880 as an aid for artificial insemination in ewes. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 15: 317-327.
- COLAS, G. 1984.**Semen technology in the ram. In: *The male in farm animal reproduction.* Courot, M. (ed.). MartinusNijhoff. New York. p. 219-234.
- COLE, H., CUPPS P. 1984.** Reproducción de los animales domésticos. TerceraEdición. Zaragoza, España. Editorial Acribia.
- CORTEEL, J.M. 1977.** Production, storage and insemination of goat semen.Management of Reproduction in sheep ans goats. (Winsconsin)

- CORTEEL, J.M. 1992.** Involvement of seminal plasma in goat sperm preservation. En: V International Conference on Goats, New Delhi Pre-Conference Proceedings Invited Papers., A791/1, Amar Puri, NabiKarim, Delhi, India: Everest Press, 1992 Vol. II, part II. p 290.
- CORTÉS, S., TORTAJADA, E., VINADER M.L., VASQUEZ, I. (s.f.)** Valoración de diluyentes de semen ovino. Area de reproducción. CIT/INIA. Madrid, España. Pp 83-87.
- CRUMP J, CRUMP J, 1988.** Stallion ejaculation induced by manual stimulation of the penis. Theriogenology 31, 341-346.
- CRUMP J, CRUMP J, 1994.** Manual semen collection from a Grevy's Zebra stallion (*Equus grevyi*) onset of sperm production. Semen characteristics and cryopreservation of semen, with a comparison to the sperm production from a Grant's Zebra stallion (*Equus burchelliboehmi*). Theriogenology 41, 1011-1021.
- DE LEON G. R.H., SALDAÑA, C.I., GONZALES, M. R.A., ORTEGA H., SALDAÑA I., FLORES K., VIGIL V. 2010.** Evaluación de la viabilidad espermática del semen ovino conservado a 4°C durante diferentes tiempos utilizando un nuevo diluyente. En progreso. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Proyecto Mejoramiento de la Eficiencia Bio-Economica de los Sistemas de producción ovinos y caprinos de Panamá. En Progreso
- DUVERGER, O., MOYA, A., BARBA, F., HERNÁNDEZ, J.J. 1988.** Nuevos diluyentes y descongelantes para semen bovino. Rev. Cub. Cienc Vet. 19:19.
- EL GAAFARY, M.N. 1990.** Diluents for freezing ram semen. Ind. J. Anim. Sci. 60(7): 769-772.
- EVANS, G. AND W.M.C. MAXWELL. 1987.** Salamon's artificial insemination in sheep and goats. Butterworth Pty Ltd. Sydney. 189 p.
- EVANS, G., Y W. M. MAXWELL. 1990.** Steven Salamon. Inseminación Artificial en Ovejas y Cabras. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 204 pp.
- EVANS, G., Y W.M.C. MAXWELL. 1990.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia. Zaragoza, España
- FERNÁNDEZ ABELLA, D.; VILLEGAS, N.; BELLAGAMBA. 1998.** Comparación de la fertilidad obtenida con semen ovino conservado a

5°C utilizando diferentes diluyentes y métodos de inseminación. Producción Ovina SUL 11: 51-62.

FERNÁNDEZ, D., Y N. VILLEGAS.1995. Evaluación de las variaciones estacionales en la producción espermática de cuatro razas ovinas. Revista Argentina de Producción Animal. 15:996 (Abstr).

FERNÁNDEZ-ABELLA, D. y VILLEGAS, N. 1995. Estudio de la fertilidad y prolificidad en primavera, en ovejas sincronizadas con CIDR´G y esponjas de MAP. Bol Téc. Ciencias Biol. 5: 29-34

FERNÁNDEZ-ABELLA, D.H., M.O. PREVE AND N. VILLEGAS. 2003. Insemination time and dilution rate of cooled and chilled ram semen affects fertility. Theriogenology, 60: 21-26.

FERREIRA, N. J., Y D. R. PÉREZ F. 2001. Biotécnicas de la reproducción caprina y ovina. Editorial Fortaleza. Ceará, Brasil.

FURMAN, J.W., BALL, L., SEIDEL, G.E., 1975. Electroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency and length. J. Anim. Sci. 40, 665.

GADEA, J. 2003. Spanish Journal of Agricultural Research.2003(2): pp 17-27.

GALINA C., SALTIEL, A., VALENCIA, J. 1995. Reproducción de los animales domésticos. Cuarta re-impresión. Balderas 95, México D.F. Editorial Limusa.

GARNER, D. L., C. A. THOMAS, C. G. GRAVANCE, C. E. MARSHALL, J. M. DEJARNETTE, Y C. H. ALLEN. 2001. Seminal plasma addition attenuates the dilution effect in bovine sperm. Theriogenology 56:31-40.

GIBBONS, A. Y M. CUETO. 2004. Jornadas de inseminación artificial con semen fresco en ovinos. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA. Bariloche. N° 200.

GIBBONS, A. Y M. CUETO. 2004. Jornadas de inseminación artificial con semen fresco en ovinos. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA. Bariloche. N° 200.

GIBBONS, A., M. CUETO, M. WOLFF, J. ARRIGO Y J.C. GARCÍA VINENT. 1993. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche N° 443.

GIBBONS, A., M. CUETO, M. WOLFF, J. ARRIGO Y J.C. GARCÍA VINENT. 1993. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino.

Manual de divulgación. Comunicación Técnica de Producción Animal del INTA Bariloche No 443

- GIL, J. Y J. OLIVERA. 2005.** Preservación de semen de carnero a 5°C: resultados con diferentes diluyentes para la IA en majadas del Proyecto Merino Fino. Serie de Actividades de Difusión 392. INIA Tacuarembó. Avances obtenidos en el Proyecto Merino Fino del Uruguay: Núcleo Fundacional U.E. Glencoe 1999-2004.
- GÓMEZ-CUÉTARA C, 1996.** Manejo del Semental. En: Equino Aspectos de Cría y Clínica. Colección Ciencias Veterinarias. Consejo General de Colegios Veterinarios de España. Eds. Plubex Studio S.L. Madrid, pp: 61-80.
- GONZÁLEZ-REYNA, A., J. VALENCIA, W. C. FOOTE, Y B. D. MURPHY. 1991.** Hair sheep in México: Reproduction in the Pelibuey sheep. Anim. Bred. Abstr.59:509.
- GORDON, I. 1999.** Reproducción Controlada del Ganado Vacuno y Búfalos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 301 pp.
- GORLACH, A. 1999.** Transferencia de Embriones en el Ganado Vacuno. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 208 pp.
- GUTIERREZ, A.J., PALACIOS, M.M., JIMENEZ, C.J.A., RAMIREZ, G.J.A. 2006.** Agua de coco (*Opuntia sp.*), leche y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. Archivos de Zootecnia. Año/vol. 55 número 209. Universidad de Córdoba. España. Pp 97-100.
- HAFEZ, E. S. E. 2000.** Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7a.Ed. Ed. McGraw-Hill.México, D. F.
- HAMMERSTEDT, R. H., J. K. GRAHAM, Y P. NOLAN. 1990.** Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. J. Androl. 11:73-88.
- HIDALGO-ORDÓÑEZ C.O., TAMARGO M.C., DÍEZ, M.C., S.F.** Análisis del semen bovino. INFORMACIÓN GANADERA. Boletín informativo del SERIDA - N.º 2. Pág. 39-43.
- HUANG, H., RONG, Y.J., CHUN, H.R. 1997.** Effects of diluents and cryoprotectants on cryopreservation of semen and embryos in Taiwan Black goats. Journal of Taiwan Livestock Research, 30: 371-377, 1997.
- ISHAWAR, K.A., MOMON, A.M. 1996.** Embryo transfer in sheep and goats.A Review.Small Rumin. Res. 19:135-45.

- LIU, Z., FOOTE, R.H., 1998.** Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *J. Dairy Sci.* 81, 1868-73.
- LOPEZ, F. P. 1999.** Semen collection and evaluation in rams. Disponible: <http://www.dps.ufl.edu/hansen/asg33351/semencollram1.htm> Accesado; 01/11/ 2012
- LÓPEZ, C. 2001.** Evaluación de diluyentes para la criopreservación de semen ovino. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, Chihuahua. México.
- LOPEZ, G.F., SANCES, G., SANCHO, M., YAÑIZ, J., SANTALORIA, P., GUTIERREZ, R., LOPEZ, C., NUÑEZ, M., NUÑEZ, J., SOLER, C. 2005.** Effect of solid storage at 15°C on subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology* 64; 2:252-260.
- MARTÍNEZ, J., DUVERGER, O., DÍAZ, N., L. INTERIAN., MOLINA, Y., MILANÉS C., GONZÁLEZ-PEÑA D. 2009.** Efecto de la composición del diluyente en la conservación del semen caprino en estado fresco refrigerado. *Ciencia y Tecnología Ganadera* Vol. 3 No. 1, p. 15-19, 2009.
- MARTÍNEZ, JOSEFA., MOLINA, YILIANY, VALDÉS, MAYLIN, INTERIAN, L. 2007.** Un nuevo diluyente para la conservación del semen caprino en estado fresco refrigerado. *Ciencia y Tecnología. Ganadera* 1:127.
- MATEOS E., 1996.** Biotecnología de la Reproducción Equina. En: *Equino Aspectos de Cría y Clínica. Colección Ciencias Veterinarias. Consejo General de Colegios Veterinarios de España. Eds. Plubex Studio S.L. Madrid, pp: 81-100.*
- MAXWELL, W. M, Y L. A. JOHNSON. 1999.** Physiology of spermatozoa at high dilution rates: influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52:1353-1362.
- MAXWELL, W. M. C., A. J. LANDERS, Y G. EVANS. 1994.** Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets straws and minitubes. *Theriogenology*.43:1201-1210.
- MAXWELL, W.M.C. AND S. SALAMON. 1993.** Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fert.Develop.*, 5: 613-638.
- MAXWELL, W.M.C., WELCH, G.R., JOHNSON, L.A. 1997.** Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Develop.* 8:1165-1178, 1997.

- M^c DONNELL SM, LOVE CC, 1991.** Xylacine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology* 36, 73-76.
- M^c DONNELL SM, ODIAN MJ, 1994.** Imipramina and Xilacine-induced ex copula ejaculation in stallion. *Theriogenology* 41, 1005-1010.
- MEDEIROS C, FORELL F, OLIVEIRA A, RODRIGUES J. 2002.** Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 57: 327-344.
- MEJIA G.P., HERNANDEZ, O.G. 1996.** Curso teórico-practico sobre Reproducción aplicada en pequeños rumiantes. Universidad Nacional Autónoma de México. Noviembre 1996. P 28-43
- MENCHACA, A., A. PINCZAK AND D. QUEIROLO. 2005.** Storage of ram semen at 5°C: effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Anim.Reprod.*,2: 195-198.
- MOLINIA F, EVANS G, QUINTANA P, MAXWELL W. 1994.** Effect of monosaccharides and disaccharides in Trisbased diluent on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *AnimReproSci* 36: 113-122.
- MONTES INEIDA. 2007.** Manual de Semen. Centro de Investigación para el Mejoramiento Animal y Ganadería Tropical. C.I.M.A.G.T. La Habana Cuba. Inédito.
- NAGY, SINKOVICS, KOVACS. 2002.** Viability and acrosome integrity for rabbits spermatozoa processed in gelatin supplemented extender. *Anim. Reprod.Sci.* 70. 283-6
- NOILES, E. E., J. L. BAILEY, Y B. T. STOREY. 1995.** Temperature dependence of the water permeability, Lp, of murine sperm show a discontinuity between 4° and 0°C. *Criobiology* 32:220-238.
- NUNEZ, J.F. 1993.** El agua de coco como diluyente del semen caprino. *Revista Científica FVC. LUZ* (3): 269-272.
- OLIVERA, J., A. GIL, J. GAMARRA, V. TEIXEIRA Y S. FIERRO. 2005.** I- Preservación seminal para la IA cervical en majadas del Proyecto Merino Fino: semen refrigerado (24 y 48 h). Programa de apoyo y vinculación con sector productivo.
- PALACIOS A. 1994.** Aspectos fisiológicos acerca del congelamiento de semen. *Revista Veterinaria México.* 25(3) pp. 207-210

- PALOMINO, LILY, CAMACHO, J., WILFREDO, S., HUANTA, L. FALCÓN, N.P. 2001.** Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema. Rev. Inv. Vet. Perú 12(1):13.
- PAULENZ, H., S. LENNART, Å. TORMOD, H.F. OVE AND A.B. KJELL. 2003.** Effect of milk- and TRIS-based extenders on the fertility of sheep inseminated vaginally once or twice with liquid semen. Theriogenology, 60: 759-766.
- PELLICER-RUBIO, M.T., COMBARNOUS, Y. 1994.** Efecto negativo sobre la viabilidad espermática de la enzima triacilglicerol lipasa presente en la secreción de las glándulas bulbo uretrales del macho cabrío. En: 7ma. Jorn.Int. Reprod.Anim., Murcia,. 1994. p. 128
- PELLICER-RUBIO, M.T., MAGALLON, T., COMBARNOUS, Y. 1997.** Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a bulbourethral 60-Kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. Biology of Reproduction, 57:1023-1031, 1997.
- PÉREZ Y PÉREZ F. 1999.** Reproducción animal: inseminación artificial y trasplante de embriones. Barcelona: Ed. Científico Médica. 420 p.
- PHILLIPS, P.H., LARDY, H.A.P. 1940.** A yolk-buffer pabulum for the preservation of semen bull. J. Dairy Sci. 23:399.
- PICKETT, B.W., BACK, D.G., 1973.** Procedures for preparation, collection, evaluation and insemination of stallion semen. Ft. Collins, Col., Colorado State University, General Series 934, 501-531.
- RITAR, A.J., SALAMON, S. 1982.** Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen- thawed spermatozoa of the angora goat Aust J. Biol. Sci. 35: 305-12, 1982.
- SALAMON S. 1990.** Inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia. España. 1-171.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. 1995.** Frozen Storage of ram semen. II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. Anim. Reprod Sci. Review. Anim. Reprod. Sci. 38: 1-36.
- SALAMON, S., MAXWELL, W.M.C. 2000.** Storage of ram semen. Anim. Reprod Sci. Review. Anim. Reprod.Sci. 62:77-111.
- SALDAÑA, C.I. y ORTEGA, H. 2009.** Comportamiento de ovinos Pelibuey en sistemas de producción en pastoreo. Boletín Técnico. IDIAP. Panamá. 12 p

- SALISBURY, G., VAN DERMARK, N., LODGE, J. 1978.** Fisiología de la reproducción e inseminación artificial de los bóvidos. Segunda edición. Zaragoza, España. Editorial Acribia.
- SÁNCHEZ-PARTIDA GL, WINSOR DP, EPPLESTON J, SETCHELL BP, CHISHOLM WM. 1999.** Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozenthawed ram semen. J Androl 20: 280- 288.
- SORENSEN, A. M. 1986.** Reproducción Animal. Principios y Prácticas. 2ª Ed. Editorial Mc Graw-Hill, México.
- SORENSEN, JR. A. M. 1982.** Reproducción animal: Principios y Prácticas. 1ª Edición. Editorial McGraw-Hill. Naucalpan, Méx. 539 pp
- TANAKA, A.; TAKAGI, Y.; NAKAGAWA, K.; FUJIMOTO, Y.; HORI, T.; TSUTSUI, T. 2000.** Artificial insemination using fresh semen in cats. J. Vet. Med. Sci. 62: 1163-167. 2000.
- THWAITES, G. J. 1995.** Effect of undernutrition on the size and tone of the ram ´stestes. Small Ruminant Research. 16:283-86.
- TRON, J.L., ARBIZA, S.I. 2004.** Sistemas de apareamiento e inseminación artificial en ovinos. UNAM. Cuautitlan, México. Pp 65-69.
- TSUTSUI, T.; TANAKA, A.; HORI, T. 2001.** Intratubal insemination with fresh semen in cats. J. Reprod. Fertil., Suppl. 57: 347-351. 2001.
- TULI, R. K., Y W. HOLTZ. 1994.** Efect of glicerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT-release from Boer-goatsprematzoa. Theriogenology 42:547-555.
- VAZQUEZ, J.M., GARRIDO, C., MAZARIEGOS, V., SALVADOR, S., LEGAZ, E., FUENTE, L.F. 2010.** Fertilidad del semen ovino conservado a +5°C durante 24 horas. XXXV CONGRESO DE LA SEOC .Valladolid 2010. Pág 146-149.
- VIDAMENT, M., A.M. DUPERE, P. JULIENNE, A. EVAIN, P. NOUE AND E. PALMER. 1997.** Equine frozen semen: freezability and fertility field results. Theriogenology, 48: 907-917.
- WALLANCE, M.J. 1992.** Artificial Insemination and embryo transfer. Progress in sheep and goats Research. Ed. A.W: Speedy CAB International. Wallingford- U.K.

WATSON, F. P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-891.

YÁNIZ, J., MARTÍ, J.I., SILVESTRE, M.A., FOLCH, J., SANTOLARIA, P., ALABART, J.L., LÓPEZ-GATIUS, F. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 2005, v. 64, 1844 -1851.

YATES DJ, WHITACRE MD, 1993. Inseminación artificial en el equino. En: *Veterinary Clinics of North America. (Equine practice)*. WB Saunders Company. Eds. Intermedica. Philadelphia, pp: 173-192.

ZARCO, L., Y M. BOETA. 2000. Reproducción Equina. 3a ed. Litográfica AISLIE. D.F., Méx. 204 pp.