



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales

Efecto del uso conjunto de plasma seminal bovino y extracto antioxidante de nopal  
como aditivo para la congelación de espermatozoides ovinos

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z. Ana Laura Zárraga González

Dirigida por:

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Santiago de Querétaro, Qro. Octubre de 2021.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ciencias Naturales  
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Efecto del uso conjunto de plasma seminal bovino y extracto antioxidante de nopal  
como aditivo para la congelación de espermatozoides ovinos

TESIS

Que como requisito para obtener el Grado de  
Maestra en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta

M.V.Z. Ana Laura Zárraga González

Dirigida por:

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila

Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila  
Presidente

Dr. Luis Javier Montiel Olguín  
Secretario

Dr. Héctor Jiménez Severiano  
Vocal

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón  
Suplente

M.C. Eleazar Pérez Trejo  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Octubre 2021  
México

**DEDICATORIA**

A mi abuelo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia y a cada una de las personas que estuvieron apoyándome y alentándome durante este tiempo.

A cada uno de los integrantes de mi comité tutorial, por apoyarme con sus conocimientos durante la realización de esta tesis, especialmente al Dr. Héctor Raymundo Vera Ávila.

A la Universidad Autónoma de Querétaro y a la Facultad de Ciencias Naturales.

A CONACYT por el apoyo económico recibido para la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Reproducción Animal Campus Amazcala de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

A todos los que conforman el programa de la Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable, que de manera directa o indirectamente apoyaron este trabajo.

A los médicos y el personal de Limper Congelaciones Profesionales S.A. de C.V. por el apoyo y la paciencia recibidos.

## RESUMEN

Las células espermáticas del ovino en comparación con otras especies como los bovinos son muy susceptibles a sufrir daños que comprometen sus funciones durante la criopreservación. Para contrarrestar estos daños es necesario buscar alternativas que permitan tener un incremento de la calidad espermática post-descongelado. En este trabajo de investigación se evaluó el efecto que se produce al adicionar conjuntamente plasma seminal heteroespecífico como estabilizador de la membrana y extracto antioxidante de nopal como promotor del incremento de la motilidad progresiva, con respecto a la calidad post-descongelado de espermatozoides de carnero criopreservados. Los niveles de adición fueron: T0 (control negativo, sin adiciones), T1 (plasma seminal al 5%), T2 (extracto de nopal al 0.5%), T3 (plasma seminal al 5% más extracto de nopal al 0.5%), los cuales se adicionaron al diluyente comercial previo al procesamiento y congelación del semen. Se evaluaron motilidad, motilidad progresiva y cinética espermática por medio de un sistema de análisis de semen auxiliado por computadora (CASA). Además, se realizó evaluación de la integridad funcional de la membrana espermática por medio de la prueba de expansión hipo-osmótica (HOST). De acuerdo con los resultados obtenidos se observó un efecto de interacción significativo ( $P=0.03$ ) entre los factores plasma seminal y extracto de nopal (PS x EN) sobre la concentración de células espermáticas al descongelado, el cual fue mayor en el grupo con adición de 0.5% de extracto de nopal (151.78 M/ml) con respecto al grupo control (118.34 M/ml). Se observaron efectos significativos ( $P\leq 0.05$ ) en la interacción PS x EN sobre el número total de espermatozoides motiles y el número de espermatozoides con motilidad progresiva. La adición conjunta de plasma seminal y extracto antioxidante de nopal disminuyó ( $P\leq 0.05$ ) el número total de espermatozoides motiles con respecto al grupo control (47.27 vs.  $71.41 \pm 17.23$  M/ml), mientras que la adición de extracto antioxidante de nopal aumentó el número de espermatozoides con motilidad progresiva en comparación

con el control (30.98 vs.  $18.76 \pm 7.57$  M/ml). Por otro lado, en la evaluación de la cinética espermática post-descongelado en espermatozoides motiles totales, la velocidad curvilínea (VCL) y la velocidad media del trayecto (VAP) disminuyeron ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó el extracto de nopal en comparación con el grupo al que no fue agregado ( $140.36$  vs.  $163.85 \pm 11.96$   $\mu\text{m/s}$  y  $74.32$  vs.  $80.87 \pm 5.48$   $\mu\text{m/s}$  para VCL y VAP en los grupos con y sin adición de extracto antioxidante de nopal). Por el contrario, el índice de linealidad (LIN), el índice de rectitud (STR) y el índice de oscilación (WOB) se vieron incrementados por la adición de extracto de nopal (EN) con respecto al grupo control en el que no fue adicionado el extracto ( $47.53$  vs.  $42.07 \pm 1.79\%$ ,  $81.50$  vs.  $72.88 \pm 1.19\%$  y  $53.35$  vs.  $49.30 \pm 1.33\%$  para LIN, STR y WOB en los grupos con y sin extracto antioxidante de nopal). Mientras tanto, para la evaluación de las variables de cinética espermática post-descongelado en los espermatozoides criopreservados únicamente con movimiento progresivo se observó que la VSL, VAP, LIN y STR incrementaron ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó extracto antioxidante de nopal ( $122.58$  vs.  $114.31 \pm 3.71$   $\mu\text{m/s}$ ,  $135.90$  vs.  $128.99 \pm 4.15$   $\mu\text{m/s}$ ,  $52.01$  vs.  $48.03 \pm 1.87\%$  y  $90.27$  vs.  $88.58 \pm 0.50\%$  para las variables VSL, VAP, LIN Y STR respectivamente en los grupos con y sin extracto de nopal), a diferencia de la VCL la cual no fue modificada por este factor. De manera contraria WOB se vio disminuido ( $P \leq 0.05$ ) por la adición de extracto antioxidante de nopal ( $178.19 \pm 4.30\%$ ) en comparación con el grupo control al que no fue adicionado ( $186.19 \pm 4.30\%$ ). En cuanto al porcentaje de espermatozoides con integridad funcional de membrana (H+) se encontró un efecto del extracto de nopal ( $P=0.002$ ), el porcentaje de células espermáticas H+ fue ligeramente menor en el grupo al que se le añadió extracto antioxidante de nopal en comparación con el grupo control ( $33.31$  vs.  $35.91 \pm 1.57\%$ ). La utilización de plasma seminal y la combinación de ambos aditivos plasma seminal y extracto de nopal durante la congelación de espermatozoides ovinos no proveen ningún efecto positivo sobre las variables de motilidad e integridad de membrana posterior a la descongelación, mientras que la adición de extracto antioxidante de nopal durante la criopreservación de

espermatozoides ovinos provee un incremento potencial de la calidad biológica post-descongelado de las células espermáticas.

**Palabras clave:** criopreservación, integridad de membrana, motilidad progresiva, *Opuntia ficus*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## ABSTRACT

Sheep sperm cells, compared to other species such as bovines, are highly susceptible to damage that compromises their functions during cryopreservation. To counteract these damages, it is necessary to look for alternatives that allow an increase in post-thaw sperm quality. In this research work, the effect produced by jointly adding heterospecific seminal plasma as a membrane stabilizer and nopal antioxidant extract as a promoter of the increase in progressive motility was evaluated, concerning the post-thaw quality of cryopreserved sheep spermatozoa. The addition levels were: T0 (negative control, no additions), T1 (5% seminal plasma), T2 (0.5% nopal extract), T3 (5% seminal plasma plus 0.5% nopal extract), which were added to the commercial diluent before the processing and freezing of the semen. Motility, progressive motility, and sperm kinetics were evaluated employing a computer-assisted semen analysis system (CASA). In addition, evaluation of the functional integrity of the sperm membrane was carried out through the hypo-osmotic expansion test (HOST). According to the results obtained, a significant interaction effect ( $P=0.03$ ) was observed between the seminal plasma and the nopal extract factors (PS x EN) on the concentration of sperm cells upon thawing, which was greater in the group with addition of 0.5% nopal extract (151.78 M/ml) vs. the control group (118.34 M/ml). Significant effects ( $P\leq 0.05$ ) were observed in the PS x EN interaction on the total number of motile sperm and the number of progressively motile sperm. The joint addition of seminal plasma and nopal antioxidant extract decreased ( $P\leq 0.05$ ) the total number of motile spermatozoa concerning the control group (47.27 vs.  $71.41 \pm 17.23$  M/ml), while the addition of nopal antioxidant extract increased the number of spermatozoa with progressive motility compared to the control (30.98 vs.  $18.76 \pm 7.57$  M/ml). On the other hand, in the evaluation of post-thaw sperm kinetics in total motile spermatozoa, curvilinear velocity (VCL) and mean path velocity (VAP) decreased significantly ( $P\leq 0.05$ ) when nopal extract was added, in comparison with the group to which it was not added



(140.36 vs.  $163.85 \pm 11.96$   $\mu\text{m/s}$  and 74.32 vs.  $80.87 \pm 5.48$   $\mu\text{m/s}$  for VCL and VAP in the groups with and without the addition of nopal antioxidant extract). On the contrary, the linearity index (LIN), the straightness index (STR) and the oscillation index (WOB) were increased by the addition of nopal extract (EN) to the control group in which it was not added the extract (47.53 vs.  $42.07 \pm 1.79\%$ , 81.50 vs.  $72.88 \pm 1.19\%$  and 53.35 vs.  $49.30 \pm 1.33\%$  for LIN, STR and WOB in the groups with and without antioxidant extract of nopal). Meanwhile, for the evaluation of post-thaw sperm kinetics variables in cryopreserved sperm only with the progressive movement, it was observed that VSL, VAP, LIN, and STR increased ( $P \leq 0.05$ ) when nopal antioxidant extract was added ( $122.58$  vs.  $114.31 \pm 3.71$   $\mu\text{m/s}$ ,  $135.90$  vs.  $128.99 \pm 4.15$   $\mu\text{m/s}$ ,  $52.01$  vs.  $48.03 \pm 1.87\%$  and  $90.27$  vs.  $88.58 \pm 0.50\%$  for the variables VSL, VAP, LIN, and STR respectively in the groups with and without extract de nopal), unlike the VCL which was not modified by this factor. On the contrary, WOB was decreased ( $P \leq 0.05$ ) by the addition of antioxidant extract of nopal ( $178.19 \pm 4.30\%$ ) compared to the control group to which it was not added ( $186.19 \pm 4.30\%$ ). Regarding the percentage of sperm with functional membrane integrity (H+), an effect of the nopal extract was found ( $P = 0.002$ ), the percentage of H+ sperm cells was slightly lower in the group to which antioxidant extract of nopal was added in comparison with the control group ( $33.31$  vs.  $35.91 \pm 1.57\%$ ). The use of seminal plasma and the combination of both additives seminal plasma and nopal extract during the freezing of sheep sperm does not provide any positive effect on the variables of motility and membrane integrity after thawing, while the addition of antioxidant extract of nopal during the cryopreservation of sheep sperm provides a potential increase in the post-thaw biological quality of sperm cells.

**Keywords:** cryopreservation, membrane integrity, progressive motility, *Opuntia ficus*.

## ÍNDICE

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 La ovinocultura en el mundo y en México.....	3
2.2 Características reproductivas del carnero.....	7
2.2.1 Pubertad.....	8
2.2.2 Estacionalidad.....	9
2.2.3 Control hormonal del comportamiento sexual en el carnero .....	11
2.2.4 Capacidad reproductiva .....	12
2.3 El espermatozoide .....	13
2.3.1 Espermatogénesis.....	14
2.3.2 Estructura del espermatozoide.....	19
2.4 Recolección seminal.....	21
2.4.1 Características del semen.....	21
2.4.2 Selección y evaluación del semental.....	23
2.4.3 Colección de semen.....	24

2.4.4	Evaluación de la calidad espermática del semen.....	25
2.5	Criopreservación.....	27
2.5.1	Crioprotectores.....	28
2.5.2	Efectos perjudiciales de la criopreservación .....	29
2.5.3	Shock térmico.....	31
2.5.4	Estrés osmótico.....	32
2.5.5	Estrés oxidativo.....	34
2.6	Evaluación de la calidad espermática post-descongelado.....	36
2.6.1	Motilidad progresiva .....	37
2.6.2	Concentración espermática.....	38
2.6.3	Análisis de semen asistido por computadora (CASA) .....	39
2.6.4	Sobrevivencia espermática (viabilidad espermática).....	43
2.6.5	Morfología espermática.....	44
2.6.6	Integridad funcional de la membrana espermática.....	46
2.7	Plasma seminal .....	47
2.7.1	Componentes químicos del plasma seminal y su función .....	48
2.7.2	Adición de proteínas de plasma seminal durante la preservación de espermatozoides ovinos.....	52
2.8	Extracto antioxidante de nopal.....	56
2.8.1	Características del nopal.....	56
2.8.2	Adición de antioxidantes en la congelación de espermatozoides.....	58
2.8.3	Efectos de la adición de extracto antioxidante de nopal durante la preservación de espermatozoides ovinos .....	61
III.	OBJETIVOS.....	63
3.1	Objetivo General.....	63

3.2	Objetivos Específicos.....	63
IV.	HIPÓTESIS.....	63
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
5.1	Ubicación experimental.....	64
5.2	Obtención de plasma seminal bovino.....	64
5.3	Obtención de extracto acetónico de nopal.....	65
5.4	Diseño experimental.....	66
5.5	Colección, evaluación y procesamiento de semen.....	66
5.6	Evaluación de las muestras.....	68
5.7	Análisis estadístico.....	68
VI.	RESULTADOS.....	69
6.1	Concentración espermática.....	69
6.2	Motilidad espermática y sus características.....	69
6.3	Integridad de la membrana celular de los espermatozoides.....	72
VII.	DISCUSIÓN.....	73
VIII.	CONCLUSIONES.....	78
IX.	LITERATURA CITADA.....	79
X.	APÉNDICE.....	101

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1.- Composición y propiedades químicas del semen de carnero.....	22
2.- Características de movimiento medidas en espermatozoides de carnero mediante sistema CASA.....	42
3.- Composición del plasma seminal en bovinos y ovinos.....	48
4.- Análogos de proteínas BSP aislados del plasma seminal en diferentes especies.....	50
5.- Concentración de los análogos de proteínas BSP en el plasma seminal de distintas especies.....	50
6.- Diseño experimental para determinar el efecto de adición de plasma seminal y extracto de nopal.....	66
7.- Efecto de la adición de plasma seminal (PS), extracto de nopal (EN) y su interacción (PS x EN) sobre la concentración espermática (CE) al descongelado en millones de espermatozoides de carnero criopreservados por mililitro.....	69
8.- Efecto de la adición de plasma seminal (PS), extracto de nopal (EN) y su interacción (PS x EN) en el número total de espermatozoides motiles (MT) y el número de espermatozoides con motilidad progresiva (MP), en millones de espermatozoides de carnero criopreservados por mililitro.....	70
9.- Efecto de la adición de plasma seminal (PS), extracto de nopal (EN) y su interacción (PS x EN) en el porcentaje de espermatozoides de carnero motiles progresivos (MP) criopreservados.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1.- Distribución de la producción mundial de carne de ovino en canal por continente durante 2018.....	3
2.- Distribución de la producción mundial de carne de ovino en canal por país durante 2019.....	5
3.- Distribución de los principales estados productores de carne de ovino durante 2020 en México.....	6
4.- Diagrama del tracto reproductor del carnero, disección lateral izquierda.....	8
5.- Representación esquemática de la estructura del espermatozoide.....	13
6.- Distribución de las células espermáticas en los túbulos seminíferos.....	16
7.- Conteo de la concentración espermática mediante hematocitómetro.....	39
8.- Muestra de semen de carnero analizado con sistema CASA.....	40
9.- Variables de movimiento medidas por los sistemas CASA.....	41
10.- Frotis seminal teñido con Eosina-Nigrosina.....	43
11.- Anormalidades de las células espermáticas.....	44
12.- Frotis de muestra espermática teñido con eosina-nigrosina observado en microscopia de campo brillante.....	45
13.- Representación esquemática de los cambios morfológicos en los espermatozoides sometidos a estrés hipo-osmótico.....	46

## I. INTRODUCCIÓN

A lo largo de varias décadas se han estudiado aspectos importantes en la criopreservación de semen ovino, sobre todo lo relacionado con mejoras en los protocolos de dilución y congelación. Lo anterior, tendiente a aumentar la cantidad de dosis de inseminación por eyaculado y así facilitar el uso de la inseminación artificial, como método para amplificar el uso de reproductores genéticamente sobresalientes y por lo tanto su impacto sobre la población.

La importancia de la criopreservación de espermatozoides ovinos radica en mantener la fisiología y morfología del espermatozoide en estado óptimo para la fecundación (Juyena & Stelletta, 2012). En dicho proceso las células espermáticas del ovino son muy susceptibles a sufrir daños que comprometen sus funciones (Ezzati *et al.*, 2020). Por lo tanto, es necesario buscar alternativas que nos permitan reducir estos daños adicionando agentes crioprotectores y aditivos que permitan tener un incremento en la calidad espermática post-descongelado.

En investigaciones previas se ha encontrado que la adición de plasma seminal de bovino en el procesamiento de semen de carnero para su congelación mejora la estabilidad de las membranas de las células espermáticas (Vargas-Menéndez *et al.*, 2019) y que la adición de extracto antioxidante de nopal mejora su motilidad progresiva (Olvera-Bermúdez *et al.*, 2019), en ambos casos posterior al descongelado.

En este estudio se pretende evaluar el efecto que se produce al adicionar conjuntamente esos aditivos, determinando características como la motilidad e integridad de la membrana celular de los espermatozoides de carnero sometidos a congelación/descongelación.

Uno de los aspectos más importantes productiva y económicamente en las unidades de producción ovina es la eficiencia reproductiva, de manera que al incrementar la sobrevivencia y funcionalidad espermática posterior al

congelado/descongelado, se podrá obtener un mayor número de dosis para inseminación por eyaculado, lo cual potencializará el uso como reproductores de carneros genéticamente sobresalientes; se estima que, de cumplirse la hipótesis experimental, el incremento sería de un 17 a 18 %.

En México la ovinocultura involucra alrededor de 500 000 unidades de producción, donde es limitado el uso de herramientas que permitan el mejoramiento de la productividad, por lo tanto, eventualmente esto podría beneficiarlos de manera directa.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## II. ANTECEDENTES

### 2.1 La ovinocultura en el mundo y en México

Se ha observado un incremento en las poblaciones ovinas durante los últimos años, debido a la creciente demanda mundial de carne y leche, factores que aunados al creciente interés científico y tecnológico en áreas como la salud, nutrición y reproducción ovina han incrementado los beneficios económicos en estas unidades productivas (Mazinani & Rude, 2020).

Durante 2018 la producción mundial de carne de ovino en canal se estimó en 15.24 millones de toneladas, presentando un crecimiento del 0.6% comparado con el año anterior. La producción por continente se distribuyó de la siguiente manera Asia 58.9%, África 21.6%, Unión Europea y Rusia 8.1%, Oceanía 7.8% y América 3.5% (Figura 1). Dentro de los principales países productores del mundo durante este año se encuentran China con 30.9%, seguido de la Unión Europea con 6.2%, Australia con 4.9%, India y Pakistán con 4.8% y 3.1% respectivamente (FAO, 2019a).



**Figura 1.** Distribución de la producción mundial de carne de ovino en canal por continente durante 2018 (Datos de FAO, 2019a; Zárraga, 2021).

Mientras que en México se contabilizaron 8 683 835 cabezas de ganado ovino y se produjeron 62 939 toneladas de carne durante 2018, los principales productores fueron el Estado de México con 14.4% de la producción, Hidalgo con 10.8%, Veracruz 8.2%, Zacatecas 7.3%, Puebla y Jalisco ambos con 6.9%, con consumo estimado nacional per cápita de 0.8 kg por año. El consumo de cárnicos ovinos y sus derivados se encuentran por debajo de otras variedades, debido a su costo que es elevado comparado con los de res o pollo, aunque cabe destacar que la producción nacional no satisface completamente las necesidades del consumidor, ya que en 2017 el 16% fue producto de importación (SIAP, 2018a).

En el estado de Querétaro se registró un total de 145 908 cabezas de ganado ovino en 2018, mientras que la producción de carne ovina durante el mismo año fue equivalente a 1 007.95 toneladas, participando con el 1.8% del total de cabezas del país (SIAP, 2018b). Según lo reportado por Castelán (2007) las principales razas que predominan en el territorio mexicano son Black Belly, Charollais, Dorper, Dorset, East Friesian, Hampshire, Katahdin, Pelibuey, Rambouillet, Romanov, Saint Croix y Suffolk.

De acuerdo con estudios previos en la zona del centro de México los rebaños que predominan son de pastoreo extensivo y cuentan con un promedio de 64 cabezas de ovinos de los cuales el 2.2% son sementales (Vázquez *et al.*, 2018).

En 2019 la producción mundial de carne en canal de ovino llegó a 15.98 millones de toneladas, los principales países productores fueron China 30.4%, la Unión Europea 5.8%, Australia 4.7%, India 4.6% y Pakistán 3.3% (Figura 2), durante este año México aportó el 0.7% del total global (FAO, 2020a).

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) estimó que durante 2019 la población ganadera ovina nacional correspondía a 8 708 246 cabezas, de las cuales 145 908 cabezas se encontraban en el estado de Querétaro. La producción nacional de carne en canal de ovino fue de 64 031 toneladas, mientras tanto durante el mismo año en Querétaro la producción fue de 1 065

toneladas, lo cual representó el 1.66% del total nacional. Los estados con mayor productividad fueron México (14.5%), Hidalgo (10.5%), Veracruz (8.5%), Jalisco (7%), y Puebla (6.9%). Comparativamente con el año anterior, se obtuvo un incremento de 1 092 toneladas de carne en canal (SIAP 2019b). Durante 2019 la carne de ovino en México se comercializó en \$91.20 (SIAP, 2019c).



**Figura 2.** Distribución de la producción mundial de carne de ovino en canal por país durante 2019 (Datos de FAO, 2020a; Zárrega, 2021).

Colby (2015) menciona que el crecimiento económico y poblacional favorece la perspectiva del aumento del consumo de cárnicos y subproductos ovinos, y por lo siguiente un incremento en la producción, actualmente el sistema pastoril es el que predomina en la ovinocultura, lo que hace factible al aprovechamiento de espacios que pueden ser destinados a este tipo de producciones. Se espera que el mercado mundial de carne de ovino aumente hasta 1.9% anual en los siguientes años.

Se estima según el panorama mundial de mercado que la producción total de carne de ovino para los años 2019 y 2020 se encontrara en 15.3 millones de toneladas (FAO, 2019b).

La FAO esperaba que para el año 2020 se mantuvieran altos los precios de carne de ovino debido a la reducción de la oferta causada por la disminución de los rebaños, aspecto que limita comercialmente a Australia y a Nueva Zelanda dos de los principales exportadores en el mundo (OCDE/FAO, 2019). Aunque el incremento de la producción en todos los sectores cárnicos se vio afectado de manera negativa por las afecciones en el mercado ocasionadas por la COVID19 se pronosticó que la producción mundial de carne de ovino se encontraría alrededor de 16.2 millones de toneladas (FAO, 2020b).

De acuerdo al resumen nacional emitido por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en 2020 se produjeron 64 758 toneladas de carne de ovino en canal. Los estados del país con mayor producción durante este año fueron México 14.2%, Hidalgo 10.4%, Veracruz 8.7%, Jalisco 7.3% y Puebla 6.8%, mientras que Querétaro represento apenas el 1.63% del total nacional, equivalente a 1 053 toneladas (Figura 3). Durante este año el precio por kilo de carne de ovino se comercializó en \$93.35 (SIAP, 2020b).



**Figura 3.** Distribución de los principales estados productores de carne de ovino durante 2020 en México (Datos de SIAP, 2020; Zárraga, 2021).

Para el año 2021 se pronostica que el comercio mundial de carne de ovino decrezca un 0.8%, lo cual se traduce en poco más de un millón de toneladas. Se prevé que el suministro de Nueva Zelanda y Reino Unido disminuya, mientras tanto las importaciones provenientes de China aumentaran (FAO, 2021).

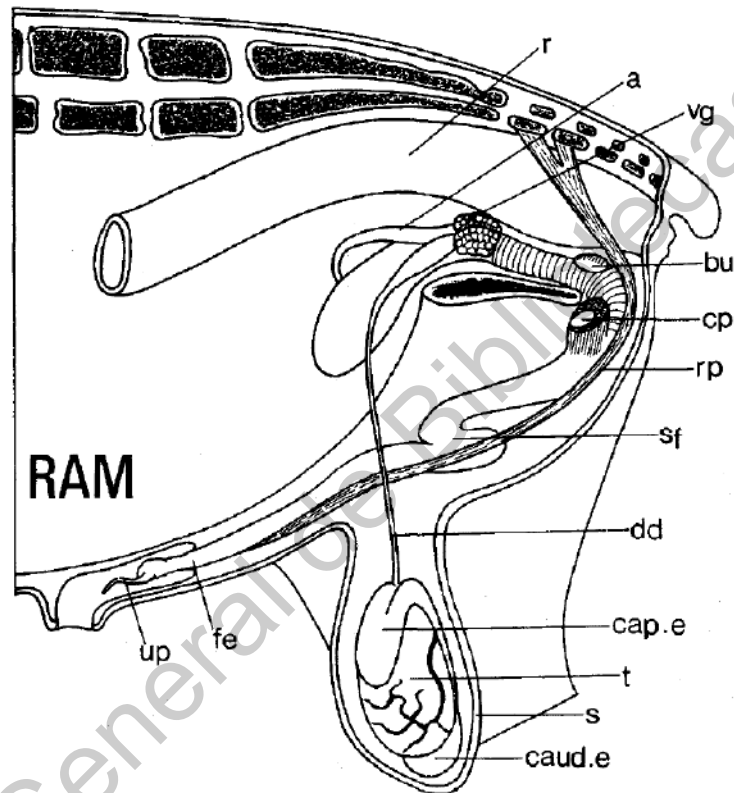
## 2.2 Características reproductivas del carnero

Los órganos reproductores que conforman el aparato reproductor del macho son los encargados de realizar tres funciones principales, la primera es la producción de espermatozoides (espermatogénesis) que se lleva a cabo en los testículos; en segundo lugar, la maduración, almacenamiento y transporte de las células espermáticas y la tercera es el depósito de semen dentro del tracto genital de la hembra. Mientras que las funciones de las hormonas del macho son: el mantenimiento de la espermatogénesis, la presencia del comportamiento masculino y por último el desarrollo de las características sexuales secundarios (Tulsiani, 2003; Noakes *et al.*, 2009).

Schatten & Constantinescu, (2007) describen que el sistema reproductor de carnero está constituido por el escroto, los testículos, el epidídimo, el conducto deferente, el cordón espermático y sus tunicas, las glándulas accesorias (ampollas de los conductos deferentes, bulbouretrales o de Cowper, próstata, vesículas seminales), el pene, el prepucio y por último la uretra (Figura 4).

Cada uno de los testículos en el carnero adulto tienen una longitud de 7.5 a 11.5 cm, un diámetro que va de los 3.5 a 6.8 cm y un peso aproximado de 200 a 400 g. Los túbulos seminíferos llegan a tener una longitud de hasta 4 000 m. Con respecto a los testículos la cabeza del epidídimo se encuentra en una posición dorsal, mientras que el cuerpo se distribuye de manera caudal-medial, y la cola se localiza ventralmente a ellos. Las vesículas seminales tienen forma lobulada y una longitud de 4 a 5 cm. El cuerpo de la próstata en los carneros se encuentra ausente,

esta glándula se encuentra difundida en gran parte sobre la uretra. El pene del ovino es fibroelástico con flexura sigmoidea desarrollada, una longitud aproximada de 30 cm, un diámetro de 1.5 a 2 cm, el glande mide de 5 a 7.5 cm, mientras que el proceso uretral se encuentra de 4 a 5 cm más allá del glande (Shukla, 2011).



**Figura 4.** Diagrama del tracto reproductor del carnero, disección lateral izquierda. r, recto; a, ampolla del conducto deferente; vg, glándula vesicular; bu, glándula bulbouretral; cp, pilar izquierdo del pene; rp, músculo retractor el pene; sf, flexura sigmoidea; dd, conducto deferente; cap.e, cabeza del epidídimo; t, testículo; s, escroto; caud.e, cola del epidídimo; fe, pene; up, proceso uretral. (Adaptado de Popesko 1968; Hafez & Hafez, 2000).

### 2.2.1 Pubertad

Liu & Ott (2018) definen como pubertad a la edad en la cual se vuelven funcionales los órganos reproductores del carnero y las características sexuales

secundarias son desarrolladas, por lo tanto, es posible lograr una reproducción exitosa, aunque con una capacidad de servicio limitada debido a que presentan menor libido y la concentración espermática también se encuentra disminuida. En los machos ovinos se alcanza la pubertad entre los 5 y 8 meses de edad, correspondiente a la etapa en la que se encuentran entre el 50 y 60% de su peso adulto.

Durante la pubertad la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) induce cambios en la secreción de la hormona luteinizante (LH), proceso mediante el cual se produce una cascada de eventos como un incremento considerable en la espermatogénesis, tamaño y maduración testicular, además del comienzo de las conductas de apareamiento (Youngquist & Threlfall 2017).

Durante el periodo de desarrollo de carneros influyen de manera importante factores como la genética, la raza, la temporada de nacimiento, alimentación y el ambiente social en el que se cría a los animales, se ha observado que características como el vínculo que se tiene con la madre durante esta etapa o la presencia de hembras tiene consecuencias directas en el desempeño y comportamiento sexual en carneros adultos. Por lo tanto, es fundamental un manejo correcto de los sementales durante la etapa de desarrollo, para que estos puedan alcanzar su máximo rendimiento como futuros reproductores (Liu & Ott, 2018; Ungerfeld, 2018).

### **2.2.2 Estacionalidad**

Una consecuencia evolutiva en la especie ovina es la estacionalidad reproductiva, la cual es una característica que permite que el nacimiento de las crías ocurra cuando existe alta disponibilidad de alimento, por lo tanto, existe mayor probabilidad de supervivencia, esto ocurre generalmente durante la primavera en lugares de clima templado (Ungerfeld, 2018).

Fenómenos ambientales como el fotoperiodo afectan de manera fundamental los ciclos reproductivos en la especie ovina, los estudios realizados por Arellano *et al.* (2017) determinaron que los cambios en la duración de las horas luz presentan variaciones de tipo hormonal que regulan la actividad gonadal.

La luz del día es captada por la retina del ojo y luego a través del nervio óptico trasmite esta información que llega al núcleo supraquiasmático, luego al núcleo paraventricular y a la médula espinal, hasta llegar a la glándula pineal, que se encarga de convertir esta señal en un impulso hormonal secretando melatonina durante los periodos de ausencia de luz. Los ovinos se caracterizan por ser reproductores durante los días cortos debido a que la melatonina estimula en el hipotálamo anterior la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (Gn-RH), la cual fomenta a su vez la secreción de gonadotropinas y el posterior inicio de la actividad sexual (Orihuela, 2014).

De manera que la activación del eje reproductivo desencadena el reinicio de la actividad ovárica en la hembra y el aumento de la libido en el macho ocasionada por el incremento de la producción de testosterona en los testículos (Perkins & Roselli, 2007). Este evento desencadena que durante la estación reproductiva el diámetro de los túbulos seminíferos, el epidídimo, la cantidad de espermatogonias presentes en los túbulos seminíferos aumenten, al igual que el peso y tamaño de las glándulas sexuales accesorias (Ungerfeld, 2018).

Orihuela (2014) afirma que las hembras son mayormente afectadas por el fotoperiodo en comparación con el macho, ya que se ha observado que durante los meses correspondientes a días largos la libido se ve disminuida, pero no es eliminada por completo, al igual que la espermatogénesis, de manera que, aunque se observa un decremento su capacidad fecundante se mantiene durante todo el año.

Se debe considerar que basándonos al área geográfica varía la época reproductiva, aunque los carneros no presentan una restricción del apareamiento,



consecuentemente surgen cambios en la fisiología testicular lo que origina una disminución en la producción espermática y su calidad, además existen otros factores que pueden alterar las variaciones neuroendocrinas que regulan la actividad reproductiva como la alimentación, el estrés, la temperatura, el estado de salud, la raza y la edad (Arellano *et al.*, 2017).

Estudios previos realizados por Fiser *et al.* (1983), describen que existen varios factores que determinan la calidad del semen de los carneros, entre ellos se encuentra la influencia que ejerce el fotoperiodo, la raza, la localización geográfica y la temperatura. También reportaron que la fertilidad de los espermatozoides posterior a la congelación es influenciada por la época del año en la que el semen fue colectado y posteriormente congelado, obteniendo mejores índices de fertilidad en las hembras que fueron inseminadas artificialmente cuando el semen fue obtenido y congelado en los meses de otoño.

Para las producciones ovinas la estacionalidad puede representar un problema que reduce la efectividad de programas reproductivos durante las épocas no reproductivas, de manera que se han buscado alternativas que reduzcan esta problemática, por lo cual se han implementado cambios en el manejo ambiental, hormonal, genético, entre otros, los cuales permiten incrementar la productividad a lo largo del año (Orihuela, 2014).

### **2.2.3 Control hormonal del comportamiento sexual en el carnero**

En los carneros la actividad sexual es regulada por las hormonas androgénicas, las cuales actúan principalmente en el área preóptica del hipotálamo (Orihuela, 2014). La información del entorno interno y externo coordinada por el hipotálamo produce la GnRH, que a su vez desencadena la producción de LH y FSH por la hipófisis, ambas son liberadas a la circulación hasta llegar a las gónadas

donde estimulan la producción de esteroides y testosterona por las células de Leydig, estimuladas a su vez por la prolactina (Orihuela, 2014; Liu & Ott, 2018).

El comportamiento sexual o deseo sexual (libido) es regulado por la testosterona. La disminución de la libido está relacionada con animales sobrealimentados, la edad y el estado de salud del animal (Liu & Ott, 2018).

Varios investigadores han descrito la cópula como el proceso que va desde el acercamiento del macho a la hembra hasta la eyaculación, durante dicho evento se ha observado un incremento de oxitocina relacionado con las contracciones del epidídimo durante la eyaculación y la producción de espermatozoides. También se ha mencionado en otras investigaciones que la dopamina juega un papel significativo en la estimulación de la eyaculación y la serotonina en la inhibición de la misma. La cópula se ha visto estimulada e inhibida por la acción de la norepinefrina. La respuesta endocrina en el comportamiento sexual de los carneros se ha visto afectada además de la época del año por otros factores como la exposición ante las hembras o la experiencia previa del macho (Orihuela, 2014).

#### **2.2.4 Capacidad reproductiva**

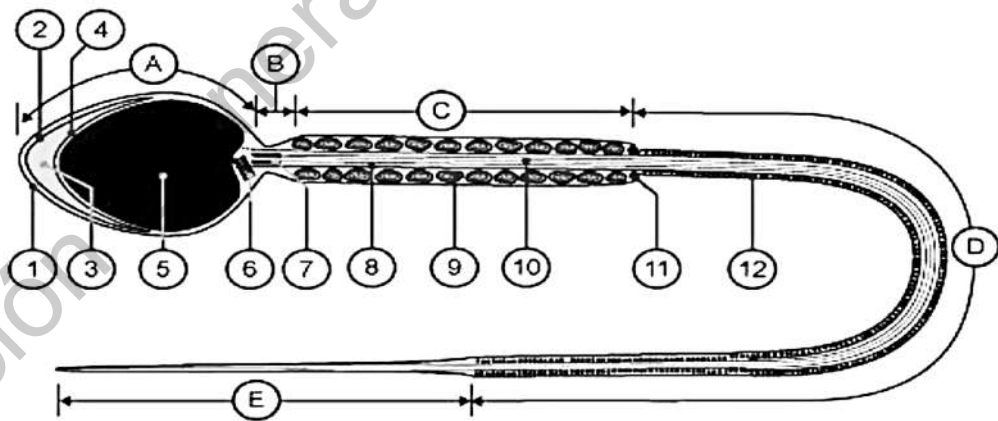
La capacidad de reproducción se define como la cantidad de ovejas con las que un carnero puede aparearse en un periodo de tiempo o ciclo de estro, alcanzando una alta fertilidad. Esta característica no depende únicamente de la calidad del semen o la producción de células espermáticas sino también del deseo sexual, el comportamiento de apareamiento y la capacidad de servicio (Liu & Ott, 2018).

Durante una temporada de cría de 17 días un carnero con buena libido, un tamaño testicular adecuado y semen de buena calidad puede dejar gestantes hasta 100 ovejas, sin embargo, se recomienda utilizar de 3 a 3,5 carneros por cada 100 ovejas en la unidad de producción (Pugh & Baird, 2012). Se recomienda tener una

proporción de 1 carnero adulto por cada 30 ovejas, y de 15 a 20 ovejas por cada reemplazo de los carneros, cuando se utilizan métodos de sincronización se puede reducir hasta a 10 ovejas por cada semental (Macaldowie, 2016).

### 2.3 El espermatozoide

Los espermatozoides son formados a partir de células madre llamadas espermatogonias, mediante un proceso de proliferación y diferenciación denominado espermatogénesis, evento que se lleva a cabo en los túbulos seminíferos del testículo (Tulsiani, 2003). Este proceso está controlado por el eje hipófisis–hipotálamo–gónada (Olivera *et al.*, 2006). Los espermatozoides (Figura 5) son células móviles alargadas que carecen de citoplasma y la mayoría de los organelos de las células somáticas, son totipotentes, haploides y tienen la capacidad de combinarse con un óvulo para generar un nuevo individuo (Plant & Zeleznik, 2014; Hafez & Hafez 2000).



**Figura 5.** Representación esquemática de la estructura del espermatozoide.

A.- Cabeza, B.- cuello, C.- pieza intermedia, D.- pieza principal de la cola, E.- pieza final de la cola. 1.- Membrana plasmática, 2.- membrana externa del acrosoma, 3.- acrosoma, 4.- membrana interna del acrosoma, 5.- núcleo, 6.- centriolos, 7.- restos del citoplasma distal, 8.- fibra longitudinal exterior, 9.- mitocondrias, 10.- axonema, 11.- anillo, 12.- fibras anulares. (Swiss Virtual Campus, 2008).

### 2.3.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es el término que involucra todos los eventos que se encuentran involucrados en la formación de gametos masculinos, este proceso de desarrollo se lleva a cabo desde las espermatogonias que son células germinales, hasta la formación de los espermatozoides que contienen solo la mitad del material genético de las espermatogonias, convirtiéndose así en células diploides. Dicha transformación tiene lugar en el epitelio del túbulo seminífero, el cual se considera la unidad funcional de los testículos en los mamíferos (Frandsen *et al.*, 2009; Schatten & Constantinescu, 2007; Cheng & Mruk, 2010).

Este desarrollo se lleva a cabo mediante tres etapas, la primera comprende la espermatocitogénesis, posteriormente la meiosis y por último la espermiogénesis (Noakes *et al.*, 2009; Schatten & Constantinescu, 2007). En el carnero adulto el ciclo de espermatogénesis dura alrededor de 6 semanas, cabe destacar que no todas las células comienzan su desarrollo al mismo tiempo, sino que después de algunos días inicia una cohorte nueva, lo cual asegura la producción de espermatozoides de manera continua (Youngquist & Threlfall, 2007).

El proceso de espermatogénesis está controlado de manera endocrina por la secreción pulsátil de GnRH en el hipotálamo, la cual estimula la función testicular. El principal andrógeno que controla la espermatogénesis es la testosterona, que es producida por las células de Leydig, como respuesta a la estimulación recibida mediante la LH. La testosterona que se encuentra difundida en las células de Sertoli se une al receptor de andrógenos que se encuentra en el citoplasma y el núcleo, promoviendo así las funciones necesarias para llevar a cabo la espermatogénesis (Smith & Walker, 2014).

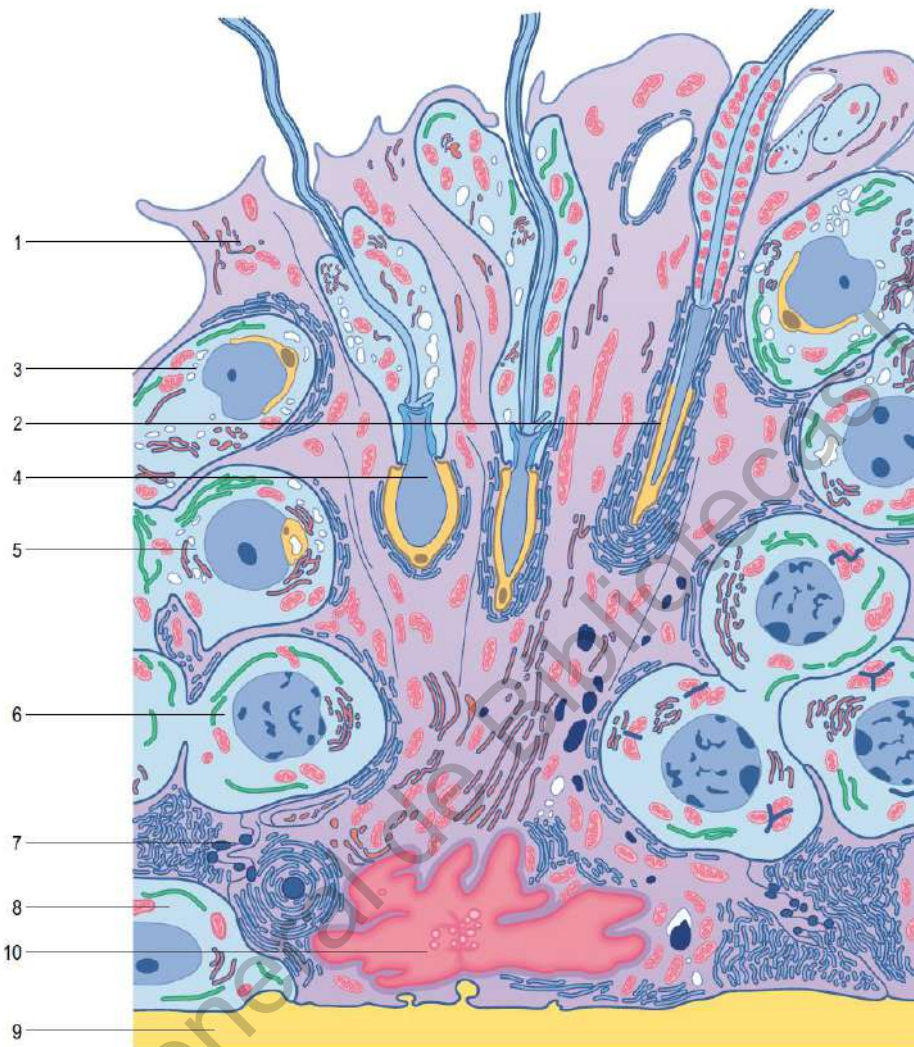
El objetivo de la espermatocitogénesis es obtener como producto final un espermatozoides primario, para ello es necesario una serie de pasos (Schatten & Constantinescu, 2007). Primeramente, durante el desarrollo embrionario las células

germinales especializadas migran desde el saco vitelino del embrión hasta las gónadas diferenciadas, después de dividirse varias veces dan lugar a los gonocitos los cuales en el macho poco antes de la pubertad se convierten en espermatogonias, al mismo tiempo los cordones celulares se convierten en los túbulos seminíferos al adquirir luz en el conducto, de manera paralela también, las células de Sertoli son conformadas a partir de células sustentaculares, estas células son necesarias para la regulación paracrina del proceso además de conformar una barrera hematotesticular (Hafez & Hafez, 2000; Hyttel *et al.*, 2010).

Las espermatogonias se ubican en la periferia de los túbulos seminíferos y fuera de la barrera hematotesticular. Existen espermatogonias de tres tipos: tipo A, tipo B e intermedias. Las células madre de la espermatocitogénesis son las de tipo A1, que al dividirse por mitosis da lugar a una nueva célula A1 y una espermatogonia A2, este proceso es el encargado de perpetuar la población de células madre. La próxima división mitótica de la espermatogonia A2 da como resultado espermatogonias A3, que al dividirse de igual manera por mitosis dará lugar a espermatogonias intermedias que mitóticamente dan lugar a espermatogonias de tipo B, las cuales en los rumiantes se distinguen en dos generaciones (Hyttel *et al.*, 2010).

Los espermatoцитos primarios se forman a partir de la última división mitótica de las espermatogonias de tipo B para después continuar con la meiosis la cual no se inicia hasta la vida posnatal, precisamente al inicio de la pubertad (Griswold, 2016).

Schatten & Constantinescu (2014) describen que durante el proceso de meiosis I de un espermatoцитo primario se dará lugar a dos de tipo secundario, los mismos que casi de manera inmediata comienzan la meiosis II, produciendo cuatro espermátidas redondas generando las primeras células haploides durante el proceso. Hyttel *et al.*, (2010) resaltan que durante este último paso se realiza de manera incompleta la citocinesis, por lo tanto, las espermátidas de cada generación se encuentran aún unidas a través de delgados puentes citoplasmáticos.



**Figura 6.** Distribución de las células espermatozoarias en los túbulos seminíferos. 1.- Célula de Sertoli, 2.- espermátida en maduración, 3.- espermátida en fase de capuchón, 4.- espermátida en fase acrosómica, 5.- espermátida en fase de Golgi, 6.- espermatozoos conectados por puentes citoplasmáticos, 7.- barrera hematotesticular, 8.- espermatogonia, 9.- lamina basal, 10.- núcleo de células de Sertoli (Modificado de Liebich, 2004; Hyttel *et al.*, 2010).

La última etapa de la espermatogénesis comprende la espermiogénesis, que es el desarrollo de las espermátidas redondas haploides a células espermáticas alargadas, que serán liberadas a los túbulos seminíferos. Esta etapa comprende a su vez cuatro fases (Figura 6), en la primera llamada fase de Golgi se forma la

vesícula acrosómica, los centriolos migran al extremo opuesto de la célula y se comienza a formar el axonema; la segunda fase llamada fase de casquete o capuchón comprende la extensión del acrosoma sobre el núcleo en su parte anterior; la fase de acrosoma se caracteriza porque durante esta las espermátidas se reorientan de manera que el acrosoma queda hacia la membrana basal del túbulo seminífero, los centriolos comienzan a formar la pieza de conexión y las mitocondrias migran hacia lo que será la cola del espermatozoide; la cuarta y última fase comprende la maduración donde el espermatozoide adquiere su morfología desarrollada, los cuerpos residuales son eliminados y fagocitados por las células de Sertoli, finalmente son liberados al lumen de los túbulos seminíferos (Schatten & Constantinescu, 2014; Hyttel *et al.*, 2010; Frandson *et al.*, 2009).

Cuando los espermatozoides se desprenden del espacio luminal de los túbulos seminíferos son esencialmente inmóviles, de manera que son transportados por medio de contracciones testiculares acompañadas de secreciones líquidas o fluidos que los conducen al conducto epididimal (Reece, 2009).

La cabeza y el cuerpo del epidídimo proporcionan un ambiente favorable para la maduración de las células espermáticas, que en parte también se encuentra regulado por el efecto de la testosterona. Una vez que los espermatozoides se encuentran en la cola, se reduce la actividad del músculo liso, a menos que exista estimulación sexual (Akers & Denbow, 2008).

Hafez & Hafez (2000) describen que durante el tránsito por el epidídimo surgen una serie de eventos que proporcionan a las células espermáticas su potencial fertilizante, entre ellas se encuentran el desarrollo de motilidad progresiva, la alteración de los patrones metabólicos y el estado estructural de orgánulos específicos de la cola, cambios en la cromatina nuclear, cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática, pérdida de la gota citoplasmática y en algunas especies cambios en el acrosoma.

La porción caudal o cola del epidídimo es el sitio donde principalmente se almacenan las células espermáticas, son denominadas reservas extragonadales a los espermatozoides contenidos en el conducto del epidídimo desde la cabeza hasta la cola. Solo las células espermáticas que se encuentran en parte distal de la cola del epidídimo son los que pueden ser eyaculados. Los espermatozoides no son conservados de manera definitiva, una gran parte de ellos cuando no son eyaculados son eliminados mediante la orina (Akers & Denbow, 2008).

Luño & Matas (2012) enfatizan que la eyaculación tiene lugar cuando se da la expulsión de los espermatozoides aunada a las secreciones de las glándulas accesorias mediante contracciones musculares coordinadas a través de la uretra, es diferenciada en tres fracciones, la primera que contiene secreciones de las glándulas accesorias es la pre-espermática; la segunda, que presenta una cantidad elevada de espermatozoides junto con excreciones de la próstata y las vesículas seminales es la fracción espermática, y la tercera fracción que contiene baja concentración espermática y excreciones de las glándulas accesorias del macho es llamada fracción post-espermática.

El desarrollo de un espermatozoide en el carnero desde la fase de espermatogonia hasta llegar al centro de los túbulos seminíferos tarda 31 días y tarda 3 o 4 días más durante su paso por los túbulos seminíferos, su recorrido a través del epidídimo tarda 14 días, de manera que el proceso de una célula espermática lista para ser eyaculada tarda aproximadamente 49 días en esta especie (Liu & Ott, 2018). La duración de cada onda espermática en el carnero es de 10.4 días (Schatten & Constantinescu, 2007).

De acuerdo a las investigaciones de Liu & Ott (2018) existen dos factores significativos que pueden comprometer la calidad y cantidad de células espermáticas producidas, una de ellas es el estado nutricional se ha observado que animales sobrealimentados tienen efectos negativos sobre la producción espermática y la segunda es la capacidad fisiológica del carnero para regular la temperatura testicular.



### 2.3.2 Estructura del espermatozoide

Noakes *et al.*, 2009 describen que las células espermáticas se encuentran compuestas por tres segmentos principales la cabeza, la pieza de conexión o pieza intermedia y el flagelo o cola, este último segmento se divide en principal, medio, y caudal (Figura 5).

La cabeza de los espermatozoides se caracteriza por ser ovalada y aplanada, se encuentra organizada de manera que la fusión de gametos se lleve a cabo de manera eficiente (Plant & Zeleznik, 2014). Este segmento contiene el núcleo con una cromatina hipercondensada a causa de las protaminas, que forman una lámina post-acrosómica que conforman un complejo citoesquelético, el cual rodea al núcleo del espermatozoide, esta característica le permite resistir el daño en condiciones físicas y químicas externas (Neill, 2005). Esta estructura citoesquelética conforma lo que se denomina teca perinuclear la cual se divide a su vez en tres regiones: subacrosómica, ecuatorial y post-acrosómica (Schatten & Constantinescu 2007).

De acuerdo con Chenoweth & Lorton (2014), el acrosoma se encuentra entre la membrana plasmática y la teca perinuclear, el acrosoma se divide en anterior y posterior de acuerdo a su ubicación en la cabeza del espermatozoide.

Durante la maduración que se lleva a cabo en el epidídimo, la región post-acrosómica del espermatozoide sufre una serie de cambios, estos cambios desempeñan un rol fundamental una vez que los espermatozoides han penetrado la corona radiada y la zona pelúcida, posteriormente tiene lugar la reacción acrosómica y la fusión mediante unión específica del espermatozoide con la membrana plasmática del ovocito. Existen enzimas presentes en el acrosoma del espermatozoide que modulan estas interacciones moleculares, algunas de ellas son la hialuronidasa, acrosina, proacrosina, esterases, neuraminidasa fosfatasa, fosfolipasas entre las más importantes (Johnson & Johnson, 2013).

El cuello o pieza intermedia de los espermatozoides es el encargado de conectar la cabeza con la cola mediante una estructura compleja y especializada, el centrosoma que se encuentra en esta zona es de vital importancia en la unión de los núcleos de los gametos masculino y femenino en el cigoto. En esta pieza también se alberga una vaina fibrosa mitocondrial que es necesaria en la generación de la motilidad en las células espermáticas (Schatten & Constantinescu 2007).

El final de la vaina fibrosa determina el comienzo de la cola del espermatozoide, esta es la encargada generar el impulso de movimiento hacia adelante y de la generación de energía para el movimiento. La cola se divide en la pieza media, pieza principal y pieza final (Hyttel *et al.*, 2010). El axonema, la vaina mitocondrial, las fibras densas externas y la vaina fibrosa que es la que proporciona estabilidad, son las partes estructurales que conforman la cola del espermatozoide (Chenoweth & Lorton, 2014).

Olivera *et al.* (2006) argumentan que mediante ondas de flexión el axonema central genera movimientos deslizantes por lo cual entonces el segmento caudal es el responsable de la motilidad del espermatozoide. Los espermatozoides eyaculados generalmente deberían ser separados de la gota citoplasmática que es considerada como anormal, pero en la mayor parte de las ocasiones se puede encontrar retenida proximalmente en la región del cuello o distalmente cerca del anillo.

Los espermatozoides se encuentran cubiertos por una membrana plasmática distribuida de manera continua, esta membrana cumple un papel significativo en eventos como la capacitación, la reacción acrosómica y la fusión con la membrana plasmática del óvulo (Schatten & Constantinescu 2007).

Los ácidos nucleicos, proteínas y lípidos son los principales constituyentes químicos de los espermatozoides. El azufre, nitrógeno, y fósforo son otros componentes inorgánicos de los cuales están constituidas estas células gaméticas, su contenido de fósforo está estrechamente relacionado con el ADN que contienen,

mientras que el azufre es un componente derivado de las proteínas nucleares y los queratinoides contenidos en la cola (Hafez & Hafez, 2000).

## **2.4 Recolección seminal**

### **2.4.1 Características del semen**

La principal función del semen es el transporte de los espermatozoides y su depósito en el aparato reproductor de la hembra. El semen está conformado por dos fracciones las cuales a su vez están constituidas por diferentes sustancias químicas (Cuadro 1), la primera, una fracción celular donde se encuentran los gametos masculinos o espermatozoides, el volumen de esta porción se encuentra por encima del 30%, y una segunda fracción líquida, que contiene todas las secreciones de las glándulas accesorias, vesículas seminales y próstata del tracto reproductivo masculino conocida como plasma seminal (Hafez & Hafez, 2000).

Johnson & Johnson (2013) consideran que en condiciones normales son encontradas una cantidad reducida de células como glóbulos blancos en el semen, además de moléculas de carbohidratos como la fructosa y el inositol provenientes de las vesículas seminales y que son usadas por el espermatozoide como fuentes de energía mediante procesos de oxidación o glucólisis.

El plasma seminal contiene una gran variedad de péptidos, proteínas y otros compuestos nitrogenados que participan activamente en procesos de transporte, modulación de la respuesta inmune en el útero de la hembra, capacitación, interacción de los gametos y fusión, estas proteínas son derivadas del epidídimo y de las glándulas accesorias, una de las principales proteínas presentes en el semen de carnero es la glicerofosforilcolina, además de aminoácidos libres como ácido glutámico (Therien, 1995).

**Cuadro 1.** Composición y propiedades químicas del semen de carnero.

Semen	Cantidad
Células espermáticas (%)	33
Concentración espermática ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	2 000 – 5 000
pH	5.9 – 7.3
Sólidos totales (%)	14.8
Volumen (ml)	0.5 – 2
Plasma Seminal	Cantidad
Acetilglucosaminidasa (unidades/ml)	16 000
Ácido ascórbico (mg/100 ml)	5
Ácido cítrico (mg/100 ml)	137
Ácido glutámico (mg/100 ml)	76
Bicarbonato (mmol/l)	7.1
Calcio (mmol/l)	1.9
Cloro (mmol/l)	18
Ergotioneina (mg/100 ml)	Rastros
Fructosa (mg/100 ml)	150 – 600
Glicerofosforilcolina (mg/100 ml)	1 600 – 2 000
Inositol (mg/100 ml)	10 – 15
Magnesio (mmol/l)	2.4
Manosidasa (unidades/ml)	50
Potasio (mmol/l)	23
Sodio (mmol/l)	78
Sorbitol (mg/100 ml)	26 – 120

Fuente: Traducida de Chenoweth & Lorton (2014).

Mehdipour (2016) argumenta que el semen contiene cantidades considerables de fosfolípidos y lípidos neutros que se encuentra en mayor parte en los espermatozoides, los cuales son importantes precursores de actividades como

la motilidad, la reacción acrosómica y la fertilización. En los carneros el plasmalógeno de colina es el fosfolípido más abundante, los ácidos grasos que están presentes en el semen tienen la propiedad de ser susceptibles a ser dañados por especies de oxígeno reactivas.

Concentraciones importantes de esteroides también son contenidas en el semen, el principal de ellos es la testosterona. Todas estas moléculas presentes en el plasma seminal del carnero desempeñan un papel fundamental ya son las encargadas de participar activamente en la unión y penetración de la zona pelúcida del ovocito, la activación de la expresión génica, la implantación, viabilidad y la diferenciación de los embriones (Chenoweth & Lorton, 2014).

#### **2.4.2 Selección y evaluación del semental**

Desde el punto de vista de Mozo *et al.* (2015), es conveniente que los machos de los cuales se preservara el semen, posean parámetros productivos superiores a la media de la población, esto con la finalidad de poder implementar programas de mejoramiento genético relacionados con el fin zootécnico de la unidad de producción, es importante destacar que 50% del potencial reproductivo es provisto por el macho. Otro aspecto fundamental que se debe tomar en cuenta es el estado de salud en el que se encuentra, por lo cual se somete a un examen físico completo en el que se evalúan las características estructurales, físicas, o patológicas que puedan transmitirse a las ovejas.

Al llevar a cabo la evaluación del semental tres características importantes son evaluadas, en primer lugar, la solidez estructural que presenta el macho durante la temporada de reproducción, la capacidad del macho para permanecer sano bajo condiciones ambientales normales, y el tercer aspecto es la libido que nos indica la disposición que presenta para dar servicio a una hembra (Aguirre, 2005).

Además, Youngquist & Threlfall (2007), señalan que es fundamental realizar la prueba de comportamiento del carnero antes de la evaluación del tracto reproductivo y la evaluación seminal, los carneros con una inadecuada libido generalmente no deben ser sometidos a programas de reproducción.

Posteriormente a la evaluación física y de conformación deben evaluarse detenidamente los testículos y epidídimos del carnero, durante la evaluación se observan características como la simetría y el tono testicular, anomalías, inflamaciones o disminución en el tono nos señalan la presencia de deterioro de la fertilidad o problemas patológicos (Mozo *et al.*, 2015).

Hafez & Hafez (2000) expresan que el tamaño de la circunferencia escrotal en los carneros se encuentra estrechamente relacionada con la producción de espermatozoides, de manera que carneros con un peso por encima de los 68 kg deberán tener una circunferencia escrotal de más de 30 cm, y los carneros maduros de más de un año de edad deberán medir por encima de los 33 cm y carneros por encima de 113 kg deberán tener una circunferencia aproximada de más de 36 cm, cabe destacar que dependiendo de la estación reproductiva en la que se encuentre el animal puede tener variaciones importantes en la medición de esta característica.

El prepucio debe ser evaluado en busca de lesiones, úlceras o fimosis, de igual manera el pene deberá ser extendido y examinado buscando signos de enfermedad o lesiones que puedan dañar directamente la calidad del eyaculado (Youngquist & Threlfall, 2007).

### **2.4.3 Colección de semen**

De acuerdo con Matthews *et al.* (2003), existen dos métodos en los carneros por los cuales se puede colectar semen, la vagina artificial y la electroeyaculación. El procedimiento de electroeyaculación se realiza insertando en el recto del carnero

una sonda eléctrica bipolar, a intervalos de 10 a 20 segundos con una duración de la intensidad de 2 a 4 segundos, durante este proceso se estimula eléctricamente a bajo voltaje el centro eyaculatorio, las glándulas seminales y la próstata, las colecciones obtenidas mediante este procedimiento pueden ser variables en volumen y concentración, además de provocar estrés, características que afectan la calidad del eyaculado, por lo tanto, no debe ser usado como primera opción en los procesos de colección.

Al llevar a cabo el procedimiento de colección con vagina artificial es necesario que el carnero tenga un entrenamiento previo, la estructura consta de un tubo o manguera de 5 a 7 cm de diámetro con una longitud de 20 a 25 cm, se emplea un revestimiento de goma que puede ser de textura lisa o rugosa, se introduce agua caliente aproximadamente de 50 a 60 °C, y se inyecta aire para proveer la presión necesaria, cuando el carnero monta a la hembra se guía el pene hacia dentro de la vagina artificial en la cual se capta el eyaculado dentro de un tubo graduado que debe mantenerse a 37 °C para evitar un choque de temperatura, posteriormente se retira el tubo y se coloca a baño maría a una temperatura de 35 a 37 °C (Hafez & Hafez, 2000).

Youngquist & Threlfall (2007) plantean que, para reducir el daño y la exposición a shock de las células espermáticas, una vez que se ha obtenido el eyaculado debe agregarse diluyente en una proporción de hasta 1:1, ambos deben encontrarse a la misma temperatura, después se lleva a cabo la evaluación del semen se calcula concentración y se realiza la dilución final.

#### **2.4.4 Evaluación de la calidad espermática del semen**

Inmediatamente después de la recolección y antes de la dilución se llevan a cabo las evaluaciones iniciales de las muestras de semen con el objetivo de determinar el potencial de fertilización de los espermatozoides presentes en la

muestra, ya que las células forman una población de tipo heterogénea, por este motivo es necesaria la evaluación de sus características morfológicas y funcionales (Mocé & Graham, 2008).

Moore (1985) describe la evaluación del semen que comprende dos aspectos, la primera es la valoración de tipo macroscópico, dos características importantes que se evalúan al momento de la colección es la apariencia y el volumen del eyaculado donde incluye la evaluación del color, el semen debe presentar un color blanco lechoso a crema pálido, colores rosas a rojos indica presencia de sangre que puede indicar lesiones, y en caso de presentar alguna infección el semen se observará de colores marrón a grisáceos, no deberán ser utilizadas las muestras con algún tipo de contaminante.

El volumen de eyaculado en parámetros normales va de 0.5 ml a 2.0 ml en carneros maduros. Además, se debe observar la consistencia que debe ser ligeramente cremosa, un olor (sui generis) sutilmente a cloro y un pH cercano a 7.2 (Chenoweth & Lorton, 2014).

La evaluación microscópica comprende la valoración de la motilidad masal que es calificada en una escala de 0 a 5, el porcentaje de motilidad progresiva individual (movimientos de avance hacia adelante), morfología espermática (porcentaje de anormalidades) se llevan a cabo dos clasificaciones para la diferenciación de las características morfológicas anormales, la primera depende del lugar de la anormalidad y se clasifica en cabeza, parte media o cola, y la segunda clasificación va de acuerdo al origen que pueden ser primarias o secundarias, viabilidad (porcentaje de espermatozoides muertos), cuando estos dos últimos sobrepasan el 30% nos indica baja fertilidad del individuo (Chenoweth & Lorton, 2014; Maroto-Morales, 2009). Un eyaculado de alta calidad, contiene más del 85% de motilidad y menos del 10% de anormalidades, la concentración espermática va de 2 500 a 6 000 X 10<sup>-6</sup>/ml (Liu & Ott, 2018).



## 2.5 Criopreservación

La criopreservación es una técnica que permite conservar células espermáticas durante un tiempo indefinido, comprende una serie de procesos secuenciales que incluyen el enfriamiento, la deshidratación de la célula, la congelación, el almacenamiento en nitrógeno líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  y por último la descongelación (Ugur *et al.*, 2019; Paoli *et al.*, 2019).

Existen dos técnicas que actualmente son utilizadas para llevar a cabo la criopreservación de células espermáticas, la primera es la congelación lenta que consiste en un enfriamiento progresivo durante un periodo de tiempo de 2 a 4 horas, en dos o tres pasos, este puede ser manual o automático, investigadores señalan que esta técnica causa daño físico y/o químico en las células, que posiblemente está relacionado con la cristalización producida; en segundo lugar, se encuentra la congelación rápida la cual consiste en exponer las pajillas de manera directa y en un solo paso a vapor de nitrógeno durante 8 a 10 min y posteriormente la inmersión completa en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , esta técnica al igual que la anterior presenta inconvenientes como la disminución de la fertilidad de las células espermáticas (Di Santo *et al.*, 2012).

Bittencourt *et al.* (2013) destacan que el uso de la criopreservación en la ganadería proporciona ventajas como el almacenamiento de espermatozoides a largo plazo, facilita la propagación de la diversidad genética a distancia, el incremento de la distribución de animales genéticamente superiores, además de un aumento de la progenie por macho, entre otros beneficios importantes dentro de las unidades de producción.

Se ha estudiado la congelación de espermatozoides ovinos desde hace más de 50 años, durante este tiempo se han alcanzado grandes avances al utilizar espermatozoides congelados en técnicas reproductivas como la inseminación artificial, aunque aún se tienen desventajas debido a que la criopreservación expone

a las células a un daño que compromete de manera significativa sus funciones (Aisen *et al.*, 2005).

Matsuoka *et al.* (2006) observaron que posterior a la descongelación de células espermáticas se observa un incremento de la mortalidad espermática además de un deterioro y disminución de la motilidad, procesos celulares que al verse afectados disminuyen la capacidad de fertilización del espermatozoide. Sin embargo, a lo largo de los años se han estudiado sustancias que actúan como crioprotectores, las cuales al combinarse con algunos otros aditivos son capaces de disminuir o revertir este tipo de daño en las células.

### **2.5.1 Crioprotectores**

Los crioprotectores son sustancias que se caracterizan por tener alta permeabilidad y bajo peso molecular, generalmente son añadidas al medio o diluyente previo a la criopreservación. La función de estas sustancias es evitar la formación de cristales de hielo cuando el agua contenida dentro de la célula comienza a congelarse (Di Santo *et al.*, 2012).

Además, los crioprotectores protegen a la célula del estrés osmótico, ya que mantienen una proporción estable de líquidos cuando las células espermáticas son sometidas a bajas temperaturas, es decir un equilibrio en la concentración de electrolitos lo cual le permite conservar la sobrevivencia espermática (Meyers, 2005).

Sieme *et al.* (2016) señala que los agentes crioprotectores se pueden dividir en dos grandes grupos: penetrantes y no penetrantes, ambos grupos tienen la función de proteger y preservar las estructuras moleculares dentro de la célula durante la congelación. Los agentes penetrantes se caracterizan por la capacidad de ingresar a través de la membrana celular proporcionando protección intracelular además de la modulación de la deshidratación inducida por el procedimiento, el

glicerol es uno de los más utilizados actualmente. A diferencia de los agentes penetrantes los no penetrantes contienen micromoléculas activas osmóticamente y macromoléculas inactivas osmóticamente, el más conocido de este grupo es la yema de huevo.

Normalmente las sustancias crioprotectoras son adicionadas a los diluyentes utilizados para la congelación de espermatozoides, los cuales además contienen componentes nutritivos (glucosa u otros azúcares), antibacterianas (antibióticos), además de buffers que mantienen el pH y la osmolaridad adecuados, proteínas, lípidos, sales, antioxidantes entre otros compuestos que en conjunto permiten proteger la viabilidad y la capacidad fecundante de las células espermáticas además de aumentar el volumen del eyaculado (Barbas & Mascarenhas, 2009; Peris-Frau *et al.*, 2020).

### **2.5.2 Efectos perjudiciales de la criopreservación**

A pesar del impacto que tiene la criopreservación de espermatozoides actualmente y su utilización en la biotecnología reproductiva es bien sabido que sus efectos son perjudiciales, ya que alteran la integridad de las células espermáticas además de ocasionar daños en la estructura de la membrana y en el metabolismo celular. Durante el enfriamiento las células se someten a efectos dañinos como el desequilibrio iónico, desestabilización del citoesqueleto, producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno, mientras que durante el proceso de congelación ocurren alteraciones del volumen celular, la formación de cristales de hielo y desnaturalización de proteínas (Ezzati *et al.*, 2020; Keskin *et al.*, 2020).

Durante este proceso se busca minimizar los daños que pueden ocasionar una desestabilización de las membranas de los espermatozoides de esta manera al

mejorar los métodos de preservación incrementando la cantidad de células espermáticas viables conservando su habilidad funcional (Stornelli *et al.*, 2005).

El mayor daño en la pérdida de la función de la célula espermática se da durante el proceso de congelación y descongelación. Ha sido demostrado que posterior a la descongelación los espermatozoides sufren una reacción acrosómica prematura, factor que favorece la disminución de la capacidad de fertilización del ovocito en el tracto reproductor de la hembra (Ntemka *et al.*, 2018).

Salamon & Maxwell (2000) enfatizan que en la supervivencia de los espermatozoides tanto el proceso de congelación como el de descongelación ejercen un efecto significativo, el deterioro se produce en el acrosoma y en el citoplasma, produciendo daño físico, bioquímico y estructural.

Diferencias entre especies como la composición de lípidos y proteínas en los espermatozoides han indicado que el proceso de criopreservación no ejerce los mismos efectos en todas las especies. Se ha observado que estos daños son menos severos en los espermatozoides de toro que en los de carnero (Peris-Frau *et al.*, 2020).

De manera general eventos como el shock térmico, la toxicidad producida por el estrés oxidativo, el cambio en la presión osmótica y la combinación de estos son algunos de los daños importantes que pueden ser causados por el proceso de criopreservación de los espermatozoides (Watson *et al.*, 1975).

Para determinar el daño producido en la membrana por lo general se realizan pruebas de integridad estructural (viabilidad) e integridad funcional (prueba de hinchamiento hipo-osmótico) las cuales proporcionan información significativa sobre diferentes aspectos de la funcionalidad de las células espermáticas posterior a la criopreservación (Check *et al.*, 1991).

### 2.5.3 Shock térmico

El shock o choque térmico se define como la respuesta del espermatozoide al ser sometido a una disminución de la temperatura, el enfriamiento rápido de 30 a 0 °C causa daño celular en los espermatozoides, este daño depende de la velocidad de enfriamiento, el intervalo de temperatura y la sensibilidad de la célula (Watson, 2000). En las células espermáticas los compartimentos que tienen una mayor sensibilidad al shock térmico son las mitocondrias y la membrana plasmática (Jäkel *et al.*, 2021).

Cuando se lleva a cabo la congelación ocurre un cambio del estado físico del agua, primero fuera y después dentro de la célula. La lesión ocasionada por la disminución de la temperatura se compone de dos aspectos, el primero es el daño directo que es ocasionado por la formación de cristales de hielo y el segundo comprende la formación de hielo extracelular que concentra la cantidad de solutos fuera de la célula, lo que hace que en compensación de este aumento la célula se deshidrate por contracción osmótica (Dupesh *et al.*, 2018; Pegg, 2002).

Someter células espermáticas a temperaturas de enfriamiento y/o congelación ocasiona la alteración de las moléculas que los conforman, se ha relacionado el shock térmico con la transición de fase de los lípidos que conforman la membrana, los cuales a temperatura fisiológica se encuentran en un estado de fluidez, mientras que cuando son expuestos a una disminución de la temperatura cambian a un estado más rígido formando aglutinaciones, lo cual desencadena la pérdida de la selectividad en la membrana celular del espermatozoide ocasionando daños que pueden llegar a ser irreversibles y que afectan de manera significativa su función (Sieme *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2009).

El daño ocasionado por criolesión no solo ocurre durante la congelación, sino que también puede ocurrir al momento de la descongelación a medida que el hielo se derrite (Di Santo *et al.*, 2012).

White (1993) argumenta que la susceptibilidad de los espermatozoides de carnero al shock térmico está dada por su alto contenido de fosfolípidos insaturados y bajo contenido de colesterol presentes en la membrana plasmática, estas células al ser expuestas a temperaturas de congelación tienen una disminución de la motilidad (movimientos circulares), ruptura de la membrana, pérdida de componentes intracelulares, lo que desencadena pérdida de la viabilidad y la disminución de la actividad metabólica irreversible.

Cuando los espermatozoides son sometidos a bajas temperaturas adicionando crioprotectores, y posteriormente descongelados al ser evaluados se ha observado una disminución de daños morfológicos y una recuperación notable de la motilidad, ya que estos actúan reduciendo la cantidad de hielo que se forma durante el proceso (Hold *et al.*, 1988; Pegg, 2002). Además, sustancias como la lecitina o la yema de huevo han demostrado un efecto de protección de la membrana al adicionarlos al medio de dilución, debido a que al parecer las lipoproteínas de baja densidad contenidas en la yema de huevo cambian la composición lipídica y mejoran su fluidez durante la congelación porque pueden unirse de manera directa a la membrana modificando la permeabilidad de la misma mejorando el comportamiento osmótico y la respuesta a citoprotectores como el glicerol (Fernández *et al.*, 2009).

#### **2.5.4 Estrés osmótico**

El procedimiento que se lleva a cabo durante la criopreservación expone de manera severa a las células a un daño llamado estrés osmótico, las células tienen cierta tolerancia al movimiento de sustancias a través de su membrana semipermeable, la exposición a los límites por encima o por debajo pueden ocasionar la muerte celular (Sieme *et al.*, 2015).

Meyers (2005) plantea que una concentración hiperosmolar de los solutos es causada debido a que las células al momento de ser congeladas se exponen a que el hielo extracelular se cristalice. La célula a modo de respuesta pierde agua al mismo tiempo que reduce su volumen y se equilibran las concentraciones de solutos dentro y fuera. Por el contrario, en el transcurso de la descongelación el volumen de la célula aumenta porque existe una difusión pasiva de agua.

Existen tres grandes cambios de volumen durante la criopreservación, el primero ocurre cuando la célula se coloca dentro de la solución diluyente, después al ser congelada sucede la segunda variación. Posteriormente, cuando las pajillas son descongeladas ocurre un tercer cambio en el volumen, estas variaciones están relacionadas directamente a modificaciones importantes en las concentraciones de iones contenidos en las soluciones y la capacidad celular para adaptarse a ellos de manera intra y extracelulares ayudadas por los agentes crioprotectores (Stornelli *et al.*, 2005).

Los cambios osmóticos se pueden dar de manera rápida o gradual, esto depende directamente de los métodos mediante los cuales se agregan los crioprotectores y la velocidad de enfriamiento (Curry & Watson, 1994).

La composición de los fosfolípidos de la membrana, la permeabilidad del agua, la temperatura de transición, entre algunos otros son los factores que determinan la capacidad de respuesta de las células espermáticas al estrés osmótico (Meyers, 2005). Estudios previos han determinado que en comparación con el carnero y otras especies el toro es más resistente a las variaciones osmóticas (Sieme *et al.*, 2015).

Stornelli *et al.* (2005) determinaron que la sensibilidad al estrés osmótico se evalúa mediante el número de células que sobrevive al proceso de congelación-descongelación cuando estas son sometidas a adición de crioprotectores, ya que normalmente los eyaculados son heterogéneos y existe una resistencia variable entre células.

De manera que para que los espermatozoides cuenten con capacidad fertilizante deben mantener una membrana celular funcional, una de las evaluaciones mayormente utilizadas es la prueba de hinchazón hipo-osmótica (HOST), la cual nos permite identificar si la membrana de los espermatozoides es capaz de mantener el equilibrio entre la célula y su entorno. Esta prueba nos permite valorar la cantidad de células en una muestra que presentan funcionalidad de la membrana después del proceso de congelación-descongelación (Ramu & Jeyendran, 2013).

### **2.5.5 Estrés oxidativo**

Un desequilibrio entre las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante del plasma seminal es el factor que desencadena el llamado estrés oxidativo, el cual provoca daños importantes en los espermatozoides (Bansal & Bilaspuri, 2010). Las especies reactivas de oxígeno son un conjunto de moléculas derivadas del oxígeno molecular (Held, 2015). Existen dos grupos de moléculas, el primer grupo es el que contiene radicales libres como son el ion hidroxilo, superóxido, óxido nítrico y peroxilo; el segundo grupo son las moléculas sin radicales como el ozono, el oxígeno simple, peróxidos lipídicos y peróxido de hidrógeno (Bansal & Bilaspuri, 2010).

Durante las reacciones enzimáticas normales de señalización intra y extracelular como subproductos se forman ROS (Bansal & Bilaspuri, 2010). Uno de los indicadores de estrés oxidativo es la peroxidación lipídica el cual manifiesta de manera directa la formación de radicales libres. Un objetivo para los radicales libres son los ácidos grasos insaturados que se encuentran presentes en las membranas celulares (Held, 2015).

Los espermatozoides están expuestos durante el proceso de criopreservación al oxígeno atmosférico y por lo tanto aumenta la susceptibilidad de



presentar peroxidación lipídica, esto ocasionado por un aumento en la producción de ROS (Bucak *et al.*, 2008).

Además, durante el proceso de criopreservación la actividad de las enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la superóxido dismutasa se ven reducidas, aumentando la susceptibilidad de las células espermáticas a sufrir daño oxidativo y peroxidación lipídica. El plasma seminal provee de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos a los espermatozoides, pero cuando se lleva a cabo la dilución previa a la congelación los espermatozoides pierden de manera considerable este efecto de protección (Peris-Frau *et al.*, 2020).

El estrés oxidativo es uno de los principales factores que contribuyen a la baja calidad seminal (Bansal & Bilaspuri, 2010). El daño oxidativo en las células espermáticas causa daños importantes a la membrana, la cromatina y las proteínas que los componen (Ball, 2008). La disminución de las enzimas antioxidantes y una alta concentración de ROS conducen a la muerte celular (Di Santo *et al.*, 2012).

Es bien sabido que las concentraciones altas de ROS ocasionan fosforilación del axón espermático, peroxidación lipídica, disminución de la motilidad, baja viabilidad y daño en el ADN, aunque también se ha demostrado que en cantidades bajas este tipo de moléculas desempeñan un papel fundamental en procesos tales como la capacitación, reacción acrosómica y señalización para consolidar el proceso de fertilización (Bansal & Bilaspuri, 2010).

Como lo hace notar White (1993), la peroxidación en las células espermáticas en los carneros se debe al alto contenido de ácidos grasos insaturados que contienen en su membrana plasmática, este proceso afecta de manera negativa la estructura, motilidad y posteriormente la fertilidad.

De acuerdo con Amidi *et al.* (2016), estos daños producidos por las especies de oxígeno reactivo (ROS) han sido reducidos con la adición de sustancias antioxidantes al extensor de criopreservación.

## 2.6 Evaluación de la calidad espermática post-descongelado

De acuerdo con Hernández-Corredor *et al.* (2017), los cambios estructurales que afectan la viabilidad de los espermatozoides son inducidos por una serie de factores como el proceso de congelación, la técnica utilizada, tiempos y velocidades de congelación y la composición de los diluyentes utilizados, estos en su conjunto modifican la estructura de las células espermáticas.

Durante el proceso de criopreservación se presentan cambios en la permeabilidad, en el líquido intracelular y en la composición lipídica de las membranas del espermatozoide, daños por los cuales se pierde hasta el 50% de la viabilidad espermática (Cabrera & Pantoja, 2008).

Es importante realizar la evaluación posterior al proceso de congelación, ya que, aunque al momento de la colecta obtengamos un semen de calidad superior esta pudo haber sido afectada durante el procesamiento o el almacenamiento de los espermatozoides (Catena & Cabodevila, 1999).

En el carnero se ha observado una reducción de la capacidad de fecundación del semen congelado en comparación con el semen fresco (Ruiz *et al.*, 2015). Una muestra de semen fresco que es considerada de calidad superior al evaluarse puede presentar hasta un 10% de anomalías espermáticas y una motilidad superior a 85%. (Cabrera *et al.*, 2011). Investigadores han informado que posterior a la congelación y descongelación de células espermáticas, disminuye alrededor del 50% de la motilidad espermática (Oberoi *et al.*, 2014).

Carvajal-Serna *et al.* (2018) destacan que el principal objetivo de la realización de este tipo de evaluaciones post-descongelado es que las pajillas al ser utilizadas en técnicas reproductivas como la inseminación artificial contengan el número de espermatozoides viables con la motilidad necesaria para fertilizar a la hembra.

Los factores principales que es necesario evaluar para determinar que una dosis de espermatozoides se encuentra en las condiciones adecuadas es la

cantidad de células espermáticas vivas, la motilidad, el número de anomalías observadas y el mantenimiento de la integridad de membrana de los espermatozoides (Hernández-Corredor *et al.*, 2017).

### **2.6.1 Motilidad progresiva**

El porcentaje de espermatozoides de una muestra con movimiento en línea recta se define como motilidad progresiva (Shukla, 2011). Brinsko *et al.* (2011) sugieren que durante la evaluación del movimiento de los espermatozoides se evalúen tres factores, el primero es la motilidad total que es el número de células que presentan cualquier tipo de movimiento, el segundo es la motilidad progresiva en la que se evalúa el movimiento de tipo lineal y el tercero que es la velocidad de los espermatozoides.

La viabilidad de los espermatozoides generalmente está determinada por el grado de movimiento que estos presentan. En muchas especies ha sido demostrada una estrecha relación entre la capacidad de fertilización y la motilidad progresiva de las células espermáticas (Brinsko *et al.*, 2011).

En la evaluación de la calidad de los espermatozoides post-descongelado uno de los indicadores más utilizados es la motilidad progresiva la cual describe el estado energético basado en el movimiento de la célula, esta característica puede proporcionar una predicción bastante precisa de la calidad de los espermatozoides. Es importante tomarla en cuenta, ya que es necesaria para la fertilización del ovocito en el tracto reproductor de la hembra (Carvajal-Serna *et al.*, 2018).

Por lo general en la implementación de técnicas reproductivas como la inseminación artificial no deben utilizarse pajillas que contengan menos del 50% de espermatozoides con motilidad progresiva (Shukla, 2011).

La motilidad progresiva se ve afectada principalmente por el efecto del individuo, la raza y la temporada reproductiva. También cabe destacar que afecciones en el epidídimo o alteraciones en la espermatogénesis dan lugar a cambios importantes en la disminución del movimiento de las células espermáticas al momento de ser evaluados (Creasy & Chapin, 2013),

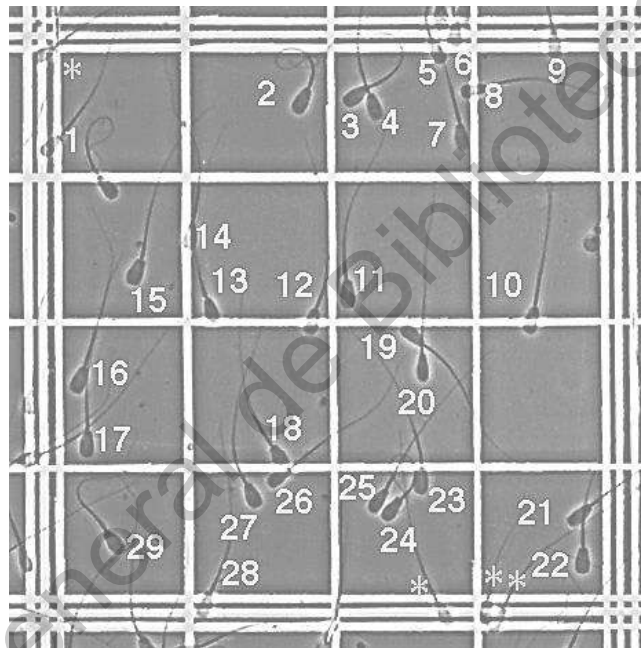
Durante la manipulación de las muestras también existen factores que pueden alterar el movimiento de las células espermáticas, la temperatura afecta de manera considerable la motilidad de los espermatozoides, durante la evaluación es necesario utilizar portaobjetos precalentados y emplear una platina caliente al momento de evaluar al microscopio así evitamos errores en la lectura de los patrones de movimiento debido a factores de manejo de las muestras. Investigaciones recientes han reportado que la motilidad progresiva disminuye cuando se aumenta el volumen de dilución (Noakes *et al.*, 2001; Shukla, 2011).

### **2.6.2 Concentración espermática**

Durante la evaluación del semen post-descongelado se analiza la concentración espermática que se refiere a la cantidad de espermatozoides por unidad de volumen (WHO, 2010).

Esta valoración se lleva a cabo mediante el uso del hematocitómetro o cámara de Neubauer (Figura 7), ya que debido a los medios extensores utilizados los contadores basados en turbidez como el fotómetro y el espectrofotómetro generaran datos erróneos, una alternativa es el uso de sistemas de análisis computarizado los cuales nos arrojan información de manera más precisa, siempre y cuando la muestra no contenga en suspensión partículas grandes que puedan confundirse con la cabeza de un espermatozoide (Samper, 2009).

La concentración es un parámetro que puede ser afectado por diferentes razones como la raza, edad, temporada, número de montas, periodo de descanso, entre algunas otras. Por lo general las dosis utilizadas para inseminación artificial deberán contener aproximadamente 20 millones de células espermáticas con movimiento progresivo para obtener parámetros óptimos de fertilidad (Shukla, 2011).

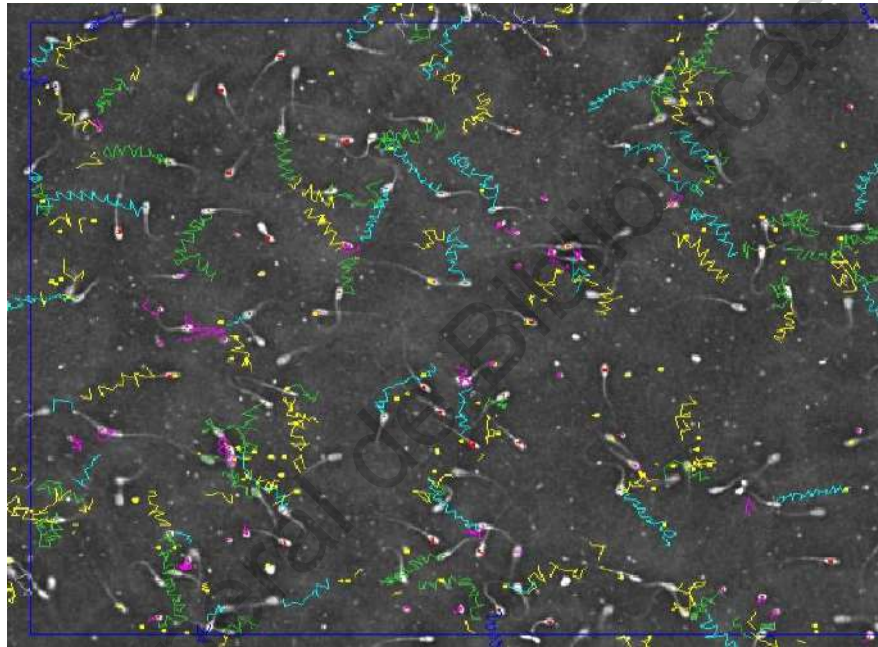


**Figura 7.** Conteo de la concentración espermática mediante hematocítómetro.  
\* Espermatozoides fuera de área de conteo (Imagen de dominio público).

### 2.6.3 Análisis de semen asistido por computadora (CASA)

La evaluación visual es el método más común en la valoración de la motilidad espermática, aunque actualmente una forma rápida de realizar una estimación de la calidad espermática es mediante los sistemas computarizados de análisis seminal (CASA) el cual nos permite obtener información objetiva y con mayor precisión (Valverde & Madrigal-Valverde, 2018).

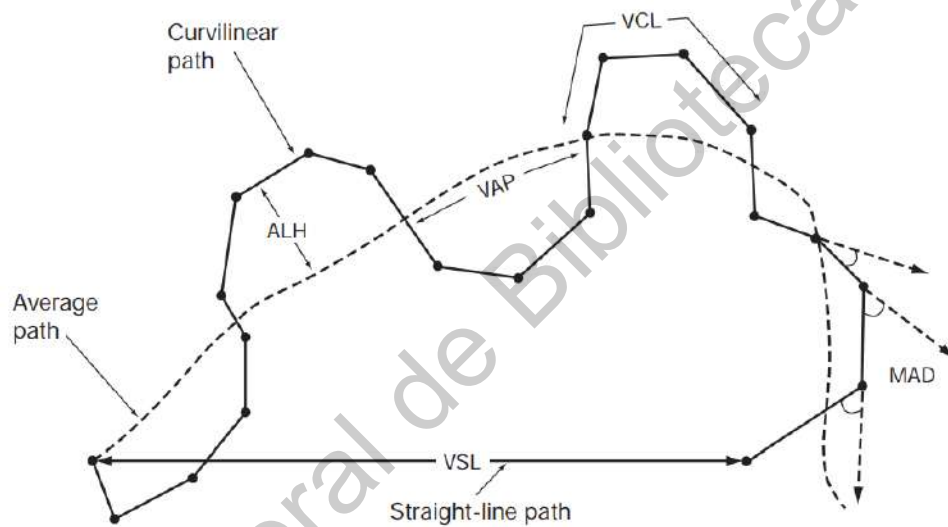
Un sistema CASA está formado por un microscopio óptico con una platina con control de temperatura, un ordenador, una cámara de video y un software. Para realizar las evaluaciones de motilidad este se basa en una imagen o una secuencia de las mismas (Figura 8) captada por la cámara con la cual determina la evaluación de la motilidad y la morfología espermática (Monserrat-Vallvé, 2017).



**Figura 8.** Muestra de semen de carnero analizado con sistema CASA. (Limper Congelaciones Profesionales S.A. de C.V., 2020).

Desde el punto de vista de Mortimer *et al.* (2015), estos sistemas nos permiten predecir la capacidad fecundante de las células espermáticas mediante la medición de múltiples características morfológicas y funcionales (Hernández-Corredor *et al.*, 2013). Puede realizar con precisión el análisis de la concentración de espermatozoides contenida en la muestra, categorías de motilidad y la capacidad de fertilización, además de la evaluación de la hiperactivación espermática necesaria para la fertilización ya sea in vivo o in vitro.

El criterio usado en estos sistemas de análisis para la evaluación de motilidad es la cinética de las células espermáticas es decir la trayectoria individual que estos siguen en relación con el tiempo transcurrido (Mortimer *et al.*, 2015). A partir de una muestra de espermatozoides el análisis por computadora determina las características de movimiento como la motilidad progresiva, velocidad de trayectoria y velocidad curvilínea (Amann & Waberski, 2014).



**Figura 9.** Variables de movimiento medidas por los sistemas CASA.

VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad en línea recta; VAP: velocidad media del trayecto; ALH: amplitud del desplazamiento; MAD: desplazamiento angular; Straight-line path: Ruta de movimiento en línea recta; Average path: Ruta de movimiento promedio; Curvilinear path: Ruta de movimiento curvilíneo. World Health Organization (2010).

Las variables de movimiento comúnmente medidas por el sistema CASA (Figura 9 y Cuadro 2) son velocidad curvilínea (VCL) la cual nos ayuda a estimar el valor del vigor celular a lo largo de su trayectoria; velocidad en línea recta (VSL), medida desde la primera posición observada hasta la última; velocidad media del trayecto (VAP); amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH); linealidad (LIN) que se mide como la velocidad curvilínea entre la velocidad rectilínea;

oscilación (WOB) que es la velocidad media del trayecto entre la velocidad curvilínea; rectitud (STR) que se estima como el promedio de la linealidad, se calcula como la velocidad en línea recta entre la velocidad del trayecto; velocidad promedio del cruce de la recta curvilínea con la ruta promedio (BCF); el desplazamiento angular medio y el promedio de los giros del espermatozoide a lo largo del movimiento curvilíneo (WHO, 2010).

**Cuadro 2.** Características de movimiento medidas en espermatozoides de carnero mediante sistema CASA.

Variable	Espermatozoides almacenados a 15 °C	Espermatozoides criopreservados a -196 °C		
MT (%)	73.8 ± 0.33	30.6 ± 7.9	40.52 ± 2.05	60.5 ± 9.7
MP (%)	48.5 ± 0.38	4.8 ± 3.2	16.94 ± 0.66	17.6 ± 3.9
VCL (µm/s)	142.7 ± 0.43	48.9 ± 8.9	73.05 ± 4.07	77.0 ± 10.8
VSL (µm/s)	94.6 ± 0.60	25.3 ± 7.3	32.26 ± 1.88	45.6 ± 8.9
VAP (µm/s)	114.8 ± 0.61	34.4 ± 8.0	45.73 ± 2.23	61.3 ± 9.8
LIN (%)	64.7 ± 0.29	-----	44.28 ± 1.76	-----
STR (%)	79.2 ± 0.16	-----	70.42 ± 1.49	-----
WOB (%)	78.4 ± 0.24	-----	62.81 ± 1.32	-----
FUENTE	Santolaria <i>et al.</i> , 2015.	Ashrafi <i>et al.</i> , 2011.	Arando <i>et al.</i> , 2019.	Mafolo <i>et al.</i> , 2020.

Mortimer & Mortimer (2012) detallan que la identificación del porcentaje de espermatozoides progresivos rápidos es una de las características más importantes, ya que esta provee la capacidad de movimiento a través del moco cervical del tracto genital de la hembra.

La evaluación de morfología espermática también es posible realizarla mediante las fotografías tomadas por el sistema CASA, estos generalmente son clasificados como normales o anormales a través de morfometría de la cabeza, la parte media, el área del acrosoma y la cola de los espermatozoides (WHO, 2010).



#### 2.6.4 Supervivencia espermática (viabilidad espermática)

Eckel *et al.* (2017) expresan que la viabilidad espermática es la cantidad proporcional de células espermáticas vivas en una muestra, la medición de este parámetro nos ayuda a determinar la calidad de los espermatozoides que podrán ser utilizados posteriormente en programas de reproducción asistida.

Mientras tanto D'Alessandro *et al.* (2001), destacan que el procedimiento de congelación puede afectar de manera considerable la viabilidad de las células espermáticas debido a un gran número de causas relacionadas con la técnica de congelación y posterior descongelación de los espermatozoides, factores como el método o la velocidad de enfriamiento además de los crioprotectores utilizados.



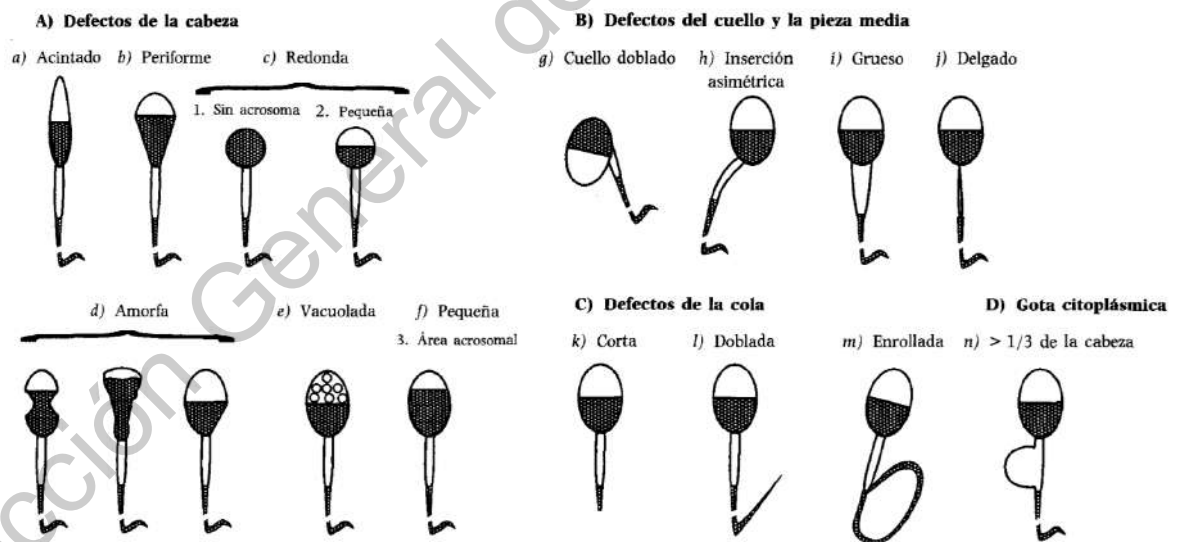
**Figura 10.** Frotis seminal teñido con Eosina-Nigrosina. Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography (2015).

Un procedimiento que nos posibilita evaluar la vitalidad de una muestra de células espermáticas es la tinción con eosina-nigrosina, la eosina nos permite teñir los espermatozoides muertos, observándose de color rosa oscuro a rojo, mientras que los espermatozoides de color blanco representarían a los espermatozoides vivos (Figura 10). La ventaja de utilizar en conjunto con nigrosina es que podemos obtener un mejor contraste y de esta manera podemos identificar más fácilmente las células vivas de las muertas (Agarwal *et al.*, 2016).

## 2.6.5 Morfología espermática

Como expresan Maroto-Morales *et al.* (2009), durante la evaluación normal del semen se incluye la examinación del tamaño y forma de los espermatozoides, como método de valoración del efecto de los procedimientos de congelación y posterior descongelación. Una disminución de la fertilidad del macho nos da como resultado una proporción aumentada de espermatozoides con anomalías.

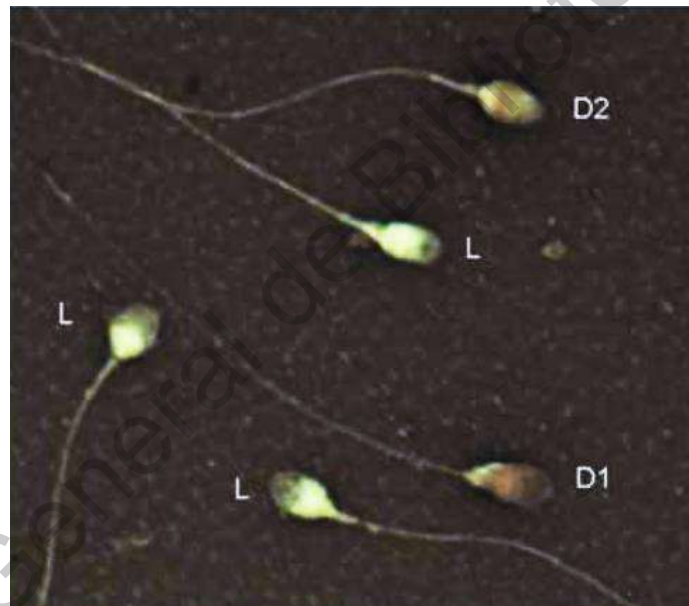
Se ha reportado previamente que los espermatozoides que presentan anomalías en la cabeza tienen estrecha correlación con la disminución de la motilidad, baja fertilidad relacionada con pérdidas embrionarias tempranas o incapacidad de fertilización del óvulo y muestran fragmentación del ADN (Martínez-Rodríguez *et al.*, 2015).



**Figura 11.** Anormalidades de las células espermáticas.

A: Anormalidades en la cabeza, B: Anormalidades en el cuello y en la parte media, C: Defectos en la cola, D: Exceso de citoplasma residual. World Health Organization (2010).

Las anomalías morfológicas pueden clasificarse de acuerdo al lugar donde se presentan (Figura 11). Anomalías en la cabeza: tamaño, cónica, piriforme, amorfa, vacuolada, área acrosómica pequeña, cabezas dobles. Anomalías del cuello y la parte media, inserción asimétrica de la pieza media en la cabeza, gruesa o irregular, muy doblada, anormalmente delgada. Defectos de la cola, cortas, múltiples, rotas, lisas, curvas muy anguladas, de ancho irregular, enrolladas. Exceso de citoplasma residual: esto se asocia con espermatozoides anormales producidos por un proceso espermatogénico defectuoso (WHO, 2010).

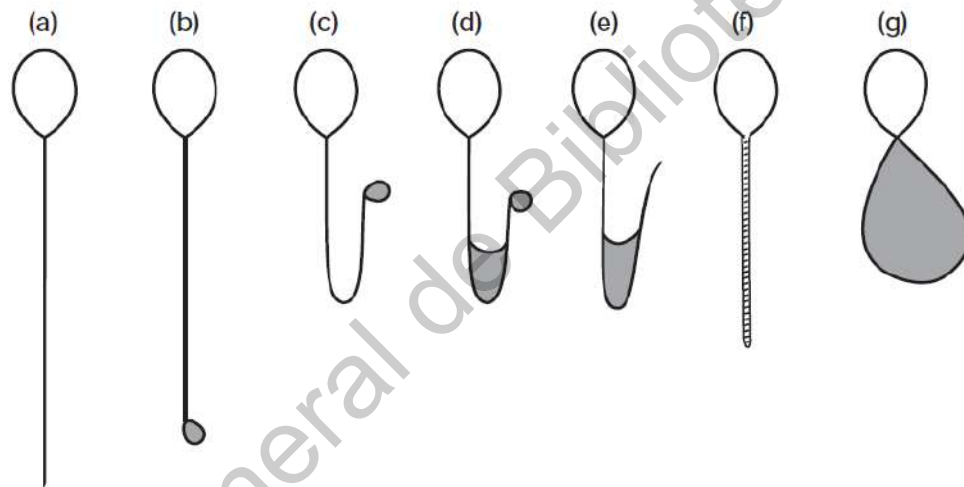


**Figura 12.** Frotis de muestra espermática teñido con eosina-nigrosina observado en microscopía de campo brillante. Los espermatozoides con cabezas rojas (D1) o rosa oscuro (D2) se consideran muertos (dañados por la membrana), mientras que los espermatozoides con cabeza blanca (L) o rosa claro se consideran vivos (membrana intacta). World Health Organization (2010).

Cabrera & Pantoja (2012) enfatizan que durante el proceso de congelación y descongelación las regiones que conforman el acrosoma del espermatozoide (zona acrosomal, post-acrosomal y el segmento ecuatorial) resultan dañadas (Figura 12). Es fundamental realizar la evaluación de la integridad, ya que al congelar las células

espermáticas pueden llegar a existir variaciones importantes por ejemplo disrupción o cambios en la actividad enzimática que tiene como efecto la capacitación espermática temprana, de manera que posteriormente se presenta disminución de la fertilidad porque la membrana desempeña un papel significativo en el momento de la fertilización del ovocito.

### 2.6.6 Integridad funcional de la membrana espermática



**Figura 13.** Representación esquemática de los cambios morfológicos en los espermatozoides sometidos a estrés hipo-osmótico. A: sin cambios (-); b-g: diferentes tipos de cambio (+). La hinchazón en la cola está indicada por el área gris. Jeyendran *et al.* (1984).

La membrana plasmática durante la fecundación es parte fundamental del metabolismo de la célula espermática, ya que participa en el reconocimiento del ovocito. Estudios previos han demostrado que el proceso de criopreservación afecta la integridad de esta membrana, disminuyendo la funcionalidad. De manera que debe realizarse la evaluación de la misma para determinar que se encuentra en óptimas características funcionales y estructurales (Rubio-Guillén, 2013).

Santiani *et al.*, (2004) refieren que la evaluación que mide la integridad funcional de la membrana espermática es la prueba hipo-osmótica (Figuras 13 y 14), en la cual se expone la célula a un medio hipo-osmótico, generalmente soluciones preparadas a base de fructosa y ácido cítrico, después de la incubación se determina la capacidad de hinchamiento de la membrana, las células vivas se diferencian por la evidencia de hinchazón de la cola de la célula espermática

## 2.7 Plasma seminal

Durante la eyaculación el semen evacuado contiene a los espermatozoides suspendidos en una mezcla de fluidos provenientes del epidídimo y las glándulas sexuales accesorias (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales), estas secreciones se definen como plasma seminal (Leahy *et al.*, 2019; Campanholi *et al.*, 2017).

El plasma seminal contiene moléculas como proteínas, azúcares, lípidos, entre algunos otros compuestos (Cuadro 3), que al interactuar con la superficie de las células espermáticas cumple diferentes funciones como participar en el metabolismo y motilidad de los espermatozoides, actuar como amortiguador para mantener la presión osmótica ideal, remodelar y proteger la membrana plasmática, e inhibir la capacitación prematura de los espermatozoides, además de intervenir en la protección de la fagocitosis y evitar el daño en condiciones inflamatorias en el tracto de la hembra, además facilita la interacción óvulo-espermatozoide (Swelum *et al.*, 2018; Druart & de Graaf, 2018; Gomes *et al.*, 2020; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2021).

Debido al papel fundamental que tiene el plasma seminal en la fertilidad, numerosas investigaciones han estudiado la composición y función de este fluido, destacando que existen diferencias importantes entre especies, lo cual lo hace objeto de estudio para su utilización en técnicas de reproducción asistida o como

complemento en la conservación de espermatozoides (Álvarez-Rodríguez & Martínez-Pastor, 2021).

**Cuadro 3.** Composición del plasma seminal en bovinos y ovinos.

Contenido	Bovino	Ovino
Fructosa	150-900	150-600
Glucosa	300	0.9-1.6
Ácido cítrico	340-1150	110-260
Proteínas totales (g/dL)	3.8	2.3-2.5
Lípidos totales	29	254-396
Fosfolípidos	149.1	-----
Colesterol	312.16	-----
Ácido glutámico	1.0-8.0	4.5-5.2
Sodio (Na)	140-280	120-258
Potasio (K)	80-210	50-140
Calcio (Ca)	35-60	6-15
Fosforo (P)	9	4.8-12.0
Cloro (Cl)	110-290	86
Magnesio (Mg)	7-12	2-13
Zinc (Zn)	2.6-3-7	56-179
Testosterona (pg/mL)	210-1310	25-375
Estrógeno (pg/mL)	20-166	-----
Prostaglandinas (ng/mL)	5-10	500-20 000
Fosfatasa alcalina (ALP)	246 BU/mL	14 895-40 818 mU/mL
Aspartato aminotransferasa (AST)	345-623 SFU/mL	190-256 mU/mL
Alanina aminotransferasa (ALT)	15.0-18.3 SFU/mL	39/148 mU/mL
Lactato deshidrogenasa (LDH)	1909 U/mL	968-1697 mU/mL

Fuente: Juvena & Stelletta, 2012.

### 2.7.1 Componentes químicos del plasma seminal y su función

El plasma seminal contiene proteínas provenientes de las secreciones del epidídimo y las glándulas sexuales accesorias, su papel principal es el mantenimiento de la estabilidad de la membrana de los espermatozoides, intervienen en aspectos como la motilidad, la capacitación la interacción

espermatozoide-óvulo y la fertilización, además de la promoción de la fagocitosis en células espermáticas muertas (Juyena & Stelletta, 2012).

Investigadores como Barrios *et al.* (2000) y Muiño-Blanco *et al.* (2008) han informado que las proteínas del plasma seminal tienen la capacidad de proteger las células espermáticas durante la congelación evitando o reduciendo considerablemente el choque térmico, además proporcionan actividad antioxidante.

Las proteínas contenidas en el plasma seminal presentan variaciones de acuerdo con la especie de la cual proviene, además su composición y cantidad puede ser afectada por la capacidad de producción y almacenamiento en el tracto genital del macho (Swelum *et al.*, 2018).

Existe una familia de proteínas en la especie bovina denominadas proteínas del plasma seminal (BSP), las cuales representan el 50-70% de las proteínas totales contenidas en el plasma seminal. Durante la eyaculación las proteínas BSP se agregan al espermatozoide en la superficie de su membrana estimulando la salida de colesterol, se ha establecido que los sitios de unión son los fosfolípidos de colina (fosfatidilcolina, plasminógeno de fosfatidilcolina y esfingomiélin) que en la membrana espermática representan alrededor del 60% de los fosfolípidos, la unión de las proteínas y los fosfolípidos permiten la estabilización de la membrana de la célula espermática (Manjunath *et al.*, 2007).

Manjunath *et al.* (2007) destacan que las proteínas BSP son moléculas pequeñas con pesos moleculares que van desde 15 a 30 kDa, y presentan diferentes formas de glicosilación. La concentración de los análogos de BSP contenidas en el plasma seminal difiere entre especies (Cuadro 4 y 5). Estas diferencias han sido relacionadas con la interacción de los espermatozoides en el tracto de la hembra, que difiere de acuerdo al lugar donde se deposita el semen (Druart & de Graaf, 2018).

Las proteínas del plasma seminal del carnero (RSP), homólogos de las proteínas BSP en el bovino representan apenas el 30% del porcentaje total de proteínas contenidas en el plasma seminal son las encargadas de estabilizar los fosfolípidos presentes en la membrana además tienen efectos de protección a las criolaciones producidas durante la preservación fosforilando la tirosina y manteniendo la actividad antioxidante (Juvena & Stelletta, 2012).

**Cuadro 4.** Análogos de proteínas BSP aislados del plasma seminal en diferentes especies.

Especie	Análogos de proteínas BSP
Bovino	BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, BSP-30 kDa
Ovino	RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa, RSP-24 kDa
Equino	HSP-1, HSP-2, HSP-12 kDa
Caprino	GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20 kDa, GSP-22 kDa
Porcino	pB1

Fuente: Bergeron & Manjunath (2006).

**Cuadro 5.** Concentración de los análogos de proteínas BSP en el plasma seminal de distintas especies.

Especies	Análogo de proteína BSP en plasma seminal (mg/ml)	Porcentaje de las proteínas totales (%)
Bovino	39.1	65
Ovino	15.0	30
Equino	2.0	20
Caprino	5.6	20
Suino	0.3	1.1

Fuente: Bergeron & Manjunath (2006).



Otro compuesto contenido en el plasma seminal son los aminoácidos, que tienen la función de reducir la cantidad de radicales libres, evitar la desnaturalización y proporcionar un sustrato oxidable para los espermatozoides, los más comunes son la prolina, glicina, histidina, alanina, y glutamina, las cuales se ha indicado que inhiben la peroxidación de lípidos y mantienen el equilibrio osmótico durante procesos de criopreservación. La l-arginina se encuentra presente en los rumiantes, su función es actuar como sustrato energético promoviendo la motilidad de los espermatozoides. (Juvena & Stelletta, 2012; Ugur *et al.*, 2020).

Las enzimas presentes en el plasma seminal más destacadas son la aspartato aminotrasferasa, superóxido dismutasa, alanina aminotrasferasa, glutatión peroxidasa, lactato deshidrogenasa y catalasa, las cuales actúan como agentes antioxidantes e inhibidores de la peroxidación de lípidos en las células espermáticas (Tavilani *et al.*, 2008).

El entorno iónico presente en el plasma seminal mantiene el equilibrio osmótico, el pH, además de estar involucrados en la motilidad de los espermatozoides, los más comunes encontrados son los cationes de sodio, potasio, magnesio y calcio. En rumiantes la información de las funciones específicas de los iones contenidos en el plasma seminal aún es escasa (Juvena & Stelletta, 2012)

Los principales azúcares contenidos en el plasma seminal son la glucosa y la fructosa, los cuales son necesarios esencialmente para la producción de energía y la motilidad de las células espermáticas, los azúcares contenidos en el plasma seminal a menudo son relacionados con la fertilidad de los espermatozoides (Assumpção *et al.*, 2005).

La membrana plasmática y el plasma seminal contienen cantidades importantes de lípidos, entre los más importantes se encuentran el colesterol, fosfolípidos, diglicéridos y triglicéridos, los cuales están asociados con la fluidez de la membrana, la movilidad, la viabilidad y la reacción acrosómica de las células espermáticas (Díaz *et al.*, 2016).

Las citocinas y las prostaglandinas presentes en el plasma seminal y que son secretadas por las vesículas seminales y las glándulas prostáticas tienen propiedades embriotróficas y contribuyen de manera significativa el desarrollo temprano del embrión (Robertson, 2005).

En general las funciones del plasma seminal es actuar como un medio nutritivo y que proporciona protección a los espermatozoides al ser expuestos al ambiente y las condiciones del tracto reproductivo de la hembra. La evaluación de las características bioquímicas del eyaculado proporciona información que puede ser relevante para el uso de técnicas de conservación como la criopreservación o la formulación de diluyentes con aditivos que permitan aumentar la calidad de los espermatozoides (Juvena & Stelletta, 2012).

### **2.7.2 Adición de proteínas de plasma seminal durante la preservación de espermatozoides ovinos**

Es bien sabido que durante la criopreservación de las células espermáticas ocurre una desestabilización de la membrana dada por el shock térmico al que se someten durante los cambios de temperatura propios de la técnica, este daño deteriora la funcionalidad de estas células, existen investigaciones que de acuerdo a sus resultados tiene una postura a favor o en contra de la utilización de plasma seminal como aditivo durante el enfriamiento y la congelación de estas células, los investigadores que están en pro de su utilización han observado un incremento en la protección y reparación del daño criogénico durante el proceso de preservación en los espermatozoides de carnero que se sabe son más sensibles al estrés por frío que los de otras especies (Muiño-Blanco *et al.*, 2008).

Ollero *et al.* (1997), evaluaron la adición de plasma seminal a espermatozoides de carnero criopreservados, las muestras de semen fueron obtenidas mediante vagina artificial, los tratamientos control se distribuyeron de la

siguiente manera, semen crudo sin diluir y semen lavado, semen crudo diluido en medio Fiser y semen lavado diluido en medio Fiser. El plasma seminal se adicionó de la siguiente manera semen crudo y lavado con adiciones de plasma seminal completo (RSP) o solo una fracción del plasma seminal (>10 kDa). Los resultados arrojaron que después de la descongelación los tratamientos que fueron adicionados con una fracción de plasma o plasma seminal completo incrementaron la integridad acrosómica y de la membrana plasmática de los espermatozoides, además de un incremento de la motilidad.

Posteriores estudios realizados por Barrios *et al.* (2000), en el cual somete espermatozoides de carnero incubados con proteínas plasmáticas seminales de carnero (RSP), a shock térmico, disminuyendo la temperatura de 25 °C a 5 °C y luego nuevamente llevadas a 25 °C, al realizar las evaluaciones observaron que aproximadamente el 65% de los espermatozoides con daño en la membrana plasmática pudieron restaurar su aspecto original.

Unos años después se estimó la calidad de los espermatozoides de carnero conservados a 5 °C utilizando plasma seminal adicionado en el medio de extensión (Triladyl) a concentraciones de 0, 10 y 25% (v/v), no presentaron cambios significativos durante las evaluaciones, sin embargo, disminuyó la motilidad y aumentó la cantidad de células capacitadas y con reacción acrosómica, por lo cual los autores concluyen que la adición de plasma seminal homólogo no mejora la conservación de los espermatozoides durante el enfriamiento (Morrier *et al.*, 2003).

A continuación, se evaluó el efecto de la adición de proteínas del plasma seminal de carnero durante la congelación de espermatozoides ovinos. Obteniendo un incremento significativo de la motilidad espermática durante el descongelado obteniendo valores de  $22 \pm 1.22\%$  y  $40 \pm 2.74\%$  para el control y el tratamiento con adición de plasma seminal respectivamente, además de un incremento significativo también en la viabilidad espermática con valores de  $20.9 \pm 2.11\%$  para el control y  $38.8 \pm 3.69\%$  para la muestra con adición de proteínas plasmáticas. Se pudo

concluir que la adición de proteínas de plasma seminal mejora la integridad de los espermatozoides post-descongelados (Cardozo et al., 2009).

Más tarde Bernardini *et al.*, (2011) afirmaron que la adición de proteínas de plasma seminal mejora la motilidad progresiva, a diferencia de la motilidad total. Concluyendo que la unión de las proteínas a los espermatozoides repara el daño causado durante la congelación descongelación mejorando la motilidad progresiva.

Al cabo de unos años Ledesma *et al.*, (2015) realizaron un estudio donde el semen se colectó mediante dos métodos, la vagina artificial y el electroeyaculado, posteriormente se añadió el plasma seminal de carneros de raza Corriedale antes de congelar los espermatozoides. Las evaluaciones mostraron que el plasma no tiene ningún efecto sobre la resistencia de los espermatozoides a la criolesión.

Posteriormente Martins *et al.* (2016), probaron la adición de plasma seminal heterólogo a los medios de extensión durante la congelación de espermatozoides de carnero. A los eyaculados de carnero agregaron un diluyente TEY, al primer tratamiento se le agregó únicamente diluyente (control), al segundo plasma seminal de carnero y al tercero plasma seminal de verraco. Los resultados resaltan que los espermatozoides post-descongelados no tuvieron efectos considerables sobre la motilidad o la integridad de membrana con adiciones de plasma homólogo ni heterólogo.

Durante el mismo año, Ledesma *et al.* (2016) evaluaron los efectos de la interacción de plasma seminal de carnero obtenido por dos métodos: vagina artificial y electroeyaculación, en la criopreservación de espermatozoides ovinos. Los resultados arrojan que la adición de ambos tratamientos muestra valores altos de motilidad total y motilidad progresiva. El plasma seminal colectado mediante vagina artificial incremento significativamente la estabilidad de membrana de los espermatozoides en comparación con el obtenido por electroeyaculado.

Una investigación más en la que fue adicionado plasma seminal a espermatozoides de carnero fue realizada por Swelum *et al.* (2018), en la cual se incluyó la adición de plasma seminal de macho cabrío, camello y carnero en muestras de semen por separado. Todos fueron llevados a temperatura de 5 °C durante 2 h, empaquetado en pajillas de 0.25 ml y congelado por vapor de nitrógeno a -196 °C. Los resultados obtenidos mostraron que la adición de plasma seminal de macho cabrío, camello y carnero mantienen altos niveles de motilidad, vitalidad, integridad del ADN y de la membrana plasmática, además de un decremento de los espermatozoides con anormalidades, posterior a la congelación.

### **2.7.3 Efectos de la adición de plasma heteroespecífico (bovino a ovino) en la preservación de espermatozoides de carnero**

Gunay *et al.*, (2006) evaluaron el efecto de adicionar 20% de plasma seminal al medio de dilución durante la congelación de espermatozoides de carnero Merino. El plasma seminal obtenido de un toro Holstein fue agregado a un medio TEY durante la dilución del semen y se mantuvo un tratamiento control solo diluido con TEY, dos grupos de hembras fue inseminado con cada uno de los tratamientos, se obtuvo una motilidad post-descongelado de 69.4% para el tratamiento con proteínas plasmáticas y 42.8% para el tratamiento control. El porcentaje de la tasa de no retorno no fue significativo, pero si visiblemente mayor en el tratamiento con BSP (31.8%) comparado con el control (28.6%). Los investigadores concluyeron que las proteínas de plasma seminal de toro proporcionan un efecto de apoyo durante la congelación de espermatozoides y mejoran la fertilidad.

Posteriormente durante la investigación llevada a cabo por López-Pérez & Pérez-Clariget (2012), se compararon las tasas de gestación obtenidas utilizando espermatozoides de carnero almacenados a 5 °C durante 24 h adicionando al diluyente plasma seminal de carnero o de toro durante la inseminación artificial. Se

señaló que se obtuvo un efecto significativo en el aumento de la tasa de gestación (49.7%) en el tratamiento con plasma seminal de carnero a diferencia del adicionado con plasma seminal de toro y el tratamiento control solo con diluyente (38.1%) y (31.1%) respectivamente.

Seguidamente estudios realizados por Baran *et al.* 2014 en espermatozoides de carneros Kivircik criopreservados a los cuales se les adicionó plasma seminal de toros Holstein durante la dilución, en concentraciones de 0%, 7.5% y 15%. Mostrando una mejora en la motilidad ( $30.90 \pm 12.47\%$ ) y en la morfología acrosómica ( $61.00 \pm 9.27\%$ ) en el grupo con adición de 7.5% de plasma seminal de toro. Concluyendo que la adición de plasma seminal heteroespecífico al medio de dilución aumenta la calidad espermática post-descongelado.

Una de las investigaciones más recientes señala que la adición de plasma seminal bovino en el diluyente para congelar semen de carnero, a una concentración de 5%, mejoró la integridad funcional de la membrana plasmática y tendió a mejorar la motilidad progresiva post-descongelado. Por lo cual, se sugiere que podría utilizarse como aditivo para el procesamiento de semen en esta especie (Vargas-Menéndez *et al.*, 2019).

## **2.8 Extracto antioxidante de nopal**

### **2.8.1 Características del nopal**

Las plantas del género *Opuntia* en México son llamados nopales, pertenecen a la familia de las cactáceas, género que incluye 11 subgéneros y hasta 300 especies. Las especies *O. ficus-indica*, *O. robusta*, *O. leucotricha* y *N. cochenilifera* son las especies más utilizadas como vegetales. México es uno de los países que posee una mayor diversidad de nopal en el mundo (Calvo-Arriaga *et al.*, 2010).

De acuerdo con lo que menciona Reyes-Agüero *et al.* (2005), en la zona centro del país es en donde se localiza la mayor producción de esta hortaliza, las características geográficas adecuadas para la producción son una altura que va de 0 a 2 600 msnm, lluvia anual de hasta 4 000 mm, una temperatura de 18 a 26 °C, y un suelo con textura arenosa, arcillosa y alto contenido de sales, con un pH de 6.5 a 8.5 (SIAP, 2018c).

Los principales nutrientes y antioxidantes contenidos en el nopal son carbohidratos, aminoácidos, fibra, vitamina C, minerales como potasio, magnesio y sodio, además de altos contenidos de fenoles y flavonoides (Shin *et al.*, 2011). El incremento en la búsqueda de fuentes importantes de antioxidantes naturales ha colocado al nopal en un lugar considerable, y ha estimulado el consumo y uso de este vegetal (Munguía-Reyes *et al.*, 2019).

Factores como la variedad, clima, fotoperiodo, estación de cosecha, y prácticas de cultivo influyen en las características fisicoquímicas de esta cactácea y sus variaciones (Torres-Bojórquez *et al.*, 2017).

Investigaciones recientes han determinado que el uso de extractos derivados del nopal puede llegar a tener una capacidad antioxidante de hasta el 80%, por lo cual se ha sugerido evaluar su uso como aditivo biológico y/o alimenticio (Shin *et al.*, 2011). Sin embargo, existen factores que pueden influir de manera importante en la eficiencia de la extracción de estos compuestos antioxidantes a partir del nopal como el tamaño de la partícula, los tiempos de procesamiento, el tipo y la concentración de los disolventes y la relación disolvente-sólido (Chaalal *et al.*, 2012).

Chaudhari *et al.* (2008) destacan que los principales componentes antioxidantes del nopal son tocoferol, polifenol, flavonoides, ácidos fenólicos, se ha destacado que debido a su composición bioquímica la adición de extractos obtenidos a base de nopal tiene un efecto positivo durante la congelación de

espermatozoides, logrando estabilizar sus membranas y reduciendo el efecto de la peroxidación lipídica.

### **2.8.2 Adición de antioxidantes en la congelación de espermatozoides**

Como ya se ha mencionado los radicales libres son moléculas con un grado muy alto de reactividad, las membranas de los espermatozoides de carnero son demasiado vulnerables debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, alterando características que son críticas para la funcionalidad de las células espermáticas (Villaverde *et al.*, 2019).

Cuando existe un desequilibrio entre la cantidad de radicales libres presentes y la capacidad antioxidante de la célula dado por el descenso de la temperatura ocurre lo que llamamos como estrés oxidativo (Izquierdo *et al.*, 2020). Además, los metabolitos producidos por la peroxidación lipídica pueden desencadenar la producción de más ROS, generando un ciclo que se perpetúa en la célula. El incremento del estrés oxidativo puede dañar el ADN de los espermatozoides y causar daños que pueden llegar a ser irreversibles o incluso provocar la apoptosis de la célula (Aitken, 2017; Liu *et al.*, 2021).

Martínez-Paramo *et al.* (2009), señalan que la protección necesaria contra el daño que producen los radicales libres a los espermatozoides se encuentra dada en condiciones biológicas naturales por antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa contenidas en el plasma seminal (Hammadeh *et al.*, 2009). Esta protección que provee el plasma seminal se reduce considerablemente durante el proceso de dilución del semen previo a la criopreservación.

Liu *et al.* (2021) argumenta que la combinación de agentes crioprotectores con antioxidantes durante la dilución del semen previo a la criopreservación puede mejorar de manera considerable la eficiencia de este proceso.



Los antioxidantes son aditivos que pueden contrarrestar el deterioro asociado al estrés que presenta la célula durante los procesos de congelación y descongelación. Se ha observado que cuando sustancias antioxidantes son agregadas en las concentraciones adecuadas se puede disminuir de manera importante el daño causado por las especies de oxígeno reactivo. Otros estudios han revelado que la eficacia que poseen los antioxidantes depende también de la calidad de los espermatozoides utilizados (Len *et al.*, 2019).

Existen antioxidantes de tipo enzimático y no enzimático (Dutta *et al.*, 2019). Los enzimáticos están conformados por la catalasa, que es la encargada de descomponer al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, esta se encuentra en el líquido seminal y en las células espermáticas; la superóxido dismutasa que convierte al superóxido en peróxido de hidrógeno, su actividad ha sido relacionada con la motilidad de las células espermáticas; y por último la familia enzimática del glutatión que comprende una serie de enzimas que al igual que las anteriores se encargan de la disminución de la cantidad de radicales libres. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen a la vitamina E, la vitamina C, la L-Carnitina, L-cisteína, melatonina, quercetina y resveratrol (Paoli *et al.*, 2019).

Durante la criopreservación se ha informado efectos positivos y negativos de la adición de los mismos, las ventajas que estos presentan son, en primer lugar, la disminución de la producción y la eliminación de ROS, evitan la fragmentación del ADN, pueden aumentar parámetros de motilidad, incremento de la integridad del acrosoma, pueden aumentar las tasas de fertilidad. Los efectos negativos incluyen que la adición de concentraciones altas puede afectar de manera negativa la motilidad espermática, o pueden ser tóxicos para la célula (Liu *et al.*, 2021).

A lo largo de los años se ha estudiado la adición de antioxidantes al medio de dilución previo al enfriamiento y congelación de los espermatozoides, y se ha evaluado el efecto que estos presentan. Uno de los aditivos antioxidantes más conocidos es la Vitamina E, el cual se ha observado que promueve un incremento de la motilidad y una mejora en la integridad de membrana (Ugur *et al.*, 2019).

Estudios realizados por Azawi & Hussein (2013), en los que adicionaron 1 mg/ml de vitamina E al diluyente a base de Tris mejoro la viabilidad y motilidad de los espermatozoides de carnero Awassi almacenados a 5 °C. Sin embargo, las desventajas que fueron observadas durante la investigación es que la capacidad del  $\alpha$ -tocoferol para mantener una tasa estable de reducción de radicales peroxilo en la membrana plasmática depende su interacción con otras moléculas reductoras como el ascorbato o los tioles.

La vitamina C también ha sido probada como aditivo de los extensores, debido a su capacidad para neutralizar radicales libres (Ugur *et al.*, 2019). La adición de 0.9 mg/ml de vitamina C al diluyente a base de Tris disminuyo anomalías de los espermatozoides y defectos acrosomales de espermatozoides de carnero Awassi después de 120 horas de incubación a 5 °C (Azawi & Hussein, 2013).

Las desventajas del uso de ácido ascórbico es que se oxida rápidamente en dehidroascorbato inactivo cuando se expone a un entorno altamente oxidativo. Debido a su inestabilidad, es difícil mantener su actividad durante la exposición de espermatozoides a ambientes oxidativos altos durante largos períodos de tiempo (Amidi *et al.*, 2016).

Desde hace unos años se han utilizado una gran cantidad de especies de plantas y sus extractos para el almacenamiento de semen humano y de algunas otras especies animales, se ha incluido en los diluyentes observando mejoras en la calidad de los espermatozoides y un aumento de su capacidad de fertilización (Ros-Santaella & Pintus, 2021).

Especies vegetales como *Opuntia ficus* contiene elementos como la catalasa, R-tocoferol y ácido ascórbico que son compuestos antioxidantes contra ROS, la actividad antioxidante se lleva a cabo de la eliminación de radicales libres o actividad indirecta mediante elementos quelantes (Lee *et al.*, 2003). Se ha señalado que es una fuente significativa de oligoelementos naturales (Dhaouadi *et al.*, 2012). Estudios en los cuales ha sido agregado como aditivo señalan un efecto

de protección contra la fragmentación del ADN de los espermatozoides, señalando que el extracto de *Opuntia ficus* representa una alternativa para la conservación de células espermáticas (Paoli *et al.*, 2019).

### **2.8.3 Efectos de la adición de extracto antioxidante de nopal durante la preservación de espermatozoides ovinos**

Estudios previos han observado propiedades antioxidantes naturales en vegetales y frutas; el nopal (*Opuntia ficus-indica*) gracias a sus antioxidantes naturales, durante el proceso de congelación de espermatozoides provee un efectivo mantenimiento de la motilidad, viabilidad e integridad del ADN (Meamar *et al.*, 2012).

La efectividad del extracto de *Opuntia ficus-indica* se evaluó al adicionarlo a semen de carnero almacenado en refrigeración a 5 °C, utilizando este extracto en una concentración de 1% se obtuvo un efecto antioxidante significativo en los espermatozoides y una mejora significativa en la medición de las variables motilidad espermática, motilidad progresiva, viabilidad, integridad de la membrana, morfología, oxidación y fragmentación del ADN (Allai *et al.*, 2016).

Un par de años después AL-Helal & Hobi (2018), demostraron que el uso de diluyente con Tris, ácido cítrico, fructosa y yema de huevo (TCFEY) adicionado con una concentración de 1% de extracto de alcoholes de *Opuntia ficus indica* durante la refrigeración (5 °C) de semen de carnero mostró alta motilidad individual espermática, integridad de la membrana plasmática y baja mortalidad de los espermatozoides posterior al descongelado.

Recientemente Olvera-Bermúdez *et al.* (2019), evaluaron el efecto de añadir extracto de nopal (*Opuntia-ficus* var. *Copena* F1) a un diluyente de tipo comercial, durante el proceso de criopreservación de espermatozoides ovinos. Estimaron diferentes niveles de adición (0, 0.5, 1.0, y 1.5%), cuando se adicionó una

proporción de 0.5% de extracto acetónico de nopal se observó un incremento de la calidad de los espermatozoides, observando un efecto detrimental al incrementar la concentración del aditivo. Además, se observó un incremento significativo de la motilidad progresiva durante el enfriamiento 72.5% para la adición de 0.5% y 68.5% para el tratamiento control, al igual que en la motilidad progresiva post-descongelado obteniendo resultados de 44.2% y 38.7% para el tratamiento con adición de 0.5% y el control respectivamente. Los investigadores destacaron la importancia de realizar pruebas adicionales como la evaluación de la fertilidad utilizando este aditivo en la congelación de espermatozoides ovinos.

Dirección General de Bibliotecas UAG

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Evaluar si se produce un efecto sinérgico de protección al adicionar a un diluyente comercial, plasma seminal bovino y extracto antioxidante de nopal con respecto a la calidad post-descongelado de espermatozoides ovinos criopreservados.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

En espermatozoides de ovino adicionado con plasma seminal (5%) y extracto acetónico de nopal (0.5%) evaluar post-descongelado:

1. La motilidad espermática y sus características.
2. La estabilidad de la membrana celular.

### **IV. HIPÓTESIS**

La relación entre la adición de plasma seminal heteroespecífico y el extracto de nopal en la calidad de los espermatozoides post-descongelado es sinérgica.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

Esta investigación forma parte del proyecto titulado “Estrategias para mejorar la sobrevivencia y funcionalidad de espermatozoides de carnero sometidos a congelación-descongelación”. La autorización ética para la realización de los procedimientos y técnicas de manipulación de animales fue aprobada por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales (94FCN2019).

### **5.1 Ubicación experimental**

El trabajo experimental se llevó a cabo en el laboratorio de Reproducción Animal ubicado en la Unidad Amazcala perteneciente a la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, en el municipio de El Marqués (20°42'47.7"N y 100°15'41.7"O), con una altitud de 1 850 m s. n. m., temperatura y precipitación media anual de 26.2 °C y 515.5 mm (SMN, 2010).

Las evaluaciones de motilidad se llevaron a cabo en la unidad de colección y procesamiento de semen LIMPER Congelaciones Profesionales S. A de C.V. ubicada en San José el Alto, Querétaro, Qro.

### **5.2 Obtención de plasma seminal bovino**

Las muestras de plasma seminal bovino utilizadas se obtuvieron de acuerdo al procedimiento previamente descrito por Vargas-Menéndez *et al.*, (2019). Toros de las razas Holstein y Jersey residentes de LIMPER Congelaciones Profesionales S.A. de C.V. fueron usados como donadores. Los animales se seleccionaron de acuerdo a su alta resistencia a la congelación de acuerdo a los registros de la unidad (sobrevivencia espermática post-descongelado  $\geq 85\%$ ).

Para separar el plasma seminal los eyaculados fueron centrifugados a una temperatura de 4 °C por 15 min a 2 000 rpm y el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm durante 60 min (Jobim *et al.*, 2004). El plasma seminal obtenido se congeló a una temperatura de -70 °C en alícuotas suficientes para todas las réplicas del experimento.

### **5.3 Obtención de extracto acetónico de nopal**

En cuanto a la elaboración del extracto acetónico de nopal se llevó a cabo mediante la técnica descrita y evaluada por Olvera-Bermúdez *et al.* (2019). Se obtuvieron pencas de *Opuntia-ficus* con un grado de maduración uniforme, se lavaron y se cortaron en trozos pequeños con la finalidad de facilitar su secado. Se dividieron los trozos de nopal en charolas, y se introdujeron en una estufa de secado convectivo a una temperatura de 55 °C durante 72 horas, para entonces el nopal pierde aproximadamente un 91.5% de su peso correspondiente a la humedad contenida.

Posteriormente el nopal seco fue triturado con una criba de 1 mm, las partículas resultantes fueron mezcladas a razón de 5 g por cada 100 ml de mezcla acetona/agua en una proporción 70:30, la solución fue mezclada a temperatura ambiente durante 96 horas a 700 rpm. Transcurrido el tiempo la solución fue filtrada en papel filtro Watman No.4, el extracto resultante se llevó a rotaevaporación a una temperatura de 38 °C hasta eliminar por completo la acetona del extracto y finalmente se liofilizó. Después, fueron retiradas de la liofilizadora las charolas que contenían el extracto y este fue colocado en frascos color ámbar que se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4 a 5 °C hasta su utilización.

#### 5.4 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar, con arreglo factorial 2X2 considerando el efecto de la adición de plasma seminal y extracto antioxidante de nopal (Cuadro 6). Se probó el efecto de asociar los niveles de ambos aditivos que en experimentos previos han dado los mejores resultados, 5% de plasma seminal (Vargas-Menéndez *et al.*, 2019) y 0.5% de extracto acetónico de nopal (Olvera-Bermúdez *et al.*, 2019).

**Cuadro 6.** Diseño experimental para determinar el efecto de adición de plasma seminal y extracto de nopal

PLASMA SEMINAL BOVINO (PS)	EXTRACTO DE NOPAL (EN)	
	Sin adición de extracto de nopal	Adición del 0.5% de extracto de nopal
Sin adición de plasma seminal	T0	T2
Adición del 5% de plasma seminal	T1	T3

#### 5.5 Colección, evaluación y procesamiento de semen

Los procedimientos se llevaron a cabo conforme a lo descrito por García (2018) para la colección, evaluación y procesamiento de semen de carnero, mismos que fueron establecidos en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.



Se utilizaron de 4 a 8 carneros de raza Black Belly como donadores de semen, adultos (2 a 5 años de edad), sin antecedentes de enfermedad, en adecuado estado nutricional (IMC  $\geq 8.5$ ), con capacidad reproductiva evaluada como satisfactoria (Kimberling & Parsons, 2007) y que en condiciones de monta natural presentaron antecedentes de fertilidad normal.

En cada uno de los experimentos y sus repeticiones (15), se colectaron eyaculados por medio de vagina artificial de un número variable de carneros de acuerdo al número de tratamientos establecidos y con eyaculados de un mismo macho se realizó un "pool" de semen a partir del cual se obtuvieron las alícuotas correspondientes, de esta manera se controló el efecto de individuo sobre las características del eyaculado. Para ser utilizado, cada eyaculado en lo individual debió tener un volumen  $\geq 1.0$  ml, concentración  $\geq 2 \times 10^9$  células/ml,  $\geq 70\%$  de motilidad progresiva individual y  $< 10\%$  de anormalidades totales.

El diluyente/extensor para procesamiento fue en todos los casos uno comercial (OPTIDYL, CRYO-VET). En el tratamiento control (T0) se adicionó únicamente el diluyente, en el tratamiento 1 (T1) se adicionó el diluyente más 5% de plasma seminal; en el tratamiento 2 (T2) se adicionó el diluyente más 0.5% de extracto acetónico de nopal; y en el tratamiento 4 (T4) se le adicionó el diluyente comercial más 5% de plasma seminal y 0.5% de extracto acetónico de nopal, se realizaron 15 repeticiones en total.

El proceso de extensión se realizó en un solo paso para lograr una concentración de  $200 \times 10^6$  células espermáticas/ml. El empaqueo se realizó en pajillas de 0.25 ml y fue sellado con alcohol polivinílico para después proceder al enfriamiento de 37 a 4 °C, en un tiempo de 4 h y posteriormente un tiempo de equilibrio de entre 18 a 20 h. Concluido el equilibrio se realizó la congelación por contacto con vapor de nitrógeno, 15 min a 5 cm del espejo de nitrógeno líquido en la cámara de congelación y después las pajillas se transfirieron a nitrógeno líquido. La descongelación de pajillas y evaluación espermática post-descongelado se realizó después de permanecer al menos 72 h en el nitrógeno líquido.

## 5.6 Evaluación de las muestras

Para determinar la sobrevivencia y funcionalidad de las células espermáticas post-descongelado se realizaron las siguientes pruebas:

- a) Motilidad espermática y sus patrones por medio de un sistema de análisis de semen auxiliado por computadora (Apéndice 1).
- b) Integridad funcional de la membrana espermática por medio de la prueba de expansión hipo-osmótica (Jeyendran *et al.*, 1984; Apéndice 2).

## 5.7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software JMP Pro 14 (SAS Institute Inc.), la significancia estadística se estableció en un valor de  $P \leq 0.05$ . Las variables se expresaron como media  $\pm$  error estándar (e. e.). El análisis se realizó por medio de ANDEVA considerando como variables independientes la adición de plasma seminal y la adición de extracto antioxidante de nopal mediante un arreglo factorial completo: efecto del plasma seminal (PS), efecto del extracto de nopal (EN) y efecto de la interacción entre el plasma seminal y el extracto de nopal (PS x EN). Las variables de respuesta expresadas en porcentaje fueron transformadas al arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción para normalizarlas.

## VI. RESULTADOS

### 6.1 Concentración espermática

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar un efecto de interacción significativo ( $P=0.03$ ) entre el plasma seminal y el extracto de nopal (PS x EN) sobre la concentración de células espermáticas al descongelado (CE), expresadas en millones de células por mililitro (M/ml), el cual fue mayor en el grupo con adición de 0.5% de extracto de nopal (Cuadro 7). El resto de los tratamientos no presentaron un aumento con respecto al grupo control.

**Cuadro 7.** Efecto de la adición de plasma seminal (PS), extracto de nopal (EN) y su interacción (PS x EN) sobre la concentración espermática (CE) al descongelado en millones de espermatozoides de carnero criopreservados por mililitro.

VARIABLE	TRATAMIENTO				ANDEVA			
	T0	T1	T2	T3	e. e.	PS	EN	PS x EN
CE (M/ml)	118.34 <sup>a</sup>	128.10 <sup>ab</sup>	151.78 <sup>b</sup>	113.37 <sup>a</sup>	22.9	P=0.19	P=0.39	P=0.03

Niveles de adición: T0: control negativo, sin adiciones; T1: plasma seminal al 5%; T2: extracto de nopal al 0.5%; T3: plasma seminal al 5% más extracto de nopal al 0.5%. M/ml: millones de espermatozoides por mililitro. <sup>a, b</sup> Literales diferentes dentro de filas indican diferencia estadística.

### 6.2 Motilidad espermática y sus características

Se observaron efectos significativos ( $P\leq 0.05$ ) en la interacción PS x EN sobre el número total de espermatozoides motiles y el número de espermatozoides con motilidad progresiva (Cuadro 8). La adición conjunta de plasma seminal y extracto antioxidante de nopal disminuyó ( $P\leq 0.05$ ) el número total de espermatozoides motiles ( $47.27 \pm 17.23$  M/ml), pero no así el número de espermatozoides con

motilidad progresiva. La adición de extracto antioxidante de nopal (T2) aumentó el número de espermatozoides con motilidad progresiva ( $30.98 \pm 7.57$  M/ml) en comparación con el control ( $18.76 \pm 7.57$  M/ml), sin influir en el número total de espermatozoides motiles. La adición de plasma seminal (T1) no influyó en ninguna de estas dos variables de manera significativa.

**Cuadro 8.** Efecto de la adición de plasma seminal (PS), extracto de nopal (EN) y su interacción (PS x EN) en el número total de espermatozoides motiles (MT) y el número de espermatozoides con motilidad progresiva (MP), en millones de espermatozoides de carnero criopreservados por mililitro.

VARIABLE	TRATAMIENTO				ANDEVA			
	T0	T1	T2	T3	e. e.	PS	EN	PS x EN
MT (M/ml)	71.41 <sup>a</sup>	75.61 <sup>a</sup>	79.51 <sup>a</sup>	47.27 <sup>b</sup>	17.2	P=0.11	P=0.22	P=0.03
MP (M/ml)	18.76 <sup>a</sup>	23.81 <sup>ab</sup>	30.98 <sup>b</sup>	16.91 <sup>a</sup>	7.57	P=0.31	P=0.46	P=0.01

Niveles de adición: T0: control negativo, sin adiciones; T1: plasma seminal al 5%; T2: extracto de nopal al 0.5%; T3: plasma seminal al 5% más extracto de nopal al 0.5%. M/ml: millones de espermatozoides por mililitro. <sup>a, b</sup> Literales diferentes dentro de filas indican diferencia estadística.

El porcentaje de espermatozoides criopreservados motiles totales se observó influido por el efecto de adición de extracto de nopal, presentando un decremento significativo ( $P=0.002$ ) cuando fue añadido este extracto en comparación con el grupo control sin su adición ( $49.95$  vs.  $56.75 \pm 4.12\%$  espermatozoides motiles totales, con y sin adición de extracto de nopal). No se presentaron efectos significativos ( $P \geq 0.05$ ) por la adición de plasma seminal ( $51.85 \pm 4.12\%$ ) ni por la interacción PS x EN.

Para el porcentaje de espermatozoides criopreservados con motilidad progresiva se observó un efecto significativo ( $P=0.03$ ) en la interacción PS x EN, mostrando un incremento en el tratamiento al que solo se le agregó 0.5% de extracto de nopal en comparación con el grupo control ( $19.32$  vs.  $15.85 \pm 2.30\%$  de

espermatozoides con motilidad progresiva para adición de extracto de nopal vs. control). La adición de plasma seminal o de plasma seminal más extracto antioxidante de nopal no influyó en esta variable (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Efecto de la adición de plasma seminal (PS), extracto de nopal (EN) y su interacción (PS x EN) en el porcentaje de espermatozoides de carnero motiles progresivos (MP) criopreservados.

VARIABLE	TRATAMIENTO				ANDEVA			
	T0	T1	T2	T3	e. e.	PS	EN	PS x EN
MP (%)	15.85 <sup>a</sup>	17.47 <sup>ab</sup>	19.32 <sup>b</sup>	16.26 <sup>ab</sup>	2.30	P=0.31	P=0.72	P=0.03

Niveles de adición: T0: control negativo, sin adiciones; T1: plasma seminal al 5%; T2: extracto de nopal al 0.5%; T3: plasma seminal al 5% más extracto de nopal al 0.5%. M/ml: millones de espermatozoides por mililitro. <sup>a, b</sup> Literales diferentes dentro de filas indican diferencia estadística.

El análisis de las variables de cinética espermática en el total de espermatozoides motiles criopreservados mostró que la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad promedio del trayecto (VAP), el índice de linealidad (LIN), el índice de rectitud (STR) y el índice de oscilación (WOB) fueron influidas ( $P \leq 0.05$ ) por la adición de extracto antioxidante de nopal (EN) a diferencia de la velocidad en línea recta (VSL) que no fue influida por este factor. La VCL y la VAP disminuyeron ( $P \leq 0.05$ ) cuando se adicionó el extracto de nopal en comparación con el grupo al que no fue agregado (140.36 vs.  $163.85 \pm 11.96 \mu\text{m/s}$  y 74.32 vs.  $80.87 \pm 5.48 \mu\text{m/s}$  para VCL y VAP en los grupos con y sin adición de extracto antioxidante de nopal). Por el contrario, LIN, STR y WOB se vieron incrementados por la adición de extracto de nopal (EN) con respecto al grupo control en el que no fue adicionado el extracto (47.53 vs.  $42.07 \pm 1.79\%$ , 81.50 vs.  $72.88 \pm 1.19\%$  y 53.35 vs.  $49.30 \pm 1.33\%$  para LIN, STR y WOB en los grupos con y sin extracto antioxidante de nopal). En ninguno de los casos se mostraron efectos de la adición de plasma seminal (PS) o de la interacción PS x EN.

Mientras tanto para la evaluación de las variables de cinética espermática en los espermatozoides criopreservados únicamente con movimiento progresivo se observó que la VSL, VAP, LIN, STR Y WOB fueron influidas ( $P \leq 0.05$ ) por la adición de extracto antioxidante de nopal (EN), a diferencia de la VCL la cual no fue modificada por este factor. La VSL, VAP, LIN y STR incrementaron en este segmento de espermatozoides motiles cuando fue adicionado extracto de nopal en contraste con el grupo al que no fue agregado ( $122.58$  vs.  $114.31 \pm 3.71 \mu\text{m/s}$ ,  $135.90$  vs.  $128.99 \pm 4.15 \mu\text{m/s}$ ,  $52.01$  vs.  $48.03 \pm 1.87\%$  y  $90.27$  vs.  $88.58 \pm 0.50\%$  para las variables VSL, VAP, LIN Y STR respectivamente en los grupos con y sin extracto de nopal). De manera contraria la oscilación (WOB) se vio disminuida por la adición de extracto antioxidante de nopal ( $178.19 \pm 4.30\%$ ) en comparación con el grupo control al que no fue adicionado ( $186.19 \pm 4.30\%$ ). No se mostraron efectos en ninguno de sus casos en la adición de plasma seminal (PS) o en la interacción PS x EN.

### **6.3 Integridad de la membrana celular de los espermatozoides**

En cuanto al porcentaje de espermatozoides con integridad funcional de membrana (positivos a la prueba de expansión hipo-osmótica, H+) se encontró un efecto del extracto de nopal ( $P=0.002$ ) más no así de plasma seminal bovino o de la interacción PS x EN. El porcentaje de células espermáticas H+ fue ligeramente menor en el grupo al que se le añadió extracto antioxidante de nopal en comparación con el grupo control ( $33.31$  vs.  $35.91 \pm 1.57\%$  células espermáticas H+ en los grupos con y sin adición de extracto antioxidante de nopal).

## VII. DISCUSIÓN

La utilización de plasma seminal bovino durante el proceso de criopreservación de espermatozoides ovinos ha sido estudiado desde hace años (Gunay *et al.*, 2006; Baran *et al.*, 2014). Se sabe que el plasma seminal cumple una diversidad de funciones como proveer nutrientes al espermatozoide, protegerlo cuando se expone a las condiciones del ambiente vaginal en el tracto de la hembra, regular el proceso de capacitación además de algunas otras funciones (Szczykutowicz *et al.*, 2019). De manera contraria Bedford (2015) señala que no es esencial la presencia de plasma seminal en eventos como el transporte de los espermatozoides en el tracto reproductor de la hembra. Inclusive su relevancia en la fertilidad se ha puesto en duda (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2021). Además, se ha llegado a considerar como perjudicial por lo que se ha reducido o eliminado de manera habitual en el carnero (García *et al.*, 2017) y en algunas otras especies como las cabras (Tabarez *et al.*, 2017; Yusoff *et al.*, 2011), cerdos (Pavaneli *et al.*, 2019) y equinos (Love *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2005).

Vargas-Menéndez *et al.* (2019) encontraron que la adición de plasma seminal bovino en una concentración de 5% a espermatozoides de carnero durante la dilución previa a la criopreservación mejora la integridad funcional de membrana sin efecto significativo sobre la motilidad progresiva posterior al descongelado y los parámetros de esta motilidad. En contraste, los resultados de la presente investigación indican que la adición de plasma seminal no presentó efecto significativo ( $P \geq 0.05$ ) en ninguna de las variables que fueron evaluadas incluyendo la integridad funcional de membrana. Lo anterior, no podría explicarse por una diferencia en la composición del plasma seminal adicionado debido a que se utilizó el mismo que en el estudio de Vargas-Menéndez *et al.* (2019). No obstante, existe la posibilidad de degradación de las proteínas presentes en el plasma seminal durante su almacenamiento y descongelación (Ezzati *et al.*, 2020). Debido al volumen en el que las muestras de plasma seminal se encontraban almacenadas

fue necesario descongelar y congelar nuevamente el plasma seminal en alícuotas de menor volumen suficientes para el total de las réplicas del experimento. Se ha mencionado que las muestras de proteínas congeladas solo deben ser descongeladas una vez para su uso debido a que los ciclos repetidos de congelación-descongelación disminuyen su estabilidad lo cual conduce a una pérdida de su actividad biológica (Bhatnagar *et al.*, 2007),

Aún no se conoce del todo si existe alguna diferencia en la acción de las proteínas BSP en bovinos y las RSP en el carnero, se sabe que ambas se unen a los fosfolípidos de colina de la membrana del espermatozoide y que la composición del plasma seminal presenta características comunes debido a que ambas especies se encuentran estrechamente relacionadas (Leahy & de Graaf, 2012). De manera que, será necesario realizar futuras investigaciones encaminadas a analizar y caracterizar de manera extensa al plasma seminal y la acción de dichas proteínas en la membrana de las células espermáticas en ambas especies.

Por otro lado, el incremento por efecto de la adición de extracto de nopal, observado en la concentración de espermatozoides podría deberse a problemas durante el manejo de las muestras o lecturas erróneas del sistema CASA como menciona Samper (2009). Es común que partículas grandes suspendidas en la muestra puedan confundirse con cabezas de espermatozoides durante la lectura de muestras en sistemas CASA. Sin embargo, llama la atención el hecho de que en el tratamiento al que también se le agregó extracto de nopal combinado con plasma no se presentó este incremento. Escudero *et al.* (2019), explica que factores como la tasa de dilución, el tiempo de reposo, la repetibilidad de pipeteo y el área evaluada puede modificar las lecturas de la concentración de espermatozoides. Además, el análisis de espermatozoides mediante láminas o lejas llenadas por capilaridad pueden conducir a una estimación errónea debido al flujo y migración de células conocido como efecto Segre-Silberberg (Douglas-Hamilton *et al.*, 2005). El conjunto de todos estos factores puede explicar las variaciones que se presentan aún en sistemas más precisos como el análisis de semen asistido por computadora.



El incremento observado en el número de espermatozoides con motilidad progresiva que corresponde al tratamiento de extracto de nopal está acorde con el incremento señalado por Olvera-Bermúdez *et al.* (2019), los cuales señalan que la adición de extracto antioxidante de nopal mejora la motilidad progresiva de espermatozoides de carnero post-descongelado. La motilidad progresiva de las células espermáticas es considerada como uno de los parámetros más importantes durante la penetración de la zona pelúcida tanto en condiciones in vivo como in vitro (Turner, 2005). Estudios realizados por Simón & Lewis (2011), destacan que las tasas de fertilización se encuentran directamente relacionadas con la motilidad progresiva, aunque a su vez mencionan que la evaluación del daño al ADN en el espermatozoide provee información mucho más sólida al respecto.

La adición de extracto de nopal influyó en el porcentaje de espermatozoides motiles, presentando un ligero decremento cuando se es adicionado. A pesar de observarse una disminución Hernández *et al.* (2012) refieren que el porcentaje de motilidad normal en los espermatozoides posterior al descongelado va del 40 al 60% por lo que el decremento observado no compromete su calidad. Por otra parte, el extracto antioxidante de nopal incrementó significativamente el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva post descongelado con respecto al grupo control. Lo anterior de manera similar a lo observado por Olvera-Bermúdez *et al.* (2019), quienes encontraron que la adición de 0.5% de extracto antioxidante de nopal al medio de extensión durante el proceso de criopreservación incrementó 5 puntos porcentuales la motilidad progresiva después del enfriamiento y la congelación de espermatozoides de carnero. Esto es importante debido a que la motilidad progresiva es uno de los indicadores más utilizados durante la evaluación de los espermatozoides posterior al descongelado, ya que describe el estado energético de la célula basado en su movimiento, esta característica puede proporcionar una predicción bastante precisa de la calidad de los espermatozoides (Carvajal-Serna *et al.*, 2018). Además, la evaluación de la capacidad fertilizante puede inferirse de acuerdo al movimiento progresivo que siguen los

espermatozoides, ya que estos presentan una trayectoria lineal y se mueven rápidamente lo cual incrementa las posibilidades de migrar a través del tracto genital y que se lleve a cabo el proceso de interacción óvulo-espermatozoide (Elia *et al.*, 2010; Brinsko *et al.*, 2011).

A su vez, durante los últimos años se ha hecho particular énfasis en variables de cinética espermática como la velocidad curvilínea (VCL), la velocidad media del trayecto (VAP) y velocidad en línea recta (VSL) las cuales se han relacionado con el transporte de los espermatozoides a lo largo del tracto genital de la hembra, de ahí la importancia de su evaluación. Se ha observado que los espermatozoides de machos ovinos de alta fertilidad mostraron mayores VCL y VSL en comparación con machos de baja fertilidad (Vicente-Fiel *et al.*, 2014). Aunado a esto, se ha mencionado que muestras con valores altos de VCL, VAP y VSL presentan una mejor migración en el moco cervical de la hembra, sin embargo, la manera en que se relacionan estos valores con la fertilidad aún no es lo suficientemente clara (Verstegen *et al.*, 2002; Robayo *et al.*, 2008).

Existen pocas investigaciones referentes a lo que significa de manera práctica el índice de linealidad (LIN), estudios realizados por Cox *et al.* (2006) reportan que espermatozoides caprinos con velocidad eficiente en la migración del moco cervical *in vitro* presentan valores de linealidad >50%, el incremento obtenido al adicionar extracto de nopal se encuentra cercano a este indicador, por lo que se supone proporciona un efecto benéfico durante el paso de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra. Además, estudios realizados por Perumal *et al.*, (2014) encontraron una correlación negativa muy significativa entre la rectitud (STR) y la oscilación (WOB), esto quiere decir que a manera que la rectitud incrementa la oscilación disminuirá.

Los valores obtenidos para la VCL en el total de espermatozoides motiles cuando se adicionó extracto de nopal se observan similares a lo reportado por Van der Host *et al.* (2018) para valores de semen fresco. Esta variable ha sido estrechamente relacionada como predictor de la fertilidad, ovinos con índices altos

de fertilidad han presentado valores de la velocidad curvilínea altos (González-Arto *et al.*, 2016). Los valores de las variables VSL, VAP, LIN y STR estimados en el total de espermatozoides motiles en el grupo al que fue adicionado extracto de nopal presentaron valores similares o aun por encima a lo observado por Arando *et al.* (2019) y Mafolo *et al.* (2020) para espermatozoides criopreservados, mientras que para el valor de WOB, se observan un valor por debajo de lo señalado por Mafolo *et al.* (2020), que representa un movimiento más rectilíneo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de la cinética de espermatozoides con movimiento progresivo se observa que la adición de extracto de nopal incrementa considerablemente la VSL, VAP, LIN y STR, mientras que se observa un decremento en WOB, la valoración de estas variables aún es demasiado ambigua aunque supone cierta similitud a lo estimado para el total de espermatozoides motiles, la medición de estas variables en espermatozoides progresivos no se ha incluido en las evaluaciones como un protocolo común. Sin embargo, se presume que estos valores pueden ayudarnos a predecir en cierta medida la capacidad fertilizante, es necesario realizar investigaciones que nos arrojen información que permita identificar como afecta esta y otras características los valores estimados para este segmento de células espermáticas motiles.

Por último, en relación con la evaluación de la integridad de membrana, Vargas-Menéndez *et al.* (2019) observaron un incremento en el porcentaje de espermatozoides con membranas íntegras (H+) al agregar como aditivo plasma seminal de toro en el procesamiento de semen de carnero y Olvera-Bermúdez *et al.* (2019) una tendencia a mejorar esta variable al adicionar extracto antioxidante de nopal. En el presente experimento no se encontraron estos efectos, aspecto que es difícil de explicar, pero que en el caso de la adición de plasma seminal pudiera estar relacionado con el tiempo de almacenamiento en congelación del mismo como ya se mencionó anteriormente. Asimismo, no se observó un efecto sobre la integridad funcional de la membrana al adicionar de forma conjunta plasma seminal y extracto antioxidante de nopal.

## VIII. CONCLUSIONES

La utilización de plasma seminal como aditivo en la congelación de espermatozoides ovinos no provee ningún efecto positivo sobre las variables de motilidad e integridad de membrana posterior a la descongelación.

El uso de extracto acetónico de nopal como aditivo en la congelación de espermatozoides ovinos provee un incremento considerable en el porcentaje y la cantidad de espermatozoides con movimiento progresivo, además en el total de espermatozoides motiles incrementa variables de cinética como el índice de linealidad (LIN), índice de rectitud (STR), mientras que en espermatozoides con motilidad progresiva incrementa la velocidad media del trayecto (VAP), la velocidad en línea recta (VSL), el índice de linealidad (LIN) y el índice de rectitud (STR) y provee una disminución de la oscilación (WOB); factores que incrementan las posibilidades de las células espermáticas de migrar a través del tracto genital de la hembra y facilitan que se lleve a cabo el proceso de interacción óvulo-espermatozoide.

La combinación de ambos aditivos plasma seminal y extracto antioxidante de nopal no provee ningún efecto benéfico sobre la calidad biológica de las células espermáticas de carnero posterior al descongelado.

La adición de extracto antioxidante de nopal durante la criopreservación de espermatozoides ovinos provee un incremento potencial de la calidad biológica post-descongelado de las células espermáticas.

## IX. LITERATURA CITADA

- Agarwal A., Gupta S., & Sharma R. (2016). Eosin-nigrosin staining procedure. In: *Andrological evaluation of male infertility*. Springer.
- Aguirre, F. V., Vázquez, R. R., & Orihuela, T. A. (2005). Training of rams for semen collection by artificial vagina, using as stimulus inanimate objects. *Vet. Mex.*, 36(1).
- Aisen, E., Quintana, M., Medina, V., Morello, H., & Venturino, A. (2005). Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, 50(3), 239–249.
- Aitken, R. J. (2007). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol. Reprod. Dev.*, 84, 1039–1052.
- Akers, R. M., & Denbow, D. M. (2008). *Anatomy and physiology of domestic animals*. Wiley-Blackwell.
- AL-Helal, A. M. A., & Hobi, A. A. A. (2018). Effect of alcoholic extract of *Opuntia Ficus Indica* on semen quality in post-thawed of Awassi rams. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 9(5), 844-850.
- Allai, L., Druart, X., Öztürk, M., Ben-Moula, A., Nasser, B., & El-Amiri, B. (2016). Protective effects of *Opuntia ficus-indica* extract on ram sperm quality, lipid peroxidation and DNA fragmentation during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.*, 175, 1–9.
- Álvarez-Rodríguez, M., & Martínez-Pastor, F. (2021). Molecular determinants of seminal plasma on sperm biology and fertility. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(7), 3555.
- Amann, R. P., & Waberski, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, 81(1), 5–17.

- Amidi, F., Pazhohan, A., Shabani Nashtaei, M., Khodarahmian, M., & Nekoonam, S. (2016). The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank.*, 17(4), 745–756.
- Arando, A., Delgado, J. V., Fernández-Prior, A., León, J. M., Bermúdez-Oria, A., Nogales, S., & Pérez-Marín, C. C. (2019). Effect of different olive oil-derived antioxidants (hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylglycol) on the quality of frozen-thawed ram sperm. *Cryobiology*, 86, 33–39.
- Arellano, T., Cruz, F., Pro, A., Salazar, J., & Gallegos, J. (2017). Factores ambientales que afectan la calidad seminal del carnero. *Agro Product.*, 10(2), 53-59.
- Ashrafi, I., Kohram, H., Najian, H., Bahreini, M., & Mirzakhani, H. (2011). Effect of controlled and uncontrolled cooling rate on motility parameters of cryopreserved ram spermatozoa. *BMC Res. Notes*, 4, 547.
- Assumpção, T., Júnior, R., Valle de Sousa, M., & Ricart, C. (2005). Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore bulls. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 57.
- Azawi, O. I., & Hussein, E. K. (2013). Effect of vitamins C or E supplementation to Tris diluent on the semen quality of Awassi rams preserved at 5 °C. *Veterinary research forum*, 4(3), 157–160.
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci.*, 107(3–4), 257-267.
- Bansal, A. K., & Bilaspuri, G. S. (2010). Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet. Med. Int.*, 1-7.
- Baran, A., Ak, K., IK, I., & MK, S. (2004). Effects of adding bull seminal plasma to ram semen extenders on post-thaw spermatozoa motility and morphology. *Indian Vet. J.*, 81, 780-783.

- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.*, 10(1), 49–62.
- Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (2000). Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.*, 63(5), 1531–1537.
- Bedford, J. M. (2015). The functions—or not—of seminal plasma? *Biol. Reprod.*, 92(1), 1–3.
- Bergeron, A., & Manjunath, P. (2006). New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol. Reprod. Dev.*, 73(10), 1338–1344.
- Bernardini, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Fornés, M. W., Alberio, R. H. & Cesari, A. (2011). Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology*, 76(3), 436–447.
- Bhatnagar, B. S., Bogner, R. H., & Pikal, M. J. (2007). Protein stability during freezing: separation of stresses and mechanisms of protein stabilization. *Pharm. Dev. Technol.*, 12(5), 505-23.
- Bittencourt, R., Oba, E., Filho, A., Chalhoub, M., Azevedo, H., & Bicudo, S., (2013). Advances in cryopreservation of ram semen I: extenders and cryoprotectans. *Ciênc. Anim. Bras.*, 14, 522-536.
- Boretto, J. M., Gibbons, A., Bunge, M. M., Cueto, M. I., & Bidinost, F. (2002). Calidad seminal post descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos. *Rev. Med. Vet.*, 83,185-188.
- Brinsko, S. P., Blanchard, T. L., Varner D. D., Charles J. S., Hinrichs, K., & Hartman, D. L. (2011). *Examination of the stallion for breeding soundness. Manual of equine reproduction (Third edition)*. Mosby.

- Bucak, M., Atessahin, A., & Yüce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Ruminant. Res.*, 75, 128-134.
- Cabrera, P., Ayulo, A., & Pantoja, C. (2011). Effect of tris and citrate - quail egg yolk extenders on viability of ovine frozen semen in straws. *Rev. Invest. Vet. Perú*, 22(2), 105-113.
- Cabrera, V. P., & Pantoja, A. C. (2008). Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. *Rev. Invest. Vet. Perú*, 19(2), 152-159.
- Calvo-Arriaga, A. O., Hernandez-Montes, A., Peña-Valdivia, C. B., Corrales-García, J., & Aguirre-Mandujano, E. (2010). Preference mapping and rheological properties of four nopal (*Opuntia spp.*) cultivars. *J. Prof Assoc. Cactus Dev.*, 12, 127-142.
- Campanholi, S. P., Monteiro, F. M., Ribeiro Dias, E. A., Mercadante, M. E. Z., De Paz, C. C. P., Dell'Aqua-Junior, J. A., & Garcia, J. M. (2017). Effect of seminal plasma removal before cryopreservation of bovine semen obtained by electroejaculation on semen quality and in vitro fertility. *Theriogenology*, 89, 114–121.
- Cardozo, J. A., Grasa, P., Muriño, M. T. & Cebrián, J. A. (2009). Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Cienc. Tecnol. Agropecuaria*, 10(1), 51-59.
- Carvajal-Serna, M., Cortés-López, H. A., Manriquez-Perdomo, C., & Grajales-Lombana, H. A. (2018). Evaluación de los parámetros de calidad seminal y cinemática espermática en tres razas ovinas de lana en condiciones de trópico alto colombiano. *Rev. Med. Vet.*, 36, 49-61.



- Castelán, J. (2007). Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos: Razas. Organismo de la Unidad Nacional de Ovinocultores. México. Obtenido de: [http://www.uno.org.mx/razas\\_ovinas/catalogo\\_razas.pdf](http://www.uno.org.mx/razas_ovinas/catalogo_razas.pdf). Consultado [27/08/19].
- Catena, M., & Cabodevila J. (1999). Evaluación de semen bovino congelado. Trabajo presentado en el Simposio Internacional de Reproducción Bovina (UNCPBA). *Taurus*, 1(3),18-31.
- Chaalal, M., Touati, N., & Louaileche, H., (2012). Extraction of phenolic compounds and in vitro antioxidant capacity of prickly pear sedes. *Act. Bot. Gall.*, 159(4), 467-475.
- Chaudhari, A. R., Das, P., & Singh, R. (2008). Study of oxidative stress and reduced glutathione levels in seminal plasma of human subjects with different fertility potential. *Biomed. Res.*, 19(3).
- Check, M. L., Check, J. H., & Long, R. (1991). Detrimental effects of cryopreservation on the structural and functional integrity of the sperm membrane. *Arch. Androl.*, 27(3), 155–160.
- Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). The biology of spermatogenesis: the past, present and future. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. B, Biol. Sci.*, 365(1546), 1459–1463.
- Chenoweth, P. J., & Lorton, S. P. (2014). *Animal andrology: Theories and applications*. CABI.
- Colby, L. (2015). *World sheep meat market to 2025*. AHDB Beef & Lamb and International Meat.
- Cox, J. F., Alfaro, V., Montenegro, V., & Rodríguez-Martínez, H. (2006). Computer assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, 66, 860-867.

- Creasy, D. M., & Chapin, R. E. (2013). Male reproductive system. *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology (Third edition)*. Academic Press.
- Curry, M. R., & Watson, P. F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 31(1), 39–46.
- D'Alessandro, A. G., Martemucci, G., Colonna, M. A., & Bellitti, A. (2001). Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology*, 55(5), 1159-1170,
- Dhaouadi, K., Raboudi, F., Funez-Gomez, L., Pamies, D., Estevan, C., Hamdaoui, M., & Fattouch, S. (2012). Polyphenolic extract of barbary-fig (*Opuntia ficus-indica*) Syrup: RP–HPLC–ESI–MS analysis and determination of antioxidant, antimicrobial and cancer-cells cytotoxic potentials. *Food Anal. Methods*, 6, 45-53.
- Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadalini, M., & Borini, A. (2012). Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Adv. Urol.*, 2012, 854837.
- Díaz, R., Torres, M. A., Bravo, S., Sanchez, R., & Sepúlveda, N. (2016), Determination of fatty acid profile in ram spermatozoa and seminal plasma. *Andrology*, 48, 723-726.
- Douglas-Hamilton, D., Smith, N., Kuster, C., Vermeiden, J., & Althouse, G. (2005). Capillary-loaded particle fluid dynamics: Effect on estimation of sperm concentration. *J. Androl.*, 26, 115-22.
- Druart, X., & de Graaf, S. (2018). Seminal plasma proteomes and sperm fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 194, 33–40.
- Dupesh, S., Rasappan, P., Shila, S., & Gunasekaran, K. (2018). Human sperm freezing: Mini update. *Adv. Reprod. Sci.*, 6, 59-69.

- Dutta, S., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2019). Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab. J. Urol.*, 17(2), 87–97.
- Eckel, B. A., Guo, R., & Reinhardt, K. (2017). More pitfalls with sperm viability staining and a viability-based stress test to characterize sperm quality. *Front. Ecol. Evol.*, 5, 165.
- Elia, J., Imbrogno, N., Delfino, M., Mazzilli, R., Rossi, T., & Mazzilli, F. (2010). The importance of the sperm motility classes - Future directions. *The Open Andrology Journal*, 2, 42-43.
- Escudero, C., Navarro-Serna, S., & Gadea, J. (2019). Factors affecting the sperm concentration assessment in commercial seminal doses in pigs. *Anim. Reprod.*, 16 (3), 709.
- Ezzati, M., Shanehbandi, D., Hamdi, K., Rahbar, S., & Pashaiasl, M. (2020). Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. *Cell Tissue Bank.*, 21(1), 1–15.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019a). Overview of global meat market developments in 2018. Meat Market Review.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020a). Overview of global meat market developments in 2019. Meat Market Review.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2019b). Perspectivas alimentarias. Resúmenes de mercado *División de Comercio y Mercados*. Obtenido de: <http://www.fao.org/3/CA5040ES/CA5040ES.pdf> Consultado [18/02/20].
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2020b). Resúmenes de mercado. Obtenido de: <http://www.fao.org/3/cb0606es/cb0606es.pdf>. Consultado [02/07/21].

- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). Food Outlook: Biannual report on global food markets. Rome. Obtenido de: <https://doi.org/10.4060/cb4479en>. Consultado [02/07/21].
- Fernández, A., Gonzalvo M., Clavero, A., Ruiz de Assín, R., Zamora, S., Roldan, M., Rabelo, B., Ramírez, J., Yoldi, A., & Castilla, J. (2009). Fundamentos de criobiología espermática para bancos de semen. *ASEBIR*, 14 (1), 17-25.
- Fiser, P. S., & Fairfull, R. W. (1983). Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 20(6), 684–689.
- Frandsen, R. D., Wilke, W. L., & Fails, A. D. (2009). *Anatomy and physiology of farm animals*. Wiley-Blackwell.
- García, A. G. (2018). Manual de prácticas de colección y procesamiento de semen de carnero. UAQ.
- García, W., Tabarez, A., & Palomo, M. J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on ram sperm cryopreservation. *Animal Reproduction*, 14(4), 1124-1132.
- Gomes, F. P., Park, R., & Viana, A. G. (2020). Protein signatures of seminal plasma from bulls with contrasting frozen-thawed sperm viability. *Sci. Rep.*, 10, 14661.
- González-Arto, M., Hamilton, T. R., Gallego, M., Gaspar-Torrubia, E., Aguilar, D., Serrano-Blesa, E., Abecia, J. A., Pérez-Pé, R., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A., & Casao, A. (2016). Evidence of melatonin synthesis in the ram reproductive tract. *Andrology*, 4(1), 163
- Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The commitment to meiosis. *Physiol. Rev.*, 96(1), 1-17.

- Gunay, U., Dogan, I., Nur, Z., Manolov, I., Sagirkaya, H., Soylu, M.K., Kaptan, C., & Akpınar, L. (2006). Influence of bull seminal plasma on post-thaw ram semen parameters and fertility. *B. Vet. I. Pulawy*, 50, 503-507.
- Hafez, B., & Hafez, E. S. E. (2000). *Reproduction in farm animals*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hammadeh, M. E., & Hamad, M. F. (2009). Reactive oxygen species and antioxidant in seminal plasma and their impact on male fertility. *Int. J. Fertil. Steril.*, 3(3).
- Held, P. (2015). An introduction to reactive oxygen species. *BioTek White Paper*.
- Hernández, P. J. E., Fernández, R. F., Rodríguez, S. J. L., Juárez, R. E., Soto, M. Y. G., & García, R. A. D. (2012). Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. *Rev. Salud Anim.*, 34(2), 78-83.
- Hernández-Corredor, L., Quintero-Moreno, A., Rubio-Parada, J., Silva-Torres, A., & Rojas-López, M. (2017). Evaluación de la calidad espermática mediante citometría de flujo en semen caprino criopreservado con dos diluyentes. *Rev. Cient. Fac. Cien. V.*, 27(1), 35-43.
- Holt, W. V., Morris, G. J., Coulson, G. & North, R. D. (1988). Direct observation of cold-shock effects in ram spermatozoa with the use of a programmable cryomicroscope. *J. Exp. Zool.*, 246(3), 305–314.
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M. & Betteridge, K. (2010). *Essentials of domestic animal embryology*. Saunders.
- Izquierdo, A., Iglesias, A., Guerra, J., Huerta, R., & Sánchez, R. (2020). El estrés oxidativo en la fertilidad y desempeño reproductivo de mamíferos hembras y machos. *Rev. Vet.*, 31, 97.
- Jäkel, H., Henning, H., Luther, A. M., Rohn, K., & Waberski, D. (2021). Assessment of chilling injury in hypothermic stored boar spermatozoa by multicolor flow cytometry. *Cytometry*, 1–9.

- Jeyendran, R. S., Van der Ven, H. H., Perez-Pelaez, M., Crabo, B. G., & Zaneveld, L. J. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil. (Online)*, 70(1), 219–228.
- Jobim, M. I. M., Oberst, E. R., Salbego, C. G., Souza, D. O., Wald, V. B., Tramontina, F., & Mattos, R. C. (2004). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, 61, 255-266.
- Johnson, M. H., & Johnson, M. H. (2013). *Essential reproduction*. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons.
- Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2012). Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *J. Androl.*, 33(4), 536–551.
- Keskin, N., Erdogan, C., Bucak, M. N., Ozturk, A. E., Bodu, M., Ili, P., Baspinar, N., & Dursun, S. (2020). Cryopreservation effects on ram sperm ultrastructure. *Biopreserv. Biobank.*, 18(5), 441–448.
- Kimberling, C. V., & Parsons, G. A. (2007). Breeding soundness evaluation and surgical sterilization of the ram. En: *Current therapy in large animal theriogenology*. Saunders Elsevier.
- Leahy, T., & de Graaf, S. (2012), Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reprod. Domest. Anim.*, 47, 207-213.
- Leahy, T., Rickard, J. P., Bernecic, N. C., Druart, X., & de Graaf, S. P. (2019). Ram seminal plasma and its functional proteomic assessment. *Reproduction (Cambridge, England)*, 157(6), 243–256.
- Ledesma, A., Fernández-Alegre, E., Cano, A., Hozbor, F., Martínez-Pastor, F., & Cesari, A. (2016). Seminal plasma proteins interacting with sperm surface revert capacitation indicators in frozen-thawed ram sperm. *Anim. Reprod. Sci.*, 173.

- Ledesma, A., Manes, J., Ríos, G., Aller, J., Cesari, A., Alberio, R., & Hozbor, F. (2015). Effect of seminal plasma on post-thaw quality and functionality of corriedale ram sperm obtained by electroejaculation and artificial vagina. *Reprod. Dom. Anim. = Zuchthygiene*, 50(3), 386–392.
- Lee, E. H., Kim, H. J., Song, Y. S., Jin, C., Lee, K. T., Cho, J., & Lee, Y. S. (2003). Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Arch. Pharm. Res.*, 26(12), 1018–1023.
- Len, J. S., Koh, W. & Tan, S. X. (2019). The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci. Rep.*, 39(8).
- Liu, W. & Ott, T. (2018). Sheep overview. *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier.
- Liu, X., Xu, Y., Liu, F., Pan, Y., Miao, L., Zhu, Q. & Tan, S. (2021). The feasibility of antioxidants avoiding oxidative damages from reactive oxygen species in cryopreservation. *Front. Chem.*, 9, 648684.
- López-Pérez, A., & Pérez-Clariget, R. (2012). Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5 °C for 24 hours. *Theriogenology*, 77(2), 395–399.
- Love, C. C., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Thompson, J. A., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2005). Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, 63(6), 1584–1591.
- Luño V., & Matas, C. (2012). Cambios en el espermatozoide desde la eyaculación hasta la fecundación. *CYSP*, 42, 38-49.
- Macaldowie, C. (2016). *Sheep: Health management*. Reference module in food science. Elsevier.
- Mafolo, K. S., Pilane, C. M., Chitura, T., & Nedambale, T. L. (2020). Use of phosphatidylcholine in Tris-based extender with or without egg yolk to freeze Bapedi ram semen. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 50(3), 389-396.

- Manjunath, P., Bergeron, A., Lefebvre, J., & Fan, J. (2007). Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. *SRF, Supl. 65*, 217-28.
- Maroto-Morales, A., Ramon, M., Garcia-Alvarez, O., Soler, A., Estes, M. C., Martínez-Pastor, F., Pérez-Guzmán, M. D., & Garde, J. (2009). Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology*, *73*, 437-48.
- Martínez-Páramo, S., Martínez-Pastor, F., Martínez-Gonzalez, G., Herráez, M. P., & Cabrita, E. (2009). Antioxidant status in fresh and cryopreserved sperm from gilthead sea bream *Sparus aurata*. *CSIC*, 1-4.
- Martínez-Rodríguez, C., Álvarez, M., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel-López, L., Tizado, J. E., Anel, L., & De Paz, P. (2015). La morfología de la cabeza de los espermatozoides de carnero se asocia con su capacidad de migrar en in vitro y se correlaciona con la fertilidad. *Reprod. Fert. Develop.*, *28*, 1825-1837.
- Martins, K. R., Gheller, S. S. M., Ferreira, C. E. R., Goularte, K. L., Corcini, C. D., Mondadori, R. G., & Lucia, T. (2016). Post-thawing quality of ram spermatozoa is impaired by inclusion of boar seminal plasma in the freezing extender. *Small Rumin. Res.*, *144*, 229–233.
- Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., & Fukui, Y. (2006). Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J. Reprod. Develop.*, *52*(5), 675-683.
- Matthews, N., Bester, N., & Schwalbach, L. M. J. (2003). A comparison of ram semen collected by artificial vagina and electro ejaculation. *Anim. Sci.*, *4*, 28-30.
- Mazinani, M., & Rude, B. (2020). Population, world production and quality of sheep and goat products. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, *15*, 291-299.



- Meamar, M., Zribi, N., Cambi, M., Tamburrino, L., Marchiani, S., Filimberti, E., & Baldi, E. (2012). Sperm DNA fragmentation induced by cryopreservation: new insights and effect of a natural extract from *Opuntia ficus-indica*. *Fertil. Steril.*, 98(2), 326-333.
- Mehdipour, M., Daghigh-Kia, H. D., Najafi, A., Vaseghi-Dodaran, H., & García-Álvarez, O. (2016). Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract and pre-freezing equilibration time on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology*, 73(3), 297–303.
- Meyers, S. A. (2005). Spermatozoal response to osmotic stress. *Anim. Reprod. Sci.*, 89(1-4), 57–64.
- Mocé, E., & Graham, J. K. (2008). In vitro evaluation of sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 105(1–2), 104-118.
- Montserrat-Vallvé, J. (2017). CASA, análisis de semen automatizado: aplicabilidad y tendencias de futuro. *Ed. Cont. Lab. Clín.*, 32, 82-111.
- Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 63(9), 2372–2381
- Moore, R. W. (1985). A comparison of electro-ejaculation with the artificial vagina for ram semen collection. *New Zeal. Vet. J.*, 33(3).
- Morrier, A., Castonguay, F., & Bailey, J. (2003). Conservation of fresh ram spermatozoa at 5 °C in the presence of seminal plasma. *Can. J. Anim. Sci.*, 83, 221-227.
- Mortimer, D., & Mortimer, S. T. (2012). Computer-Aided Sperm Analysis (CASA) of sperm motility and hyperactivation. *Spermatogenesis*, 77–87.
- Mortimer, S. T., Van der Horst, G., & Mortimer, D. (2015). The future of Computer-Aided Sperm Analysis (CASA). *Asian J. Androl.*, 17, 545–553.

- Mozo, R., Galeote, A. I., Alabart, J. L., Fantova, E., & Folch, J. (2015). Evaluating the reproductive ability of breeding rams in North-Eastern Spain using clinical examination of the body and external genitalia. *BMC Vet. Res.*, 11(1).
- Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., & Cebrián-Pérez, J. (2008), Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domes. Anim.*, 43, 18-31.
- Munguía-Reyes, A., Martínez-Castillo, J. I., & Vázquez-Elorza, A. (2019). Determination of antioxidant activity and microencapsulation of active compounds of *Opuntia ficus-indica*. *Tlatemoanil*, 16, 1-18.
- Neill, J. D. (2005). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. London: Academic Press.
- Noakes, D. E., Parkinson, T. J., England, G. C. W., & Arthur, G. H. (2001). Fertility and infertility in male animals. *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics (Eighth edition)*. W.B. Saunders.
- Noakes, D., Parkinson, T., & England, G. (2009). *Veterinary reproduction & obstetrics*. Saunders Ltd.
- Ntemka, A., Tsakmakidis, I., Kiossis, E., Milovanović, A., & Boscos, C. (2018). Current status and advances in ram semen cryopreservation. *J. Hell. Vet. Med. Soc.*, 69(2), 911-924.
- Oberoi, B., Kumar, S. & Talwar, P. (2014). Study of human sperm motility post cryopreservation. *Med. J. Armed Forces India*, 70(4), 349–353.
- OCDE/FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2019). *Perspectivas Agrícolas 2019-2028*. OECD Publishing. Roma. Obtenido de: <http://www.fao.org/3/ca4076es/CA4076ES.pdf> Consultado [18/02/20].

- Olivera, M., Ruiz, Z. T., Tarrazona, A. M., & Giraldo, C. A. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.*, 19(4), 426-436.
- Ollero, M., Cebrian-Perez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (1997), Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *J. Androl.*, 18, 732-739.
- Olvera-Bermúdez O. Ferriz-Martínez, R. A., Montiel-Olguín, L. J., Jiménez-Severiano, H., Perez-Trejo, E., Gómez-Soto, J. G., & Vera-Ávila H. R. (2019). Uso de extracto acetónico de nopal (*Opuntia ficus* var. *Copena F1*) como aditivo en la congelación de semen ovino. *Rev. Acad. Cien. Pec.* 17(supl. 1), 385-387
- Orihuela, A. (2014). La conducta sexual del carnero: Revisión. *Rev. mex. de cienc. pecuarias (en línea)*, 5(1), 49-89.
- Paoli, D., Pelloni, M., Lenzi, A., & Lombardo, F. (2019). Cryopreservation of sperm: Effects on chromatin and strategies to prevent them. *Adv. Exp. Med.*, 1166, 149–167.
- Pavaneli, A., Passarelli, M., de Freitas, F. V., Ravagnani, G. M., Torres, M. A., Martins, S., Yeste, M., & de Andrade, A. (2019). Removal of seminal plasma prior to liquid storage of boar spermatozoa: A practice that can improve their fertilizing ability. *Theriogenology*, 125, 79–86
- Pegg, D. E. (2002). The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.*, 20(1), 5–13.
- Peris-Frau, P., Soler, A. J., Iniesta-Cuerda, M., Martín-Maestro, A., Sánchez-Ajofrín, I., Medina-Chávez, D. A., Fernández-Santos, M. R., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Montoro, V., & Garde, J. J. (2020). Sperm cryodamage in ruminants: Understanding the molecular changes induced by the

cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(8), 2781.

Perkins, A., & Roselli, C. E. (2007). The ram as a model for behavioral neuroendocrinology. *Horm. Behav.*, 52(1), 70–77.

Perumal, P., Srivastava, S., Ghosh, S., & Baruah, K. (2014). Computer-Assisted Sperm Analysis of freezable and nonfreezable Mithun (*Bos frontalis*) semen. *J. Anim.*, 2014, 675031, 1-6.

Plant, T., & Zeleznik, A. (2014). *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. Academic Press.

Pugh, D. G., & Baird, A. N. (2012). *Sheep and goat medicine*. W.B. Saunders.

Ramu, S., & Jeyendran, R. S. (2013). The hypo-osmotic swelling test for evaluation of sperm membrane integrity. *Spermatogenesis. Methods in molecular biology (Methods and protocols)*, 927. Humana Press.

Reece, W. O. (2009). *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. Wiley-Blackwell.

Reyes-Agüero, J. A., Rivera, J. R., & Hernández, H. (2005). Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*). *Agrociencia*, 39(4), 395-408

Robayo, I., Montenegro, V., Valdés, C., & Cox, J. F. (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus *Reprod. Domestic. Anim.*, 43, 393-399.

Robertson, S. A. (2005). Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.*, 322(1), 43–52.

Rodriguez-Martinez, H., Martinez, E. A., Calvete, J. J., Peña Vega, F. J., & Roca, J. (2021). Seminal Plasma: Relevant for fertility? *Int. J. Mol. Sci.*, 22(9), 4368.

- Ros-Santaella, J.L., & Pintus, E. (2021) Plant extracts as alternative additives for sperm preservation. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(5).
- Rubio-Guillén, J., Portillo-Guevara, O., Montero, M., Velásquez, A., Zalahne W., GonzálezVillalobos, D., Torres-Rodríguez, P., & Quintero-Moreno, A. (2013). Integridad de la membrana plasmática de espermatozoides recién colectados de ovinos en condiciones de trópico seco. *AIDA. XV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo I*, 407-409.
- Ruiz, L., Sandoval, R., & Santiani, A. (2015). Evaluación de la calidad espermática del semen ovino posdescongelación al emplear dos fuentes energéticas y dos crioprotectores. *Rev. Invest. Vet. Perú.*, 26(1), 49-56
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62(1-3), 77–111.
- Samper, J. C. (2009). Artificial insemination with fresh and cooled semen. *Equine breeding management and artificial insemination (Second edition)*. W.B. Saunders.
- Santiani, A., Sandoval, R., Ruiz, L., & Coronado, L. (2004). Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipo-osmótico. Conferencia: *XXVII Reunión Asociación Peruana de Producción Animal (APPA)*.
- Santolaria, P., Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Fantova, E., Blasco, M. E., Silvestre, M. A., & Yániz, J. L. (2015). Predictive capacity of sperm quality parameters and sperm subpopulations on field fertility after artificial insemination in sheep. *Animal Reprod. Sci.*, 163, 82–88.
- Schatten, H., & Constantinescu, G. M. (2007). *Comparative reproductive biology*. Blackwell Publishing.

- Shin, E. H., Park, S. J., & Choi, S. K. (2011). Component analysis and antioxidant activity of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. *J. East Asian Soc. Diet. Life*, 21(5), 691-697.
- Shukla, M. (2011). *Applied veterinary andrology and frozen semen technology*. New India Publishing Agency.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018a). Carne en Canal de Ovino: comparativo del avance acumulado de la producción pecuaria. México. Obtenido de: [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecCompaNal.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecCompaNal.jsp). Consultado [04/09/19].
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018b). Querétaro infografía agroalimentaria. México. Obtenido de: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Infografias-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Infografias-2018). Consultado [04/09/19].
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2018c). Atlas agroalimentario 2012-2018. Nopalito. Obtenido de: [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/AtlasAgroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/AtlasAgroalimentario-2018). Consultado [23/04/20].
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019a). Carne en canal de ovino: comparativo del avance acumulado de la producción pecuaria. México. Obtenido de: [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecAvanceProd.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp). Consultado [21/01/20].
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019b). Anuario Estadístico de la producción ganadera. México. Obtenido de: [https://nube.siap.gob.mx/cierre\\_pecuario/](https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/). Consultado [02/07/21].

- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2019c). Carne en canal de ovino. Avance por producto. México. Obtenido de: [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecAvanceProd.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp). Consultado [02/07/21].
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020a). Carne en canal de ovino. Avance por producto. México. Obtenido de: [http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance\\_siap\\_gb/pecAvanceProd.jsp](http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceProd.jsp). Consultado [02/07/21].
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2020b). Anuario estadístico de la producción ganadera. México. Obtenido de: [https://nube.siap.gob.mx/cierre\\_pecuario/](https://nube.siap.gob.mx/cierre_pecuario/). Consultado [02/07/21].
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. (2015). Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, 50, 20-26.
- Simon, L., & Lewis, S. (2011). Sperm DNA damage or progressive motility: which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 57, 133 - 138.
- Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The regulation of spermatogenesis by androgens. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 30, 2–13.
- SMN. Sistema Meteorológico Nacional. (2010). Normales climatológicas por estado. Obtenido de: <https://smn.conagua.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=qro>. Consultado [27/04/20].
- Stornelli, M. C., Tittarelli, C. M., Savignone, C., & Stornelli, M. A. (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Vet.*, 25 (2), 28-35.
- Swelum, A., Saadeldin, I., Bahadi, M., Afifi, M., Al-Mutary, M., & Al-Owaimer, A. (2018). The effect of heterologous seminal plasma from ram, buck or camel on the freezability of ram semen. *Vet. Med. Czech.*, 63.

- Szczykutowicz, J., Kałuża, A., Kaźmierowska-Niemczuk, M., & Ferens-Sieczkowska, M. (2019). The potential role of seminal plasma in the fertilization outcomes. *Biomed Res. Int.*, 1-10.
- Tabarez, A., García, W., & Palomo, M.J. (2017). Effect of the type of egg yolk, removal of seminal plasma and donor age on buck sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res.*, 149, 91-98.
- Tavilani, H., Goodarzi, M. T., Vaisi-Raygani, A., Salimi, S., & Hassanzadeh, T. (2008). Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *International Braz. J. Urol.*, 34(4), 485-491.
- Therien, I. (1995). Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.*, 52(6), 1372-1379.
- Torres-Bojórquez, A, E., García-Rubio, O. R., Miranda-López, R., & Cardador-Martínez, A. (2017). Evaluación de la capacidad antioxidante, características fisicoquímicas y perfil sensorial de *Opuntia robusta* y *O. ficus-indica*. *Arch. Latinoam. Nutr.*, 67(4), 291-299.
- Tulsiani, D. (2003). *Introduction to mammalian reproduction*. Springer US.
- Turner, R. M. (2005). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.*, 18(2), 25-38.
- Ugur, M. R., Dinh, T., Hitit, M., Kaya, A., Topper, E., Didion, B., & Memili, E. (2020). Amino acids of seminal plasma associated with freezability of bull sperm. *Front. Cell Dev. Biol.*, 7, 347.
- Ungerfeld, R. (2018). Factores ambientales y desarrollo sexual de carneros y chivos. XXVI Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. V Simposio Internacional de Producción Animal. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 26(1-2), 19-24.



- Valverde, A., & Madrigal-Valverde, M. (2018). Sistemas de análisis computadorizado de semen en la reproducción animal. *Agronomía Mesoamericana*, 29(2), 469-484.
- Van der Horst, G., Maree, L., & du Plessis, S. S. (2018). Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*, 30(6), 875–888.
- Vargas-Menéndez, X, Andrade-Montemayor H., Jiménez-Severiano, H., Montiel-Olguín, L. J., Gómez-Soto, J. G., & Vera-Ávila H. R. (2019). Evaluación del efecto de plasma seminal hetero específico (bovino a ovino) sobre la congelabilidad de semen de carnero. *Rev. Acad. Cien. Pec.*, 17(supl. 1), 358-360.
- Vázquez, I., Jaramillo, J. L., Bustamante, A., Vargas, S., Calderón, F., Torres, G., & Pittroff, W. (2018). Estructura y tipología de las unidades de producción ovinas en el centro de México. *Agríc. Soc. Desarro. (en línea)*, 15(1), 85-97.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57, 149-179
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Fantova, E., Quintín-Casorrán, F. J., Sevilla-Mur, E., & Yániz, J. L. (2014). In vitro assessment of sperm quality from rams of high and low field fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 146(1-2), 15–20.
- Villaverde, A., Netherton, J., & Baker, M. A. (2019). From past to present: The link between reactive oxygen species in sperm and male infertility. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(12), 616.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 481–492.
- White, I. G. (1993) Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fert. Develop.*, 5, 639-658.

WHO. World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (5th edition). Obtenido de: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261> Consultado [24/02/20].

Youngquist, R. S., & Threlfall, W. R. (2007). *Current therapy in large animal theriogenology*. Saunders Elsevier.

Yusoff, R., Bakar, M. Z. A., Sarsaifi, K., Bukar, M. M., Thein, M., Kyaw, T., & San, M. M. (2011). Effect of seminal plasma removal, washing solutions, and centrifugation regimes on Boer goat semen cryopreservation. *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.*, 34(2), 271-279.

Dirección General de Bibliotecas UJAO

## **X. APÉNDICE**

### **1. Evaluación de la motilidad y anomalías espermáticas por medio de un sistema de análisis de semen auxiliado por computadora (CASA)**

Las evaluaciones se realizaron mediante el sistema de análisis de semen CEROS II (IMV Technologies), de acuerdo a los procedimientos establecidos en el laboratorio de LIMPER Congelaciones Profesionales S. A. de C. V. Se realizó el análisis de 3 pajillas por cada réplica (15) en cada uno de los cuatro tratamientos. El promedio del valor de las 3 pajillas fue utilizado en la evaluación estadística.

Procedimiento:

1. Se descongeló una pajilla a la vez en baño maría a 37 °C durante 60 segundos.
2. La pajilla de 0.25 ml se diluyó en una proporción 1:4 en solución salina precalentada a 37 °C.
3. Se tomó una muestra de 2 µl de la solución lo más rápido posible tras su descongelación y se colocó con ayuda de una micropipeta en lejas para lectura.
4. Se ajustó el enfoque de la imagen y la luz.
5. Se realizó el análisis, se generaron los reportes necesarios y se evaluaron los resultados obtenidos.

### **2. Evaluación de la integridad funcional de la membrana por medio de prueba hipo-osmótica (HOST).**

Las evaluaciones se llevaron a cabo en el laboratorio de Reproducción animal de la FCN. Se evaluaron 3 pajillas por cada una de las réplicas (15) en cada uno de los cuatro tratamientos. El promedio del valor de las 3 pajillas fue utilizado en la evaluación estadística.

Se preparó la solución hipo-osmótica disolviendo 4.9 g de citrato de sodio y 9.0 g de D-fructosa en 1 L de agua bidestilada, se almacenó a temperatura ambiente y en un lugar oscuro hasta su uso.

Procedimiento:

1. Se colocaron 100  $\mu$ l de solución hipo-osmótica en un tubo Eppendorf de 1.5 ml para cada una de las muestras manteniéndolo a una temperatura de 37 °C en baño maría.
2. Posteriormente se descongelaron las pajillas a una temperatura de 37 °C durante 40 segundos.
3. El contenido de cada pajilla se transfirió a un tubo Eppendorf vacío de 1.5 ml que se mantiene en baño maría a 37 °C hasta obtener la muestra para la prueba HOST.
4. Con la ayuda de una micropipeta se colocan 50  $\mu$ l de semen en el tubo con 100  $\mu$ l de solución hipo-osmótica y se mantienen en incubación por 30 min.
5. Después de la incubación se transfiere una alícuota de 10 microlitros a un portaobjetos limpio, se cubre con un cubreobjetos de 22 mm x 22 mm y se observa al microscopio (1000x).
6. Se evaluaron 200 células por cada muestra con la ayuda de un contador, posteriormente se calculó el número de células no hinchadas (muertas) e hinchadas (vivas), una vez realizadas las evaluaciones se reportó el porcentaje de espermatozoides con integridad funcional de la membrana (H+) y se analizaron los resultados.