



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Evaluación de semen ovino post-congelación utilizando como aditivos
antioxidantes”

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:
Iván Gómez Sánchez

Dirigido por:
Dr. Guillermo De La Isla Herrera

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2014.
México.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Propuesta de intervención en capacitación
tecnológica en el sistema Vaca-Cría para el desarrollo
pecuario sustentable en el municipio de Arroyo Seco,
Querétaro

por

Iván Gómez Sánchez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNMAC-134919



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Evaluación de semen ovino post-congelación utilizando como aditivos antioxidantes”

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:

Iván Gómez Sánchez

Dirigido por:

Dr. Guillermo De La Isla Herrera

Sinodales:

Dr. Guillermo De La Isla Herrera
Presidente

Firma

MVZ. MPA Yesmín Domínguez Hernández
Secretario

Firma

Dr. Juan Augusto Hernández Rivera
Vocal

Firma

Dra. Tércia Cesaria Reis de Souza
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Septiembre 2014.
México.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto en la motilidad individual al adicionar antioxidantes como las vitaminas C y E en el semen de morueco para su criopreservación y observar su efecto en la motilidad al descongelarlo. Se utilizaron nueve carneros de las razas Katahdin, Suffolk y Dorset y se analizaron tres eyaculados de cada semental. Cada eyaculado fue dividido en cuatro grupos: control, con vitamina C, con vitamina E y combinación de C+E. La determinación de la motilidad espermática al descongelar se realizó por medio del Test de Endosmosis (HOST). Los resultados mostraron diferencia estadísticamente en el semen después de descongelar ($P < 0.05$), lo cual indica que con la adición de antioxidantes la motilidad individual registró variaciones, aumentando la mortalidad en los espermatozoides con los tratamientos con vitamina C y la combinación de vitamina C+E, se estimó que la combinación de antioxidantes con vitamina E no redujo la mortalidad espermática. Se concluye que la adición de antioxidantes al diluyente, puede reducir el estrés oxidativo causado por la congelación y descongelación de los espermatozoides; sin embargo, no es de manera significativa y solo se observó con la vitamina E.

Palabras clave: Antioxidantes, criopreservación, semen, peroxidación lipídica, carnero.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of motility when adding antioxidants such as vitamins C and E in ram semen for cryopreservation and observe their effect on motility upon thawing. Nine of Katahdin, Dorset and Suffolk breeds were used and three ejaculates from each one were analyzed. Each ejaculate was divided into four groups: control, vitamin C, vitamin E and combination of C+E. Determining the thaw sperm motility was performed through hypoosmotic swelling test (HOST). The results showed statistically difference in semen after thawing ($P < 0.05$), indicating that the addition of antioxidants variations registered individual motility, increasing mortality sperm treatments with vitamin C and combination of vitamin C + E, it was estimated that the combination of antioxidants vitamin E did not reduce sperm mortality. It is concluded that the addition of antioxidants to the extender, can reduce oxidative stress caused by freezing and thawing of sperm; however, is not significantly and was observed only with vitamin E.

Key Words: Antioxidants, cryopreservation, semen, lipid peroxidation, ram.

DEDICATORIAS

Doy gracias a Dios por darme la vida y la oportunidad de realizar mis metas en compañía de mis seres queridos, amigos, compañeros, profesores y demás personas que me apoyaron y me acompañaron durante este periodo.

A mis padres por su apoyo incondicional durante toda mi vida, por su paciencia, sacrificio, consejos y llamadas de atención que han hecho que sea cada día mejor persona y me han ayudado en todo momento para que pueda cumplir esta meta.

A mis hermanos Daniel, Toño y Omar que siempre han estado ahí cuando los he necesitado y me han permitido vivir con ellos momentos muy amenos.

A mi familia por sus consejos, apoyo, ánimo y confianza

A Raquel que durante toda esta experiencia me ha acompañado durante los buenos y malos momentos y ha estado siempre para ayudarme, así mismo agradezco a tu familia que me ha permitido entrar en su hogar y tratarme de la mejor manera.

A mis amigos y compañeros de carrera, a mis amigos y compañeros de trabajo, por su comprensión y apoyo, pero sobre todo por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yes por todas sus enseñanzas, por su ánimo, confianza, apoyo y sobre todo por compartir todas sus experiencias y su buen sentido del humor.

Al Dr. de la Isla por su apoyo incondicional durante mi desarrollo académico profesional.

Al Dr. Juan Augusto por su apoyo durante la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a todos los Profesores de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, por el apoyo académico brindado para mi desarrollo profesional

A los trabajadores y maestros del CEIEPAA por su apoyo y sobre todo su amistad, así mismo por facilitarme el uso de las instalaciones para la realización de este trabajo.

A mis compañeros del área de ovinos, Davinia (men), Karina y Ana que me apoyaron en la parte experimental del trabajo.

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| I. RESUMEN | |
| II. ABSTRACT | |
| III. INTRODUCCIÓN | |
| 1. REVISIÓN DE LITERATURA | 1 |
| 1.1 HISTORIA DE LOS OVINOS | 1 |
| 1.1.1 Origen de los ovinos | 1 |
| 1.2 EXAMEN ANDROLOGICO | 2 |
| 1.2.1 Evaluación general andrológica de sementales | 3 |
| <i>1.2.1.1 Salud física y escala de condición corporal</i> | <i>3</i> |
| <i>1.2.1.2 Escala de condición corporal</i> | <i>3</i> |
| <i>1.2.1.3 Regulación de temperatura</i> | <i>4</i> |
| <i>1.2.1.4 Aproximación al examen</i> | <i>4</i> |
| <i>1.2.1.5. Examen genital</i> | <i>5</i> |
| 1.3 EL SEMEN Y SUS CARACTERÍSTICAS | 6 |
| <i>1.3.1 Plasma seminal</i> | <i>6</i> |
| <i>1.3.2 Espermatozoides</i> | <i>6</i> |
| <i>1.3.3 Estructura de los espermatozoides</i> | <i>7</i> |

| | |
|--|----|
| 1.3.4 <i>Motilidad de los espermatozoides:</i> | 7 |
| 1.3.5 <i>Metabolismo de los espermatozoides</i> | 7 |
| 1.3.6 <i>Factores que afectan la motilidad de los espermatozoides</i> | 7 |
| 1.4 OBTENCIÓN DEL EYACULADO | 9 |
| 1.5 MANEJO Y EVALUACIÓN DEL SEMEN | 9 |
| 1.5.1 Examen macroscópico | 10 |
| 1.5.1.1 <i>Color, olor y consistencia</i> | 10 |
| 1.5.1.2 <i>Volumen</i> | 11 |
| 1.5.1.3 <i>Movimiento en masa macroscópica</i> | 11 |
| 1.5.2 Examen microscópico | 11 |
| 1.5.2.1 <i>Concentración</i> | 11 |
| 1.5.2.2 <i>Motilidad en masa microscópica</i> | 12 |
| 1.5.2.3 <i>Motilidad individual</i> | 13 |
| 1.5.2.4 <i>pH seminal</i> | 14 |
| 1.5.2.5 <i>Test de endósmosis (HOST)</i> | 15 |
| 1.6 CONSERVACIÓN DEL SEMEN | 15 |
| 1.6.1 <i>Características de los diluyentes, tipos de diluyentes y aditivos</i> | 15 |
| 1.7 DILUCIÓN DEL SEMEN | 16 |
| 1.7.1 <i>Grado de dilución</i> | 17 |
| 1.7.2 <i>Volumen de inseminación</i> | 17 |
| 1.7.3 <i>Número de espermatozoides en el inseminado</i> | 17 |

| | |
|---|----|
| 1.8 CONSERVACIÓN DEL SEMEN CONGELADO | 17 |
| 1.8.1 <i>Crioprotectores</i> | 17 |
| 1.8.2 <i>Crioprotectores no penetrantes</i> | 17 |
| 1.8.3 <i>Crioprotectores penetrantes</i> | 18 |
| 1.8.4 <i>Criopreservación</i> | 18 |
| 1.8.5 Congelación del semen en pajillas | 19 |
| 1.8.5.1 <i>Fraccionamiento del semen en pajillas</i> | 19 |
| 1.8.5.2 <i>Congelamiento en vapores de nitrógeno líquido</i> | 19 |
| | |
| 1.9 DESCONGELACIÓN DEL SEMEN | 20 |
| | |
| 1.10 OXIDACIÓN | 21 |
| 1.10.1 <i>Radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS)</i> | 21 |
| 1.10.2 <i>Antioxidantes</i> | 22 |
| 1.10.3 <i>Vitamina C</i> | 22 |
| 1.10.4 <i>Vitamina E</i> | 23 |
| | |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Objetivo general | 24 |
| 2.2 Objetivos específicos | 24 |
| | |
| 3. HIPÓTESIS | 24 |
| | |
| 4. METODOLOGÍA | 25 |
| 4.1 Localización | 25 |

| | |
|--|----|
| 4.2 Población y Muestras | 25 |
| 4.3 Tratamientos | 25 |
| 4.4 Variables | 25 |
| 4.5 Análisis Estadístico | 26 |
| 4.6 Material | |
| 4.6.1 <i>Material empleado para la colecta de semen</i> | 26 |
| 4.6.2 <i>Material empleado para la conservación de semen</i> | 26 |
| 4.6.3 <i>Material de Laboratorio</i> | 26 |
| 4.6.4 <i>Material Químico</i> | 26 |
| 4.7 Métodos y procedimientos | 26 |
| | |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| | |
| 6. CONCLUSIONES | 40 |
| | |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 41 |

| ÍNDICE DE CUADROS | Página |
|--|---------------|
| 1. Clasificación taxonómica de los ovinos. | 1 |
| 2. Factores que interfieren con la producción de espermatozoides. | 2 |
| 3. Valoración visual de la escala para la concentración espermática. | 10 |
| 4. Fórmula para calcular la cantidad espermática por ml. | 12 |
| 5. Puntuación de la actividad de los espermatozoides. | 13 |
| 6. Determinación de la puntuación del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides. | 14 |
| 7. Promedio evaluación de semen pre-congelación todos los machos. | 33 |
| 8. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen con los tratamientos post-congelación machos Katahdin. | 34 |
| 9. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos machos Katahdin. | 34 |
| 10. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen post-congelación machos Suffolk. | 35 |
| 11. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos machos Suffolk. | 35 |
| 12. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen post-congelación machos Dorset. | 36 |
| 13. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos machos Dorset. | 36 |
| 14. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen post-congelación todos los machos. | 37 |
| 15. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos de todos los machos. | 37 |
| 16. pH de los tratamientos. | 38 |
| 17. Coeficiente de correlación entre la motilidad individual con los tratamientos y con Host. | 38 |

| ÍNDICE DE FIGURAS | Página |
|--|---------------|
| Imagen 1: Puntuación de la condición corporal. | 4 |
| Imagen 2: Carnero sentado para revisión genital. | 5 |
| Imagen 3: Evaluación individual de los reproductores. | 27 |
| Imagen 4: Evaluación en grupo de los reproductores. | 27 |
| Imagen 5: Vagina artificial armada. | 28 |
| Imagen 6: Obtención de semen con vagina artificial y un animal señuelo. | 28 |
| Imagen 7: Evaluación microscópica del semen. | 29 |
| Imagen 8: Refrigeración de las muestras. | 29 |
| Imagen 9: Elaboración de pajillas. | 30 |
| Imagen 10 y 11: Congelación de las pajillas. | 30 |
| Imagen 12 y 13: Descongelación de semen. | 31 |
| Imagen 14: Modificaciones en los espermatozoides. | 32 |

INTRODUCCIÓN

Tras cien años de una ovinocultura caracterizada por grandes poblaciones de ovinos y del predominio de la lana, hoy en los inicios del siglo XXI, los países grandes productores de la especie, enfrentan una profunda crisis que se ha llevado a una caída dramática de sus poblaciones y por ende a un replanteamiento de la actividad. La búsqueda de opciones más rentables como la carne y la leche, está promoviendo cambios en los objetivos de producción e investigación, generando y buscando animales más versátiles y eficientes ante diferentes medio ambientes (Cuéllar *et al.*, 2012).

A pesar de que la producción ovina ocupa, por su impacto económico, uno de los últimos lugares en la industria pecuaria nacional, es reconocida como una actividad importante dentro del subsector ganadero por el alto valor que representa al constituir un componente beneficioso para la economía del campesino de escasos recursos y por la gran demanda de sus productos, especialmente entre la población urbana de las grandes ciudades, como el Distrito Federal y su área conurbana del Estado de México, Guadalajara y Monterrey. Sin embargo, hoy en día la producción ovina, en especial en lo referente a la oferta, sigue dependiendo en gran medida (33%) de la importación, tanto de animales en pie como en canal, principalmente de Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y Chile (Muñoz G., 2005).

En su gran mayoría, los rebaños ovinos mexicanos tienen índices de producción deficientes y los productores tienen poco interés en constituir una empresa económica redituable. La orientación de la ovinocultura mexicana es primordialmente hacia la producción de carne, ya que en este aspecto el productor obtiene altos precios en pie y en canal, en comparación con otras especies pecuarias (Cuéllar *et al.*, 2012).

La problemática de la producción de ovinos de manera rentable en México, depende de varios factores. Entre ellos la poca aplicación de las tecnologías por parte de los propietarios, trabajadores, médicos veterinarios y ovinocultores. Aunado a esto existe poca mano de obra y personal especializado en ovinos, tanto técnicos como profesionistas (Martínez *et al.*, 2010).

El empleo del semen congelado ovino puede producir un gran impacto en el mejoramiento genético a nivel mundial, al aumentar considerablemente el flujo de material genético de las grandes producciones a los rebaños generales, así como al facilitar el transporte de semen a nivel internacional. De esta manera, se evita el costoso traslado de los reproductores y se disminuye el riesgo sanitario (Cuento *et al.*, 1993).

Los resultados de la inseminación artificial con semen congelado resultan hasta ahora insatisfactorios en ovinos. La fertilidad obtenida con semen congelado es menor a la de semen fresco, debido principalmente a una baja viabilidad post-descongelamiento y a un trastorno subletal en la proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000). Esto se debe a los daños ocasionados en la membrana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación, donde se altera la función metabólica del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables y ocasionando una capacitación espermática prematura (Maxwell y Watson, 1996).

La membrana plasmática de los espermatozoides de mamíferos es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. Antes y después de la eyaculación, la membrana espermática sufre cambios que están asociados a la capacidad fecundante de los espermatozoides. Diversos eventos ocurren durante el proceso de fertilización: capacitación, reacción acrosomal y fusión del espermatozoide a la superficie del oocito. Todos ellos requieren de la actividad bioquímica de la membrana, y, por lo tanto, es muy importante evaluar la estructura e integridad funcional de la misma (Córdova *et al.*, 2003).

Consecuentemente, los espermatozoides sólo son viables un corto periodo de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra y, por lo tanto, tendrían una menor oportunidad de poder fecundar los ovocitos (Gillan y Maxwell, 1999).

El proceso de congelación de semen da como resultado un aumento en el número de células apoptóticas en comparación con el semen fresco. Durante la criopreservación del semen, el estrés provoca daños en la integridad de la membrana con la consecuente pérdida de la motilidad y viabilidad. Dentro de los principales factores perjudiciales durante la criopreservación figuran los ocasionados por los radicales libres que se forman en este proceso siendo los responsables del daño oxidativo (Membrillo *et al.*, 2011).

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por espermatozoides dañados tiene un impacto negativo sobre las células viables restantes, ya que representa un daño acumulativo para los espermatozoides que son almacenados. Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, ya que pueden activar al espermatozoide en la fecundación; un desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide, provocando un estrés oxidativo que se ha definido como un desequilibrio entre los agentes oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Estos últimos involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas entre las que se incluyen las vitaminas E y C, que cumplen su función antioxidante al disminuir el porcentaje de peroxidación lipídica (Castillo *et al.*, 2011).

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 HISTORIA DE LOS OVINOS

1.1.1 Origen de los ovinos

La especie ovina carece de génesis debidamente conocida. Incógnita es la época y la forma cómo surgió y no ha podido ser esclarecida hasta el presente por investigaciones paleontológicas.

Ovinos salvajes primitivos: en la subfamilia de los Caprinos, se acepta la existencia de tres géneros principales de ovinos salvajes primitivos: género *Ovis*, género *Ammotragus* y género *Pseudois*. El género *Ovis* es considerado antecesor de los ovinos domésticos actuales y el género *Pseudois* es considerado como una forma intermedia entre ovinos y caprinos.

Antecesoros de los ovinos domésticos: los posibles antecesoros de los ovinos domésticos de la época presente y de acuerdo a su origen geográfico se clasifican en; grupo Europeo, grupo Africano y grupo Asiático.

Grupo Europeo: Sus antepasados serían el *Ovis musimon* y el *Ovis ophion*. En la antigüedad estuvieron extensamente repartidos en el sudeste de Asia y Europa.

Grupo Africano: Originado por el *Ovis tragelaphus*. Comprende un género intermedio entre ovinos y caprinos, *Ammotragus*, el llamado “carnero de crin”, que vivía en las montañas del norte de África, en la región del actual desierto del Sahara.

Grupo Asiático: Es el más antiguo de los tres y de mayor importancia descendiente del *Ovis vignei*. Comprende dos subgéneros, uno de ellos es el *Ovis vignei* o “Urial” (Helman, 1975).

Taxonomía:

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de los ovinos. (Muñoz G., 2005)

| | |
|---------|---------------------|
| REINO | <i>Animal</i> |
| TIPO | <i>Cordados</i> |
| CLASE | <i>Mamífero</i> |
| ORDEN | <i>Artiodáctilo</i> |
| FAMILIA | <i>Bóvidos</i> |

| | |
|---------|-------------------|
| GENERO | <i>Ovis</i> |
| ESPECIE | <i>Ovis aries</i> |

1.2 EXAMEN ANDROLOGICO

En las unidades de producción el nivel de fertilidad dentro de un grupo de carneros puede variar de manera significativa (cuadro 2). La única garantía de la habilidad reproductiva de un carnero es el número y la calidad de su progenie producida bajo condiciones normales de reproducción. Es posible, sin embargo, examinar los diferentes aspectos de la función reproductiva de un carnero para estimar qué tan cerca está del estándar general aceptado como normal y para definir cualquier anomalía que pueda estar presente.

Cuadro 2. Factores que interfieren con la producción de espermatozoides (Aisen, 2004).

| |
|---|
| Salud |
| Cojera. Obesidad. Abscesos podales. Crecimientos interdigitales infectados. Problemas respiratorios. Ataque por mosca de los cuernos. Dermatitis escrotal. |
| Edad y conformación |
| Tanto carneros jóvenes y viejos pueden no ser confiables. Gran cobertura de lana escrotal. |
| Nutrición |
| Largos periodos de sobre o subalimentación. Cambios de alimento. |
| Manejo |
| Estacionalidad reproductiva. Confinamiento y sobrealimentación previo a la venta. Alojamiento (cantidad de machos y hembras). Largos periodos de viaje y estabulación. |

El objetivo de los programas reproductivos es mejorar las características de producción del rebaño, principalmente la cantidad y calidad de la carne, leche y/o lana. La consecución de este objetivo depende de la capacidad reproductora de los sementales y las hembras que se utilicen.

Se debe poner especial atención al seleccionar a los sementales para los programas reproductivos ya que los productores deben convencerse de que los

machos que se utilicen para estos programas reproductivos deben ser mejores que sus congéneres (Angulo *et al.*, 2003).

Aparte de los criterios genéticos existen otros factores que se deben considerar al seleccionar los machos para un programa de Inseminación Artificial (IA).

1.2.1 Evaluación general andrológica de sementales

1.2.1.1 Salud física y escala de condición corporal:

El macho seleccionado debe de carecer de cualquier enfermedad y debe ser sometido a un completo examen físico, en el que se debe incluir la toma de las constantes fisiológicas y la evaluación de los diferentes aparatos, como son el respiratorio, digestivo, locomotor y reproductor así como los diferentes sentidos, de la vista, del oído, olfato y la piel.

Una vez tomadas las constantes fisiológicas completas (temperatura corporal, frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria y movimientos ruminales), se realizará la revisión completa del animal haciendo énfasis en el aparato locomotor y en el reproductor. Considerar la condición general del animal; ni flacos ni gordos, es recomendable que un semental se encuentre en una condición corporal de 3 a 3.5 al iniciar el empadre.






Revisar al animal en movimiento y en estática, poner énfasis en las patas, principalmente en los miembros posteriores, columna vertebral y pezuñas, las cuales no deben estar largas. Revisar la cabeza: ojos, oídos y boca. Además es importante considerar la edad del macho ya que un semental no deberá trabajar antes del año de edad, para permitir que el macho alcance una talla adecuada. Así mismo un macho no deberá ser usado después de los 5 años de edad, ya que su potencial reproductivo comienza a devaluarse a partir de esta edad. Esta recomendación podrá ser omitida sólo en los casos en los que al realizar la evaluación reproductiva y de libido del semental, éste no presente problemas (Angulo *et al.*, 2003).

1.2.1.2 Escala de condición corporal:

Es un procedimiento de evaluación del estado físico de los ovinos que sirve para conocer el estado corporal de los animales, ya sea para su correcto manejo, para venta o faena. Para determinar las necesidades nutricionales de los animales y para obtener un promedio estimado que muestre el estado de un lote, se utiliza

una escala de uno a cinco puntos, que clasifica los estados corporales según el grado de desarrollo muscular y grasa (Imagen 1).

Imagen 1. Puntuación de la condición corporal (Jiménez J., 2009).

| GRADO | AREA a PALPAR | ESQUEMA | DESCRIPCION |
|-----------------------|----------------------|--|---|
| 1 MUY FLACA | Apófisis espinosas |  | Puntiagudas descarnadas, bien notables a palpación; se distingue espacio entre ellas. |
| | Apófisis transversas | | Agudas, los dedos perciben extremos o aletas afiladas, pasan con facilidad por debajo palpando cara inferior de las mismas. |
| | Músculos del lomo | | Deprimidos, sin cobertura de grasa. Se palpa piel y huesos. |
| 2 FLACA | Apófisis espinosas |  | Prominente pero suave. Dificultad en palpar las apófisis individuales. |
| | Apófisis transversas | | Suaves y redondeadas. Para palpar la cara inferior se debe ejercer ligera presión. |
| | Músculos del lomo | | Rectos, con poca cobertura de grasa subcutánea. |
| 3 NORMAL | Apófisis espinosas |  | Se perciben pequeñas elevaciones suaves y redondeadas. |
| | Apófisis transversas | | Se tocan solo ejerciendo presión, son suaves y están recubiertas. |
| | Músculos del lomo | | Llenos, de forma convexa y moderada cobertura de grasa. |
| 4 GORDA | Apófisis espinosas |  | Ejerciendo presión se detectan como línea o cordón duro entre músculos del lomo. |
| | Apófisis transversas | | Imposible palpar los extremos de las mismas. |
| | Músculos del lomo | | Presentan buena cobertura de grasa. |
| 5 MUY GORDA | Apófisis espinosas |  | Imposible palpar aunque se ejerza presión. |
| | Apófisis transversas | | Imposible palpar aunque se ejerza presión. |
| | Músculos del lomo | | Muy llenos y con abundante cobertura de grasa. |

1.2.1.3 Regulación de temperatura:

La temperatura del escroto por lo general es unos 4-5 °C menor que la temperatura rectal cuando la función espermatogénica es más eficiente. Algunas razas llevan una lana pesada cubriendo el escroto. Si los carneros están encerrados y se echan en camas profundas de paja por periodos largos la producción de esperma puede estar reducida.

1.2.1.4 Aproximación al examen:

Primero deben observarse los carneros como grupo ya que así se podrán identificar con frecuencia carneros enfermos.

Los signos de buena salud son: por lo general alerta, movimiento libre, libre de cojeras, vellón uniforme y cerrado, alimentación activa, rumia, no se observan heridas, abscesos o lesiones.

Las indicaciones de enfermedad incluyen: indiferencia, postura y comportamiento anormal, rigidez al movimiento, tos o jadeo persistente, ausencia de rumia, pérdida de condición, cojera, diarrea, pérdida de vellón en parches, frote constante y/o separación del grupo (Alder *et al.*, 2000).

1.2.1.5 Examen genital:

Para realizar un examen de los genitales es mejor sentar al carnero sobre su propia cola (Imagen 2) en un área bien iluminada. Los testículos y el área escrotal pueden ser palpados en la posición de pie, pero así no es realmente posible examinar todo el prepucio y pene.

Imagen 2. Carnero sentado para revisión genital (Angulo *et al.*, 2003).



Testículos.- Se debe poner especial atención al tamaño y forma de los testículos, estos pueden ser palpados a través del escroto. Los testículos deben ser firmes y elásticos, deben carecer de lesiones y deformaciones y moverse fácilmente dentro del saco escrotal. No debe presentar dolor en esta zona un macho sano. Los animales con defectos en esta zona, tales como el criptorquidismo unilateral o total, hipoplasia testicular, deben ser excluidos de los programas reproductivos.

Escroto.- Es la piel que cubre a los testículos y debe estar intacta, no debe presentar lesiones ni secreciones de ninguna clase. El escroto puede presentar o no lana (depende de la raza), pero es recomendable seleccionar a los animales que presenten la menor cantidad de esta. Esta piel contiene gran cantidad de glándulas sudoríparas y sebáceas, debe ser suave al tacto.

Epidídimos.- Estos son dos, uno para cada testículo, tienen una forma alargada y están íntimamente en contacto con los testículos. Cada epidídimo consta de 3 partes las cuales son la cabeza, el cuerpo y la cola. La cabeza está unida a la parte superior del testículo y no es posible palparla fácilmente, el cuerpo se localiza a lo largo del testículo por la parte medial del mismo y la cola se encuentra en la parte baja del testículo y ambas pueden ser palpadas a través del escroto.

Prepucio.- Es la piel que cubre y protege al pene, presenta una serie de pelos que cubren su orificio de salida. Esta piel puede estar o no pigmentada (depende de la raza). Esta piel deberá estar limpia y sin ninguna lesión, ya que existen enfermedades como son el ectima contagioso o la postitis ulcerativa que lo pueden llegar a afectar.

Pene.- Tiene dos funciones, la expulsión de la orina y la deposición de los espermatozoides dentro de la vagina. El pene se divide en cuerpo, glande y proceso uretral, el cual es una extensión de la uretra de unos 3 – 4 cm y el cual gira rápidamente durante la eyaculación y proyecta el semen en la parte anterior de la vagina de la hembra. El pene también se puede ver afectado por las enfermedades mencionadas en el punto anterior (Angulo *et al.*, 2003).

1.3 EL SEMEN Y SUS CARACTERÍSTICAS

El semen lo forman dos principales constituyentes: el plasma seminal y los espermatozoides.

1.3.1 Plasma seminal:

Está constituido por las secreciones de las glándulas bulbouretrales, la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y los conductos deferentes, siendo un vehículo isotónico, nutritivo y protector al permanecer tamponado, aunque el rango puede ir de 5.9 a 7.3, el pH es normalmente neutro. Contiene también agentes antimicrobianos como la seminalplasmina e inmunoglobulinas, principalmente IgA y una gran variedad de hormonas como andrógenos, estrógenos, FSH, LH, hormona del crecimiento, insulina, glucagón, prolactina, relaxina, destacando entre ellas las prostaglandinas.

Tiene tres funciones principales: 1) actúa como vehículo para los espermatozoides, transportándolos desde el sistema reproductor del macho durante la eyaculación, 2) sirve de activador a los espermatozoides, previamente no móviles, y 3) proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora para mantener la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse éstos en el aparato genital de la hembra (Mejía O., 2003).

1.3.2 Espermatozoides:

Son los gametos masculinos que se producen en los túbulos seminíferos de los testículos.

1.3.3 Estructura de los espermatozoides:

Los espermatozoides son células haploides altamente especializadas, cuya función es transportar hasta el ovocito la información genética de su especie. La organización de estas células incluye una cabeza con su núcleo y capuchón acrosómico y una cola con piezas intermedia y principal y porción terminal. La cabeza y la cola se unen por una estrecha porción, el cuello, que presenta cierta facilidad de ruptura (Hafez, 2000).

1.3.4 Motilidad de los espermatozoides:

Los espermatozoides pueden tener los siguientes tipos de movimientos:

- a) Movimiento progresivo hacia adelante
- b) Movimiento circular rotatorio
- c) Movimiento oscilatorio o convulsivo sin progreso ni cambio de posición.

La velocidad y tipo de movimiento de los espermatozoides puede variar según un gran número de factores: método de recogida del semen, factores ambientales, manejo del semen después de recogido, intervalo entre la recogida y la valoración, y variaciones individuales del propio semental.

En el semen, los espermatozoides tienen cargas eléctricas negativas, con lo que se repelen entre sí. Si los espermatozoides pierden su carga negativa tienden a agruparse. Este fenómeno recibe el nombre de aglutinación y puede ser debido a un aumento de la acidez del medio, presencia de iones metálicos, bacterias u otras impurezas, o a la presencia de aglutininas (formadas después de la inmunización), originadas en el animal (Salamon, 1990).

1.3.5 Metabolismo de los espermatozoides:

La energía necesaria para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, especialmente la fructosa, presentes en el plasma seminal. La glucosa que también es metabolizada por los espermatozoides, a menudo se utiliza como componente de los diluyentes. Cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides, se produce dióxido de carbono (CO₂), agua y algo de ácido láctico.

1.3.6 Factores que afectan la motilidad de los espermatozoides:

Temperatura: la temperatura del semen en el momento de la eyaculación es próxima a la del cuerpo (37 °C). La exposición de semen a temperaturas mayores

a la indicada aumenta el ritmo metabólico, agotan las reservas de energía y decrece la vida media del espermatozoide. Temperaturas superiores a los 45 °C matan a los espermatozoides (Salamon, 1990).

La disminución de la temperatura reduce el metabolismo de los espermatozoides, pero una bajada súbita de temperatura, particularmente por debajo de 10 °C, producirá una pérdida irreversible de su viabilidad, lo que se conoce como shock de frío.

Luz: Una exposición corta a la luz solar puede reducir la viabilidad de los espermatozoides y si ésta exposición se prolonga 30- 40 minutos pueden morir.

Contacto con metal: El contacto con metal de cualquier tipo, es peligroso para los espermatozoides, por eso solo se debe usar material de vidrio o equipos de materiales sintéticos e inertes, cuando se trate de recoger, diluir y/o conservar.

Contacto con agua: El agua reduce la presión osmótica del plasma seminal con lo que puede matar a los espermatozoides.

Impurezas y bacterias: Las bacterias, el polvo, los pelos y otros contaminantes que pueden estar contenidos en el semen, reducirán la viabilidad de los espermatozoides, o incluso podrán matarlos.

Desinfectantes: Los desinfectantes y antisépticos son muy peligrosos para los espermatozoides, por lo que se evitará su uso. Para esterilizar el material se puede utilizar alcohol al 70% en agua, y el material de vidrio se debe esterilizar mediante calor seco.

Exposición prolongada al aire: El oxígeno del aire incrementa notablemente el metabolismo de los espermatozoides, con lo que se acumula ácido láctico en el semen, lo que puede reducir el pH del semen por debajo del óptimo, que es 7,0, con lo que la viabilidad de los espermatozoides se reducirá notablemente.

Capacidad tamponante del diluyente- El medio que se utilice para diluir el semen debe tener suficiente capacidad amortiguadora para mantener el pH óptimo.

Presión osmótica del diluyente: los componentes (solutos) disueltos en el medio y que rodean al espermatozoide pueden ejercer cierta presión sobre la membrana celular. Este fenómeno se conoce como presión osmótica y aumenta según la concentración de solutos en el medio. Los medios en que la concentración de solutos es equivalente a la del interior de la célula se dice los que son isotónicos. Los medios que tienen concentraciones más bajas de solutos son hipotónicos, y los que tienen más solutos son hipertónicos (Salamon, 1990).

1.4 OBTENCIÓN DEL EYACULADO

Las técnicas que se utilizan para la obtención del semen pueden ser dos: vagina artificial o electroeyaculación. Con la ayuda de una vagina artificial, el semen se puede obtener utilizando un animal señuelo para estimular una eyaculación después de un entrenamiento con un objeto ficticio o por medio de la electroeyaculación. Los dos métodos se recomiendan para asegurar una muestra de alta calidad. No todos los animales responden bien a la utilización de vagina artificial, por lo que en estos casos el último procedimiento debe ser utilizado. La obtención del semen por medio de la electroeyaculación se considera conveniente sólo cuando no es posible utilizar la vagina artificial, sobre todo cuando el macho se rehúsa o no puede llevar a cabo la monta cualquiera que sea la razón, por lo tanto se debe considerar como un método auxiliar y no sustitutivo de la vagina artificial (Mejía O., 2003).

1.5 MANEJO Y EVALUACIÓN DEL SEMEN

El eyaculado ovino tiene un volumen de 1 a 1.5 ml, y puede contener de tres mil a siete mil millones de espermatozoides (Aisen, 2004, Hafez, 2000).

El semen podrá procesarse para tres usos básicos:

- a) Semen fresco, puro o diluido, a 30-37 ° C y no más de 1,5 horas
- b) Semen refrigerado, entre 15°C y 5°C, hasta 12-24 horas
- c) Semen congelado a -196°C, indefinidamente.

El semen fresco debe ser conservado a 30 °C, evitando todo cambio térmico. Puede utilizarse puro o diluido, y como medio diluyente es habitual utilizar leche descremada, que aporta lipoproteínas, siendo capaz de amortiguar el pH y dar estabilidad y osmolaridad adecuadas. Para la inseminación con semen fresco por vía cervical se emplean dosis de 50-200 millones de espermatozoides, en un volumen de 0,02 a 0,1 ml.

El semen se refrigera con el fin de reducir el metabolismo energético de los espermatozoides, prolongando así su viabilidad y capacidad fecundante. El semen de mamífero, especialmente de carnero y macho cabrío es sensible al enfriamiento (choque frío), manifestándose por un aumento del número de espermatozoides muertos, formas anormales, alteración de la distribución de lípidos de la membrana y aumento del calcio intracelular. El choque por frío afecta de manera súbita e irreversible la membrana plasmática. En el caso del espermatozoide ovino, existe una distribución desigual de proteínas del

citoesqueleto asociadas a membrana, por lo que sería más sensible a la refrigeración (Salamon, 1990).

Después de recogido el semen y antes de usarlo se debe determinar cuidadosamente tanto la cantidad como la calidad del eyaculado. Para manejar el semen se precisa hacerlo con sumo cuidado para que no se afecte la viabilidad de los espermatozoides. Existe una serie de factores que afecta la viabilidad de los espermatozoides una vez recogido el semen. Se debe poner especial atención para que el semen no sea expuesto a condiciones desfavorables al recogerlo o manejarlo. Se debe procurar que todo el material de vidrio, para la recogida o manejo del semen este perfectamente limpio, estéril, seco y templado a 30 °C especialmente en los días fríos (Evans, 1990).

1.5.1 Examen macroscópico

1.5.1.1 Color, olor y consistencia:

El semen del carnero es normalmente blanco cremoso (cuadro 3). Deben descartarse los eyaculados que presentan coloración blanco-rosácea que indica la presencia de sangre probablemente a causa de una lesión del pene al momento de la recolección, o gris que indica algún tipo de infección o contaminación en el aparato reproductor. La presencia de orina es un suceso frecuente cuando el semen se obtiene por electroeyaculación y le confiere un olor característico.

Cuadro 3. Valoración visual de la escala para la concentración espermática. (Aisen, 2004).

| Puntuación | Número aproximado de espermatozoides X 10 ⁶ /ml |
|-------------------|--|
| 5 Cremoso espeso | 4,5 – 6 |
| 4 Cremoso | 3,5 – 4,5 |
| 3 Cremoso liviano | 2,5 – 3,5 |
| 2 Lechoso | 1 - 2,5 |
| 1 Nublado | 0,3 – 1 |
| 0 Acuoso claro | Muy pocos |

1.5.1.2 Volumen:

Depende del método de recolección y la frecuencia, es mayor por electroeyaculación que con vagina artificial. El volumen promedio es de 1 ml dependiendo la raza, edad, estado general de macho y destreza del operario. En general, para los trabajos de rutina se descartan aquellos eyaculados con un volumen menor de 0.4 ml. Puede medirse directamente en el tubo colector si esta graduado o bien con una pipeta calibrada. Si existiese espuma, esta se desestimara en la determinación del volumen. Si las muestras se recolectan 3 o más veces al día, o durante periodos extensos, dicho volumen disminuye. Este volumen es de 0.5 – 2 ml en animales maduros y 0.5 – 0.7 ml en los jóvenes.

1.5.1.3 Movimiento en masa macroscópica:

Los espermatozoides en movimiento vigoroso se desplazan creando ondas que son visibles a corta distancia. En una maniobra rápida, se observa el tubo recolector con el eyaculado, tratando de determinar el movimiento en remolino u ondas y, de manera grosera, la motilidad de la muestra. Esta se corresponderá con la observación de ondas al microscopio (Aisen, 2004).

1.5.2 Examen microscópico

1.5.2.1 Concentración:

La concentración de espermatozoides (número de células espermáticas por unidad de volumen) se suele expresar en espermatozoides/ml. Los valores normales para el carnero oscilan entre 3000-7000 x 10⁶ espermatozoides/ml. Su determinación puede hacerse en forma subjetiva a través de la apariencia / color del eyaculado o en forma objetiva, por medio de cámaras de recuento microscópico, con fotocolorímetros o turbidímetros (Aisen, 2004, Hafez, 2000, Evans, 1990).

Los materiales necesarios son: pipeta de glóbulos rojos, o una pipeta calibrada automática, cámara de recuento de Neubauer, cubreobjetos, papel absorbente, líquido de dilución, agua destilada.

Pasos a seguir:

- Aspirar semen con la pipeta para glóbulos rojos, que deberá estar templada y perfectamente seca, hasta la marca de 0.25.
- Limpiar el extremo de la pipeta cuidando de no variar el enrase.
- Aspirar el líquido de dilución (puede ser agua común) hasta la marca 101.
- Tapar con los dedos ambos extremos de la pipeta y agitar horizontalmente en forma suave unas 30 veces.

- Desechar las primeras gotas.
- Colocar el extremo de la pipeta en el borde del cubreobjetos y dejar que la cámara se cargue por capilaridad. El líquido no debe pasar a los surcos laterales ni deben quedar glóbulos de aire o zonas sin cargar.
- Dejar reposar unos minutos antes de iniciar el recuento.

Colocar la cámara bajo observación microscópica (100 o 200 aumentos). Si los espermatozoides no están repartidos uniformemente por toda la cámara, debe repetirse la operación de carga. Se cuenta el número de espermatozoides en un cuadrado “grande” (sin divisiones internas) por cada cuadrante y se repite el conteo en uno de los cuadrantes elegido al azar, contándose en total 5 cuadrados y posteriormente realizar el cálculo (cuadro 4).

Cuadro 4. Fórmula para calcular la cantidad espermática por ml. (Cuento *et al.*, 1993)

Formula:

$$\text{Espermatozoides por ml} = \frac{n \times 400 \times 10 \times 200 \times 1000}{80}$$

Donde: n = Número de espermatozoides en 80 cuadros pequeños

400 = Número de cuadros pequeños en 1 mm²

10 = 0,10 mm de profundidad de la cámara

200 = Dilución empleada 1:200

1000 = Factor de transformación de mm³ a cm³

80 = Número de cuadros pequeños contados

1.5.2.2 Motilidad en masa microscópica:

La cantidad y la calidad del movimiento espermático ha sido una manera común de evaluación seminal, ya sea en estado fresco o conservado. El semen de carnero presenta ondas características a la observación microscópica, que se valoran subjetivamente de 0 a 5 puntos. Su determinación es rápida y puede ser útil a la hora de establecer si un eyaculado es inicialmente apto para continuar su procesamiento (cuadro 5).

Cuadro 5. Puntuación de la actividad de los espermatozoides (Aisen, 2004).

| Puntuación | Descripción |
|-------------------|--|
| 5 Muy buena | Denso, ondas de movimiento rápido. No puede observarse espermatozoides individuales. 90% o más son activos. |
| 4 Buena | Ondas con movimiento vigoroso, pero no tan rápido como en la puntuación 5. 70-80% o más son activos. |
| 3 Regular | Sólo movimiento de ondas pequeñas y lentas. Puede observarse espermatozoides individuales. 45-65% son activos. |
| 2 Pobre | No se forman ondas. Algún movimiento de espermatozoides. 20-40% son activos. |
| 1 Muy pobre | Muy pocos espermatozoides muestran signos de vida. |
| 0 Muertos | Todos los espermatozoides están inmóviles. |

Para su medición, se coloca una gota de semen puro en un portaobjetos limpio y templado a 37° C. Se observan las ondas características, sin cubreobjetos a 40 o 100X, en el borde de la gota.

1.5.2.3 Motilidad individual:

Es uno de los parámetros más utilizados en la valoración del semen. Sin embargo, no pronostica en forma ajustada la capacidad fecundante del espermatozoide. Se determina por recuento de espermatozoides móviles, con relación al total expresado como porcentaje.

Para la determinación de la motilidad individual se coloca una gota de diluyente isotónico y una pequeña gota de semen fresco en un portaobjetos a 37° C. Se homogenizan ambas gotas y se observa con un cubreobjetos a 10 o 40X. Visualizando varios campos microscópicos se estima el porcentaje de espermatozoides móviles (Aisen, 2004, Evans, 1990).

La valoración de la motilidad implica la estimación subjetiva de la viabilidad de los espermatozoides y la calidad de la motilidad. La valoración del semen puro indica el comportamiento de los espermatozoides en su propio líquido de las glándulas accesorias. Las concentraciones espermáticas elevadas pueden dificultar la

medición de la motilidad en semen puro, limitación que se soluciona con la dilución de una cantidad pequeña de semen en un diluyente de buena calidad.

Los parámetros de motilidad incluyen:

Porcentaje de espermatozoides en movimiento.

Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva.

Es posible observar diversos patrones de movimiento. Los patrones generales de motilidad espermática en el semen diluido se presentan en un patrón de semi arco largo. El grado de vigor se utiliza para calificar una muestra (cuadro 6).

Cuadro 6. Determinación de la puntuación del vigor del movimiento ondulado de los espermatozoides (Aisen, 2004).

| Puntuación | Aspectos del movimiento ondulado |
|-------------------|--|
| 0 | Inmovilidad total |
| 1 | Movilidad individual |
| 2 | Movimiento muy lento |
| 3 | Movimiento ondulado general, amplitud lenta de las ondas |
| 4 | Movimiento ondulado rápido sin remolinos |
| 5 | Movimiento ondulado rápido con remolinos |

1.5.2.4 pH Seminal:

El pH del semen es en general neutro a levemente alcalino, a fin de contrarrestar la acidez normal del aparato femenino. Los valores de pH del semen pueden variar dependiendo si es recién eyaculado o ha sufrido almacenamiento, por lo que existe a veces una importante amplitud de rangos normales. En el carnero y el macho cabrío estos valores oscilan entre 6,2-7,3, llegando incluso a citarse como normal un pH de 7,5.

La determinación del pH es sumamente rápida y fácil de realizar, siendo suficiente a nivel de rutina el empleo de papel indicador de pH (rango neutro-alcalino). Las modificaciones de pH se relacionan con la presencia de orina, infecciones, trastornos genitales anatómicos, fisiológicos o infecciosos y anomalías metabólicas del espermatozoide (Alder y Melling, 2000).

1.5.2.5 Test de endósmosis (HOST):

Esta prueba se fundamenta en las modificaciones producidas en la cola (hinchamiento o “swelling”) cuando los espermatozoides son incubados en un medio hipoosmótico durante un breve período, y demuestran la capacidad de los espermatozoides para captar agua. El fenómeno osmótico observado necesita de la integridad estructural y funcional de la membrana.

Esta prueba está directamente correlacionada con la motilidad individual la cual hace que conjuntamente sea una prueba más objetiva (Blasi *et al.*, 2001).

1.6 CONSERVACIÓN DEL SEMEN

1.6.1 Características de los diluyentes, tipos de diluyentes y aditivos:

El espermatozoides eyaculado no sobrevive durante largos períodos, a menos que se hayan añadido agentes protectores. Tradicionalmente, los diluyentes que se han utilizado para tal fin deben:

- a) Proteger contra los efectos dañinos de los cambios térmicos (especialmente en las membranas con sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes).
- b) Proporcionar nutrientes como fuentes de energía.
- c) Proporcionar un medio de amortiguación de pH, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.
- d) Mantener una presión osmótica adecuada.
- e) Mantener un equilibrio electrolítico.
- f) Aumentar el volumen del eyaculado, a fin de permitir múltiples dosis para inseminar (Evans G., 1990; Aisen, 2004).

Los elementos que se utilizan para la preparación de un diluyente deben ser químicamente puros y disolverse en agua destilada (Daza, 1994).

Leche: La leche es un producto que se utiliza como diluyente ya que proporciona un medio isotónico, mantiene la viabilidad espermática y su uso se difundió inicialmente en el semen bovino. En ovino se utiliza para semen fresco y refrigerado ya que se han tenido resultados variables en la congelación.

Yema de Huevo: Su acción consiste en proteger a los espermatozoides contra el choque térmico por frío, además la fracción lipídica de la yema de huevo (lecitina y

cefalina) tiene una acción protectora, y la fracción lipoproteica un efecto conservador.

La yema de huevo se utiliza como agente protector de la membrana plasmática y acrosómica del espermatozoide y actúa como amortiguador osmótico. La protección que ejerce en la congelación se da por la adhesión a la membrana plasmática, especialmente dada por la fracción lipoproteica de baja densidad. Pero la utilización de la yema de huevo representa un potencial riesgo de contaminación microbiológico para ser utilizado como diluyente, esta contaminación puede ser evitada con el uso de la yema de huevo en polvo la cual reduce los agentes contaminantes y patógenos (Sauveur, 1991).

Citratos, fosfatos, fructosa, glucosa: son nutrientes para el espermatozoide y favorecen la anabiosis (acto de revivir después de una muerte aparente).

Tris (Hidroximetil-aminometano): es una sustancia química con gran capacidad tamponante para proteger a los espermatozoides de las variaciones de pH y facilitar la conservación de la vitalidad.

Glicerol (Glicerina): tiene acción crioprotectora. Este protege a los espermatozoides durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelación.

Penicilina y Dihidroestreptomina: para congelación de semen se adiciona 1000 UI/ml de Penicilina G sódica, o cristalina (no la potásica que es tóxica), y 1 mg/ml de Dihidroestreptomina. En esta proporción estos antibióticos tienen efecto bacteriostático, es decir, inhiben el crecimiento bacteriano. Además aseguran una mayor y mejor supervivencia de los espermatozoides y aumentan la fertilidad en dosis con semen congelado (Daza, 1994).

1.7 DILUCIÓN DEL SEMEN

La dilución del semen se debe hacer tan pronto como se pueda una vez recolectado y analizado de forma rutinaria. Tanto el semen como el diluyente se colocan en baño maría a 30°C para que en el momento de la dilución tengan la misma temperatura. El diluyente se debe colocar en el baño antes que el semen. La adición de diluyente frío al semen puede ocasionar el shock por el frío con la consiguiente reducción de la fertilidad. Para la dilución se debe utilizar una pipeta calibrada seca y estéril. La dilución se realiza pipeteando una cantidad adecuada de diluyente (depende del grado de dilución) y adicionándola lentamente al recipiente donde se encuentre el semen, nunca al contrario, ya que pueden alterarse los espermatozoides con lo que se reduciría su motilidad. Después de adicionar el diluyente se agita todo convenientemente y se examina al microscopio para comprobar la motilidad de los espermatozoides (Daza, 1994).

1.7.1 Grado de dilución:

Antes de proceder a la dilución del semen de carnero se debe determinar el número de espermatozoides y volumen requerido para la inseminación.

1.7.2 Volumen de inseminación:

Puede variar ligeramente dentro de ciertos límites. El límite inferior viene determinado por el volumen mínimo que se puede manejar convenientemente y con cierta seguridad. El límite superior está determinado por la capacidad del órgano o lugar de la inseminación para retener el semen.

Los volúmenes recomendados para inseminación son los siguientes:

Para inseminación vaginal 0,30-0,50 ml.

Para inseminación cervical 0,05-0,20 ml.

Para inseminación intrauterina 0,05-0,10 ml (por cada cuerno). (Salamon, 1990).

1.7.3 Número de espermatozoides en el inseminado:

Como norma general se necesitan menos espermatozoides para la inseminación uterina que para la cervical y menos para ésta que para la vaginal. Independientemente del lugar de la inseminación, el número de espermatozoides móviles afecta la fertilidad.

La dilución que se puede hacer del semen depende de la concentración de espermatozoides activos en la muestra y del número de dosis de inseminación que se precisen una vez diluido. Las muestras de semen de buena concentración y motilidad (puntuación 4-5) se diluyen normalmente: 1 parte de semen + 1 parte de diluyente (dilución 2 veces), 1 + 2 (dilución 3 veces), ó 1 + 3 (dilución 4 veces), para utilizarlas en inseminación cervical (Salamon, 1990).

1.8 CONSERVACIÓN DEL SEMEN CONGELADO

1.8.1 Crioprotectores:

Son moléculas de características bien definidas en cuanto a tamaño y permeabilidad, que protegen las estructuras celulares a bajas temperaturas. Los crioprotectores pueden clasificarse atendiendo al grado de permeabilidad de la membrana plasmática.

1.8.2 Crioprotectores no penetrantes:

Son aquellos que recubren la membrana plasmática del espermatozoide protegiendo su estructura de la acción del frío. Ninguna atraviesa la membrana

espermática debido a su alto peso molecular. Los más utilizados son los azúcares (glucosa, lactosa, fructosa), las proteínas de la leche descremada y la yema de huevo (Evans, 1990; Salamon, 1990).

1.8.3 Crioprotectores penetrantes:

Son aquellos capaces de penetrar en la célula de forma uniforme evitando el estrés osmótico, donde se produce un cambio físico del estado líquido al estado sólido, el principio básico es evitar daños por la formación de cristales de hielo intracelular. El primer cambio se produce al congelar el agua libre intracelular y el segundo se debe a la exposición de las células no congeladas a altas concentraciones de solutos, durante la criopreservación. Los agentes crioprotectores más utilizados son Dimetil – Sulfoxido (DMSO), Propilen- glicol, Etilen- glicol, Metanol, Etanol y el glicerol (Salamon, 1990).

La protección del glicerol se debe a las propiedades coligativas y a la unión con las moléculas de agua, atravesando rápidamente la membrana plasmática del espermatozoide, impidiendo el crecimiento de los cristales de hielo. Debido a la acción toxica del glicerol, se ha reducido la concentración para el congelamiento de semen ovino a 4–8% (Aisen, 2004).

1.8.4 Criopreservación:

Cuando el semen se congela y conserva a muy baja temperatura (-196°C), las reacciones metabólicas de los espermatozoides quedan detenidas. De esta forma se puede disponer de material genético para el futuro y asegura semen en cualquier época del año.

El semen de carnero se puede congelar lentamente (método convencional) o muy rápido bien en vapores de nitrógeno líquido o en bloques de hielo seco (dióxido de carbono sólido a -79°C), pero este suele congelarse por método de bloques o pastillas, que tiene la ventaja de ser muy simple, fácil manejar los bloques congelados y buena recuperación de las características de los espermatozoides después de descongelar (Evans, 1990). Adicionalmente se requiere una menor cantidad de nitrógeno en el termo criogénico para su conservación. No existen diferencias en la congelación lograda con hielo seco (-78,8 °C) y el nitrógeno líquido (-196 °C), ya que a partir de -50 °C, cesan los daños causados por la congelación.

La dilución del semen para congelamiento se puede hacer en uno o dos pasos: en el sistema de un solo paso el semen se lleva a la dilución final de pre – congelación a 30°C con un diluyente que contenga glicerol y luego se enfría a 5°C durante 1.5 -2.0 horas en refrigerador doméstico o cámara; en el sistema de dos pasos, el semen se diluye a 30°C, inmediatamente luego de ser recogido, se hace

una dilución hasta la mitad con un diluyente que no contenga glicerol y después de enfriado durante 1.5 – 2.0 horas a 5°C se hace la dilución definitiva con un diluyente provisto de glicerol. Se prefiere el de un solo paso por su simplicidad y menor manejo del semen antes de la congelación, ya que los daños ocurren principalmente durante los procesos de congelación - descongelación (entre -15 a -60°C) y no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido (Evans G., 1990).

1.8.5 Congelación del semen en pajillas

1.8.5.1 Fraccionamiento del semen en pajillas:

Las pajillas, el polvo de alcohol polivinílico y todos los materiales que se vayan a utilizar en el empacado de las pajillas deben estar en la nevera a una temperatura de 4 °C con anterioridad. Se debe homogeneizar muy bien el semen diluido antes de proceder al llenado de las pajillas. Las pajillas se cargan pipeteando las dosis seminales a través del tapón triple (algodón - alcohol polivinílico - algodón), sumergiendo el extremo sin tapón en el semen. Para proceder al llenado de las pajillas se les toma del extremo con tapón (para no transmitir el calor de la mano al semen). Se secan con papel absorbente, se crea un vacío en el extremo sin tapón y se sella dicho extremo con golpes suaves y perpendiculares sobre una placa que contenga el polvo de alcohol polivinílico. Inmediatamente se sumergen en un recipiente con agua a 5°C para que gelifique y selle el tapón recientemente formado.

Es importante que esta operación se lleve a cabo con rapidez y a baja temperatura por lo que se recomienda realizar la manipulación en el interior de la nevera o en un ambiente a baja temperatura.

Cuando se vayan a congelar pajillas se debe dejar un pequeño espacio de aire en ellas (en el extremo por donde se llena) para evitar que se rompan al congelarlas. Las pajillas que contenga semen líquido, en un solo paso se enfrían a 5°C en 1,5-2,0 horas y luego se congelan. El semen diluido en dos etapas, se coloca en pajuelas premarcadas, después de enfriadas a 5°C y de haber hecho la segunda dilución, se mantiene a esa temperatura durante 1,0-1,5 horas, para que exista equilibrio entre el semen y el glicerol, y luego se congelan (Evans, 1990).

1.8.5.2 Congelamiento en vapores de nitrógeno líquido:

Será necesario una caja de icopor (hielera) con tapa, de aproximadamente 39 cm de largo por 34 cm de ancho por 25 cm de altura. Se vierte nitrógeno líquido en la caja hasta 6 cm respecto del fondo. Luego de secar las pajillas se colocan en un marco de aluminio apoyando solo sus extremos y cuidando que no se toquen

entre sí, el cual se ubica en el nivel 1 de la caja (a 20 cm de altura con respecto al fondo de la caja), y se tapa por 2 minutos. Luego se destapa y se ubica el marco con las pajillas en el nivel 2 de la caja (a 9 cm de altura con respecto al fondo de la caja), y se tapa por 3 minutos. Completado éste tiempo las pajillas se vuelcan directamente en el nitrógeno y se almacenan en portapajillas en un termo de nitrógeno líquido (Cuento *et al.*, 1993)

Algunas de las ventajas de la conservación del semen por congelación a -196°C en Nitrógeno líquido son:

- a) Facilita almacenar y conservar el semen durante muchos años, para usarlo antes y después de fallecido el reproductor.
- b) Facilita trasportarlo (dentro de un país o a otro continente).

Es importante tener en cuenta las siguientes precauciones durante la manipulación del semen:

- a) Proteger la muestra contra el choque térmico.
- b) No exponer el semen a productos químicos nocivos o al agua.
- c) Evitar la exposición al aire, luz u otras irradiaciones.
- d) No agitar la muestra (Daza, 1994).

1.9 DESCONGELACIÓN DEL SEMEN

Durante el proceso de congelación y descongelación, el punto de cambio de estado de sólido a líquido es un factor importante en la recuperación espermática. Como norma general, cuanto más rápidamente se congele el semen, más rápidamente se debe descongelar, a fin de obtener rápida recuperación de los espermatozoides (Daza, 1994; Evans, 1990).

La mayoría de los investigadores utilizan para el semen congelado en pajillas el método de inmersión directa en agua a 37°C durante 10-30 segundos. De este modo la dosis llega a una temperatura intermedia ($18-20^{\circ}\text{C}$) que favorece la manipulación a temperatura ambiente por corto tiempo (carga de inyector de semen para IA). (Evans, Salamon, 1990; Fernández Abella, 2005). La pajilla una vez descongelada, se seca y se corta por un extremo (de preferencia el sellado con polvo de alcohol polivinílico) (Evans, 1990).

1.10 OXIDACIÓN

Independientemente de la técnica de congelación y descongelación del material germinal criopreservado de que se trate, el número de células apoptóticas aumenta en comparación con el semen fresco. El semen criopreservado es utilizado con éxito en pocas especies y su aplicación a otras puede ser un problema. El almacenamiento de semen, particularmente en estado congelado, causa cambios bioquímicos y funcionales en los espermatozoides, resultando en una reducción de la movilidad y la viabilidad, con el obvio perjuicio posterior durante el transporte y la fertilidad. La fertilidad se ve reducida debido a que los espermatozoides dañados o defectuosos generan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno y éstas son responsables del daño oxidativo.

El daño a bajas temperaturas ocurre en la membrana plasmática, en la membrana acrosomal, en la mitocondria y en la vaina del axonema y aunque fisiológicamente se forman radicales libres durante la respiración mitocondrial, es importante tener en cuenta que las anomalías en la mitocondria pueden contribuir a la producción excesiva de los radicales libres (Castillo *et al.*, 2011).

1.10.1 Radicales libres y especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón no pareado y se comportan como moléculas altamente reactivas; pueden causar daño por reaccionar con las diversas biomoléculas sustrayendo electrones para lograr su estabilidad. Los sustratos moleculares más frecuentes incluyen a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares, nucleótidos en el ADN, proteínas y carbohidratos.

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) por espermatozoides dañados tiene un impacto negativo sobre las células viables restantes, ya que representa un daño acumulativo para los espermatozoides que son almacenados.

Entre las ROS destacan fundamentalmente el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El peróxido de hidrógeno es una molécula muy reactiva y puede ser precursora de radicales hidroxilo en presencia de metales de transición. La reacción inicial de la oxidación de los ácidos grasos consiste en una lipoperoxidación y es generada por las ROS que inducen una reacción en cadena, provocando un rompimiento de dobles enlaces en los lípidos de las membranas (Córdova *et al.*, 2003).

Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, ya que pueden activar al espermatozoide en la fecundación; un desequilibrio entre su

producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide, provocando un estrés oxidativo que se ha definido como un desequilibrio entre los agentes oxidantes y los mecanismos antioxidantes. Estos últimos involucran sistemas enzimáticos y moléculas orgánicas diversas entre las que se incluyen las vitaminas E y C, que cumplen su función antioxidante al disminuir el porcentaje de peroxidación lipídica (Castillo *et al.*, 2011).

1.10.2 Antioxidantes

Un antioxidante con función biológica se define como aquella sustancia que presente en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del sustrato toda vez que resulta un agente reductor más potente. En bioquímica inorgánica puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de oxidorreducción.

1. Antioxidantes preventivos. Estos actúan al inicio de una cadena de oxidación para reducir o impedir el comienzo de una cadena de oxirreducción. Como ejemplos se pueden considerar los reductores de peróxidos orgánicos e inorgánicos (enzimas glutatión peroxidasa, catalasa y peroxidasa).
2. Antioxidantes secundarios. Son interruptores que actúan al bloquear en alguna etapa la cadena de oxidación ya iniciada al captar radicales libres y al acortar la longitud de la cadena de oxidación y sus consecuencias (vitaminas E y C y la enzima superóxidodismutasa) (Hicks, 2002).

1.10.3 Vitamina C

La vitamina C juega un papel vital en la síntesis de colágeno, la conversión de la 3,4- dihidroxifeniletamina en noradrenalina y en la protección contra las lesiones producidas por los radicales libres. Se ha estudiado profusamente el papel protector del ácido ascórbico en los sistemas biológicos vía reacción de radicales libres, en los cuales las vitaminas E y C actúan sinérgicamente. La vitamina C reacciona con el radical vitamina E para regenerar la vitamina E y el radical ácido ascórbico resultante puede a su vez ser reducido nuevamente a vitamina C por el dinucleótido de adenina nicotinamida (NADH). La vitamina C es una de las proteínas inestables. La existencia de la vitamina C se ve profundamente afectada por el procesado, manejo y almacenamiento de los alimentos. La ácido ascórbico oxidasa, la citocromo oxidasa y la peroxidasa son las enzimas presentes en las frutas y hortalizas responsables de la oxidación de la vitamina C. Sin embargo,

durante el procesado de los alimentos, las pérdidas de vitamina C debidas a destrucción enzimática son mínimas. Las pérdidas se deben principalmente a reacciones no enzimáticas oxidativas y no oxidativas. Las reacciones no oxidativas son comparativamente lentas y se pueden acelerar disminuyendo el pH (Wong, 1995).

1.10.4 Vitamina E

La vitamina E, que es lipofílica, se considera que es, probablemente, el antioxidante primario, especialmente en la peroxidación de los lípidos en las membranas celulares. La vitamina E también llamada α -tocoferol parece tener una función antioxidante, en especial para evitar la agresión de los peróxidos sobre los ácidos grasos insaturados de los lípidos de la membrana (Mathews y Van Holde, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad de los espermatozoides de ovino post-congelación a través de la adición de antioxidantes en el diluyente.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar la motilidad masal e individual de los eyaculados en fresco y su respuesta a los diferentes tratamientos de los aditivos con vitamina E, vitamina C, combinación de vitamina E y C y grupo control al descongelar.

Evaluar la respuesta de los tratamientos con 3 razas diferentes (Suffolk, Katahdin y Dorset).

Evaluar la permeabilidad de membrana por medio de la técnica de HOST en cada uno de los tratamientos y control.

3. HIPÓTESIS

Se presentarán diferencias significativas entre los tratamientos con antioxidantes añadidos al diluyente que los del tratamiento control post-congelación.

4. METODOLOGÍA

4.1 Localización

El estudio se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en el Km. 8.5 Carretera Federal Tequisquiapan a Ezequiel Montes. Municipio de Tequisquiapan, Querétaro.

4.2 Población y Muestras

Se utilizaron 9 machos ovinos de las razas Suffolk (3), Katahdin (3) y Dorset (3) con una edad promedio de 3 años reproductivamente activos y probados, durante la época de primavera (marzo- abril) los cuales fueron alojados en sementaleras individuales y se alimentados con avena (administrando el 4% de su peso corporal en Materia Seca) y agua *ad libitum*.

Se obtuvieron 3 tomas de cada animal en el transcurso de 5 semanas (2 tomas cada semana y 1 la última semana). Se realizaron 2 tomas de semen por animal por día (3 animales por semana), obteniéndose un total de 27 eyaculados totales.

4.3 Tratamientos

Se realizaron 3 colectas de semen de cada animal y se administraron 3 tratamientos diferentes en cada eyaculado y un control, los cuales fueron;

Grupo Control : Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%) y yema de huevo (5%).

Tratamiento 1: Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%), yema de huevo (5%) y vitamina C (.05mg/ml).

Tratamiento 2: Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%), yema de huevo (5%) y vitamina E (.05mg/ml).

Tratamiento 3: Triladyl (25%), Agua bidestilada (70%), yema de huevo (5%), vitamina E (.05mg/ml) y vitamina C (.05mg/ml).

4.4 Variables

9 animales (raza), 3 tratamientos (vitamina C, vitamina E y un combinado de vitamina C con vitamina E) y grupo control, previo a la refrigeración y a la descongelación del semen.

4.5 Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) mediante un modelo simple, de un factor (one way ANOVA) comparando el porcentaje de motilidad individual de las medias de los tratamientos (control, Vitamina C, Vitamina E y un combinado de vitamina C con Vitamina E) post-congelación y comparando las medias aritméticas de todos los tratamientos. También se evaluó el coeficiente de correlación entre las muestras con tratamientos y el Host.

4.6 Material

4.6.1 Material empleado para la colecta de semen

- Vagina artificial para ovinos
- Funda protectora para la vagina artificial en látex

4.6.2 Material empleado para la conservación de semen

- Hielera para la congelación
- Pajillas de 0.25ml
- Termo criogénico para almacenamiento de las pajillas

4.6.3 Material de Laboratorio

- Balanza de precisión
- Baño maría
- Pipeta automática de 5 µml graduable
- Microscopio óptico
- Termómetro de mercurio

4.6.4 Material Químico

- Triladyl
- Citrato de Sodio (HOST)
- Fructosa (HOST)
- Vitamina C
- Vitamina E

4.7 Métodos y procedimientos

Se utilizaron 9 machos ovinos puros de diferentes razas, propiedad del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano

(CEIEPAA), y de fertilidad comprobada. A cada animal se le realizó un examen andrológico, donde se examinó el comportamiento del animal solo y en grupo (Imágenes 3 y 4), se evaluó la condición corporal y se realizó un examen genital detallando: estado de prepucio, pene, escroto y testículos, según los protocolos mencionados, esto con el fin de asegurar que estuvieran exentos de anomalías o enfermedades, y de estimar qué tan cerca estaba la función reproductiva del estándar general aceptado como normal y para definir cualquier anomalía que pudiera estar presente.

Imagen 3. Evaluación individual de los reproductores.



Imagen 4. Evaluación en grupo de los reproductores.



Semanalmente se obtuvieron eyaculados mediante el uso de vagina artificial, y se realizó en campo una evaluación de rutina. La recolección se hizo en los corrales de los machos.

El protocolo que se siguió fue el siguiente:

1. Se armó la vagina Artificial (Imagen 5), la cual se cargó con agua a 45°C para que el interior quedara a 40°C. Se le agregó aire a la cámara de agua de la vagina artificial para crear presión haciendo que la luz de la vagina se estrechará hasta aproximadamente un espacio de 1 cm de diámetro.
2. Una persona sujetó la oveja que sirvió de señuelo, otra persona sujetó al macho y una última persona sujetó la vagina artificial con su mano diestra y con la mano libre en el momento de la monta desvió el prepucio hacia la vagina artificial (Imagen 6).
3. Cuando el macho montó hizo un movimiento hacia arriba y hacia adelante indicando que la eyaculación ocurrió (conocido como “golpe de riñón”).
4. Inmediatamente después del salto, el tubo colector se llevó a un baño maría a 36°C para protegerlo de los cambios bruscos de temperatura y se fraccionó para su respectivo análisis.

Imagen 5. Vagina artificial armada.



Imagen 6. Obtención de semen con vagina artificial y un animal señuelo.



El protocolo seguido para la evaluación de cada muestra de semen se dividió en 2 partes:

1. Examen macroscópico: donde se examinó volumen, color, consistencia y motilidad en masa macroscópica.
2. Examen microscópico: se determinó la concentración espermática por medio de la cámara de Neubauer, se evaluó la motilidad en masa microscópica y motilidad individual, así mismo con una pipeta se depositaba una gota de semen en un recipiente con el citrato de sodio y fructosa para la evaluación del HOST.

Cada eyaculado fue preparado con 1ml. de cada tratamiento. Respecto a la motilidad y la cantidad espermática por ml., se depositó una cantidad determinada de semen, la dilución del semen obtenido se realizó en forma aproximada, asegurándose una cantidad de 100 a 150 millones de espermatozoides totales por dosis de pajilla, posteriormente se refrigeraron las muestras y se hicieron 4 pajillas (.25ml.) por cada tratamiento, se congelaron y se observaron al microscopio 24 horas después de la congelación (Imagen 7 a 11).

Imagen 7. Evaluación microscópica del semen.



Imagen 8. Refrigeración de las muestras.



Imagen 9. Elaboración de pajillas.



Imágenes 10 y 11. Congelación de las pajillas.



La descongelación se hizo introduciendo las pajillas por 10-20 segundos en un baño maría a 37 °C. De este modo la dosis llega a una temperatura intermedia (18-20°C) que favorece la manipulación a temperatura ambiente por corto tiempo (Salamon, 1990). Al sacar las pajillas del agua eran secadas con servilletas de papel y colocadas en incubación a 37 °C para fraccionarlas cortando el extremo sellado con polvo de alcohol polivinílico (Imágenes 12 y 13), de cada pajilla se utilizó una gota para evaluación microscópica y una gota para realizar el HOST.

Imágenes 12 y 13. Descongelación de semen.



En la evaluación microscópica se evaluaba el porcentaje de la motilidad individual de cada uno de los 4 tratamientos y se observaron las 4 pajillas de cada tratamiento.

Para la prueba Host, se utilizó una gota de cada muestra las cuales fueron: Muestra control semen fresco, muestra control semen post-congelación, muestra tratamiento vitamina C, muestra tratamiento vitamina E y muestra del tratamiento combinado de vitamina C y vitamina E, todas las anteriores post-congelación. Se realizó un conteo de 100 espermatozoides al microscopio con el objetivo de 100X contando como viables solamente los espermatozoides que presentaban modificaciones producidas en la cola conocido como hinchamiento o “swelling” (Imagen 14), ya que cuando los espermatozoides son incubados en un medio hiposmótico durante un breve período demuestran la capacidad de captar agua, por lo cual los espermatozoides que demostraran esta capacidad serían todavía viables.

Imagen 14. Modificaciones en los espermatozoides (Prueba Host).



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previa realización del estudio, se tomaron eyaculados y se evaluaron siguiendo el protocolo estándar de evaluación de semen (Cuento *et al.*, 1993).

Al evaluar el semen, se obtuvieron resultados satisfactorios en la evaluación macroscópica y microscópica (Tabla 7). El promedio del semen de los carneros evaluados cumplió con las características de motilidad individual y motilidad masal de los espermatozoides requeridos para criopreservación de las muestras, siendo 86.83 % de motilidad individual (con un rango entre el 80 % - 90%), concentración, 3523×10^6 por mililitro (con un rango entre 2000 y 4500×10^6 por mililitro) y motilidad masal de 5 puntos (movimiento progresivo, rápido y energético del espermatozoide, valor 4 o 5) (Aisen, 2004).

Respecto a los machos de raza Katahdin se obtuvo un promedio de 0.71 ml por eyaculado, motilidad masal de 5 puntos y una motilidad individual de 88.88%. Los machos Suffolk obtuvieron un promedio de 0.81 ml por eyaculado, motilidad masal de 5 puntos y motilidad individual de 87.22%. Los machos Dorset obtuvieron un promedio de 0.91 ml por eyaculado, motilidad masal de 5 puntos y motilidad individual de 84.22%.

Los carneros Dorset obtuvieron el mejor promedio en cuanto a volumen por eyaculado (cuadro 7), los machos Suffolk y los machos Katahdin obtuvieron un promedio inferior al reportado por Aisen (2004) como deseables pero no están muy alejados e igualmente son aceptables. Sin embargo, los machos Dorset tuvieron en promedio la menor concentración espermática por ml, siendo 2683×10^6 casi al límite inferior reportado por Evans (1990). Los machos Katahdin se encontraron dentro de lo aceptable y los machos Suffolk reportaron la mayor concentración espermática por ml en promedio de 4115×10^6 . La motilidad individual entre las 3 especies es casi similar siendo ligeramente superior la registrada por los machos Katahdin, se observó que aunque el volumen y la concentración variaron entre razas no influyó de manera significativa en la medición de la motilidad individual y motilidad masal.

Cuadro 7. Promedio evaluación de semen pre-congelación todos los machos.

| Raza | Volumen (ml) | Concentración espermática ($\times 10^6$)/ml | Motilidad Masal | Motilidad Individual (%) | Host Control |
|--------|--------------|--|-----------------|--------------------------|--------------|
| Machos | 0.71 | 3773 | +++++ | 88.88 | 75.22 |

| | | | | | |
|----------------|------|------|-------|-------|-------|
| Katahdin | | | | | |
| Machos Suffolk | 0.87 | 4115 | +++++ | 87.22 | 72.77 |
| Machos Dorset | 0.91 | 2683 | +++++ | 84.44 | 72.55 |
| General | 0.83 | 3523 | +++++ | 86.83 | 73.34 |

En la evaluación de los tratamientos al descongelar el semen de machos Katahdin mostró que la vitamina E (cuadro 8) fue la que mejor respuesta tuvo, ya que registró un 30.73% de motilidad individual al descongelar, el grupo control tuvo un 27.39%, seguida por el tratamiento de vitamina C+ vitamina E con un 22.58% y por último el tratamiento con vitamina C con una media de 12.96%.

La evaluación HOST por otra parte demostró que el grupo control tenía el mayor porcentaje de motilidad al descongelar (cuadro 9) con un 38.11%, registrando la mejor respuesta de los tratamientos la vitamina E con un 35.11%, la vitamina C+E con un 23.88% y el tratamiento de vitamina C con un 12.77%.

Cuadro 8. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen con los tratamientos post-congelación machos Katahdin.

| | Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|----------|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Macho 1 | 31.10 | 14.44 | 34.44 | 16.66 |
| Macho 2 | 32.21 | 10.00 | 33.33 | 28.88 |
| Macho 3 | 18.88 | 14.44 | 24.44 | 22.21 |
| Promedio | 27.39 | 12.96 | 30.73 | 22.58 |

Cuadro 9. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos machos Katahdin.

| Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 38.11 | 12.77 | 35.11 | 23.88 |

Los tratamientos en el semen de machos Suffolk mostraron que el mejor tratamiento fue el de vitamina E (cuadro 10) teniendo la misma media que el grupo control con 49.99% de motilidad, el tratamiento vitamina C+E con 32.58% y el tratamiento con vitamina C que mostró un efecto adverso en la motilidad con un 25.17%.

Con la evaluación Host se corroboró que el tratamiento con vitamina E tuvo el mejor porcentaje de motilidad al descongelar el semen de raza Suffolk (cuadro 11) con un 51%, seguido del grupo control con un 48%, la combinación de vitamina C+E registro un 25% y la vitamina C siendo la menos efectiva con 19%.

Cuadro 10. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen post-congelación machos Suffolk.

| | Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|----------|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Macho 1 | 53.33 | 16.66 | 49.99 | 28.88 |
| Macho 2 | 46.66 | 29.99 | 48.88 | 38.88 |
| Macho 3 | 49.99 | 28.88 | 51.10 | 29.98 |
| Promedio | 49.99 | 25.17 | 49.99 | 32.58 |

Cuadro 11. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos machos Suffolk.

| Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 48 | 19 | 51 | 25 |

En los machos Dorset el semen tuvo la mejor motilidad al descongelar con el grupo control (cuadro 12) con 51.84%, seguido por el tratamiento con vitamina E registrando un 50.73%, la vitamina C+E con un 34.42% y por último el tratamiento con vitamina C con un 20.36%.

En la evaluación de los machos de raza Dorset, el HOST demostró que la vitamina E (cuadro 13) reaccionó de manera positiva al descongelar el semen contrario, a las otras dos razas evaluadas en este estudio, registrando un 36.11% de motilidad, el grupo control se mantuvo siendo el de mejor respuesta con 51.11%, el tratamiento con vitamina C+E con un 36.11% y la vitamina C con 14.33%.

Cuadro 12. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen post-congelación machos Dorset.

| | Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|----------|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Macho 1 | 44.44 | 19.99 | 51.10 | 34.44 |
| Macho 2 | 55.55 | 22.21 | 49.99 | 32.22 |
| Macho 3 | 55.55 | 18.88 | 51.11 | 36.66 |
| Promedio | 51.84 | 20.36 | 50.73 | 34.42 |

Cuadro 13. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos machos Dorset.

| Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 51.11 | 14.33 | 36.11 | 27.66 |

Sabemos la importancia que tiene asegurar la calidad del semen después de congelado, con el fin de conocer la posible capacidad de fertilización. Con la fertilidad del semen se han relacionado varios parámetros como la motilidad, ultra estructura y cambios bioquímicos de los espermatozoides después de la descongelación. Los eyaculados de carneros solamente se pueden considerar adecuados para su conservación y uso en la inseminación si el porcentaje de espermatozoides que se mueven hacia adelante no es menor del 40% al descongelarlos, y del 30% después de 5-6 horas de incubación (Evans, 1990).

En la evaluación del semen con los 3 tratamientos y el grupo control en todos los machos se encontró diferencia entre las medias de motilidad individual (cuadro 14) con vitamina C y el tratamiento con la combinación de vitamina C + vitamina E a la del grupo control y al tratamiento de vitamina E.

El tratamiento con Vitamina E obtuvo el mejor promedio general en la evaluación post-congelación con 43.81% seguido por el grupo control con 43.07%; en cuanto al tratamiento vitamina C + vitamina E tuvo una media de 29.86% y el tratamiento con vitamina C obtuvo la media más baja con un 19.49%.

En la evaluación de las pajillas de los tratamientos post-congelación con el método HOST en todos los machos (cuadro 15), se encontró que la muestra control tuvo el mejor promedio siendo de 45.74%, seguido por el tratamiento Vitamina E con

40.74%, el tratamiento Vitamina C + Vitamina E con un promedio de 25.51% y por último el tratamiento con Vitamina C con un promedio de 15.36%.

El ANOVA demostró diferencias estadísticamente entre los grupos analizados después de descongelar para la disminución del grado oxidativo ($P < 0.05$), por lo que los tratamientos con vitaminas influyen directamente en el porcentaje de motilidad individual al descongelar.

Cuadro 14. Porcentaje promedio de la motilidad individual en la evaluación de semen post-congelación todos los machos.

| | Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|-----------------|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| Machos Katahdin | 27.39 | 12.96 | 30.73 | 22.58 |
| Machos Suffolk | 49.99 | 25.17 | 49.99 | 32.58 |
| Machos Dorset | 51.84 | 20.36 | 50.73 | 34.42 |
| Promedio | 43.07 | 19.49 * | 43.81 | 29.86 * |
| | | < 0.05 | | < 0.05 |

Tabla 15. Porcentaje promedio de la evaluación Host Pajillas de los tratamientos de todos los machos.

| Control | Tratamiento Vitamina C | Tratamiento Vitamina E | Tratamiento Vitamina C + Vitamina E |
|---------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| 45.74 | 15.36 * | 40.74 | 25.51 * |
| | < 0.05 | | < 0.05 |

Con esto se observa que las muestras de los tratamientos disminuyeron notablemente su calidad después del proceso de congelación-descongelación; si analizamos la motilidad individual a lo largo del proceso congelación-descongelación debemos tener en cuenta que en semen fresco el promedio fue de 86.83%. Se observó que el tratamiento con Vitamina E fue el que mejor respuesta tuvo al descongelar disminuyendo la motilidad un 49.53% sobre el 86.83 general. Sin embargo la vitamina E no tuvo diferencias significativas con el grupo control y por ende no se puede decir que tuvo un efecto protector ni oxidativo en los espermatozoides. El grupo control disminuyó un 50.37%; esto muestra el buen

comportamiento de estos dos tratamientos a lo largo del proceso de descongelación, lo que se encuentra dentro del rango de motilidad individual deseada, pues según Rodríguez y Almenda (2007), al congelar el semen sólo alrededor del 50% de los espermatozoides mantienen su viabilidad. El tratamiento con vitamina C+E disminuyó la motilidad un 65.61% y el tratamiento con Vitamina C fue el que mayor disminución de motilidad presentó, siendo de 77.43%. Estos dos últimos tratamientos coinciden en que la medición del potencial de hidrógenos (pH) tienen un valor de 5 (cuadro 16) siendo ácidos por lo cual, como mencionan Alder y Melling (2000) no se encuentran dentro del pH deseado para supervivencia de los espermatozoides. Así mismo con el tratamiento con vitamina C y la combinación de vitamina C+E, se concluye que se ejerció un efecto contrario a la protección de la membrana celular ya que disminuyó considerablemente la motilidad de los espermatozoides al descongelar.

Cuadro 16. pH de los tratamientos

| | Control | Tratamiento con Vitamina C | Tratamiento con Vitamina E | Tratamiento combinación Vitamina C+ Vitamina E |
|----|---------|----------------------------|----------------------------|--|
| pH | 6 | 5 | 6 | 5 |

Para corroborar la autenticidad de los datos se evaluó el coeficiente de correlación entre las muestras con cada uno de los tratamientos y la prueba Host (donde la motilidad individual esta correlacionada con la prueba Host), se observó que todas las muestras tuvieron una correlación positiva (cuadro 17). El grupo control es el que mayor porcentaje de correlación tiene con un 69.5%, seguido por el tratamiento con vitamina C con un 67.5%, siendo lo porcentajes positivos más altos, el tratamiento con vitamina E se encuentra en un porcentaje medio con un 48.7% y el tratamiento combinación de ambas vitaminas tiene el porcentaje más bajo con un 26.9%.

Cuadro 17. Coeficiente de correlación entre la motilidad individual con los tratamientos y con Host.

| Host | Control | Tratamiento con Vitamina C | Tratamiento con Vitamina E | Tratamiento combinación Vitamina C+ Vitamina E |
|-------|---------|----------------------------|----------------------------|--|
| 0.733 | 0.695 | 0.675 | 0.487 | 0.269 |

Se utilizó vitamina C y vitamina E por separado y en combinación (ambos antioxidantes se encuentran tanto en el medio intra como extracelular) esperando reducir los procesos oxidativos en la membrana espermática de los espermatozoides observándolo en la motilidad individual. El resultado en este análisis fue que la combinación de antioxidantes C+E no tuvo un efecto significativo en el mantenimiento de la motilidad individual refiriéndonos como viabilidad del espermatozoide, esto contrasta con lo reportado por Castillo *et al* (2001) que determinaron que la combinación de antioxidantes disminuye significativamente el efecto de oxidación celular durante la congelación de semen.

En el caso de la vitamina C, está se caracteriza por expresar uno de los mecanismos de defensa contra las ROS; además de poder prevenir el daño oxidativo en macromoléculas semejantes al ADN, lípidos y proteínas por una protección antioxidante en fluidos biológicos de animales y seres humanos, pero no influencia el porcentaje de motilidad individual de los espermatozoides en almacenamiento, ya que provoca una reducción del pH, efecto que se observó en este estudio ya que fue el tratamiento con el porcentaje menor en cuanto a motilidad individual al descongelar. En semen de macho cabrío como reporta Castillo *et al* (2001), la vitamina C no mejoró la motilidad individual, lo cual es similar a lo encontrado en este estudio, ya que al adicionar sólo la vitamina C no hubo una diferencia en la motilidad de los espermatozoides cuando se compararon con el grupo control teniendo un efecto contraproducente en los espermatozoides.

La vitamina E al adicionarse demostró tener similitudes al grupo control, por lo cual no se puede decir que tuvo efectos adversos sobre la motilidad de los espermatozoides y su uso como aditivo en la preparación de diluyentes para la criopreservación de semen puede ser utilizado. En el estudio realizado por Castillo y colaboradores (2011) no se observaron diferencias significativas con esta vitamina ya que, como menciona Mathews (2001), la vitamina E necesita necesariamente la adición de vitamina C para poder ser aprovechada por las células y evitar la peroxidación lipídica.

6. CONCLUSIONES

Como sabemos la viabilidad del semen congelado es menor que la del semen fresco, la congelación causa apoptosis de las células espermáticas, fragmentación y mayor condensación del DNA espermático. Además, la estructura de la membrana espermática sufre cambios durante el periodo de equilibrio, así como en el proceso de congelación y descongelación, disminuyendo la proporción de espermatozoides vivos. Es por eso que se han adicionado antioxidantes al medio de dilución de semen de los machos reproductores para minimizar los daños causados por las ROS y evitar la peroxidación.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que no existe diferencia estadística significativa para decir qué tratamiento es mejor que otro durante el proceso de congelación de semen de carnero. En cuanto a la evaluación del porcentaje de motilidad individual, encontramos que el semen diluido con el tratamiento con Vitamina E fue el que mayor motilidad individual mantuvo durante el periodo de descongelación, seguido por el semen del grupo control, por ende no se puede decir que tuvo un efecto protector ni oxidativo en los espermatozoides.

Por otro lado, no se observó diferencia estadística significativa entre razas. Sin embargo, a pesar de la estacionalidad en las razas de lana, los machos Dorset y Suffolk tuvieron mejores porcentajes de motilidad al descongelar el semen colectado durante la época de primavera.

El estudio realizado por medio del Host reveló estar casi similar a los porcentajes proporcionados en la evaluación de motilidad masal al microscopio, por lo que ambas pruebas se encuentran correlacionadas.

En este estudio, la combinación antioxidante de vitaminas C + E no redujo el grado de oxidación de la membrana espermática de manera sinérgica, sin embargo, para futuras investigaciones podrían evaluarse estos tratamientos en semen fresco y observar si tienen un efecto inmediato para reducir el efecto oxidativo en un periodo corto de tiempo y así mejorar la calidad de las dosis en inseminaciones con semen fresco.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aisen E., 2004. Reproducción ovina y caprina. Primera edición. Editorial Intermédica. Buenos Aires, Argentina.

Alder M., Melling M., 2000. Manual para la práctica veterinaria. Practica ovina y caprina. Interamericana. Buenos aires, Argentina.

Angulo R., Mejía O., 2003. Memorias del curso teórico-práctico "Inseminación artificial en ovinos". México.

Blasi C., Bonet S., Campi S., Cisale H., González L., Suhevic J., 2001. Comparación entre distintos tiempos de lectura en el test de endósmosis. Veterinarias UBA. Universidad de Girona.

Castillo H., Córdova A., Hicks J., Membrillo A., Valencia J., 2011. Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. México.

Córdova A., Hicks J., Martínez V., Membrillo A., Olivares M., Valencia J., 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Asociación Interciencia. Venezuela.

Cuéllar J., Tórtora J., Trejo A., Román P., 2012. La producción ovina mexicana particularidades y complejidades. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Cuento M., García V., Gibbons A., Wolff M., 1993. Manual: Obtención, conservación y procesamiento del semen ovino. Grupo de reproducción INTA Bariloche. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Centro Regional Patagonia Norte.

Daza J., 1994. Inseminación artificial y andrología bovina. Editorial Multimpresos. Colombia.

Evans G., Maxwell W., 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras, Editorial Acriba S.A., Zaragoza. España.

Fernández A., 2005. Manual de inseminación artificial por vía cervical en ovinos. Secretariado Uruguayo de la Lana. Uruguay.

Gillan L., Maxwell W., 1999. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of Reproduction and Fertility* Volume 54: 271-283.

Hafez E. Hafez B., 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7° Edición. Editorial McGrawHill- Interamericana. México.

Helman M., 1975. Ovinotecnia: Razas, Producción, Comercio e Industria. Segunda Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina.

Hicks, J., 2002. Bioquímica. 1° Edición. Editorial McGraw Hill. México.

Jimenez J., 2009. Condición corporal de ganado ovino y caprino. México.

Mathews C., Van Holde K. 2001. Bioquímica. 2° Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. España.

Maxwell W., Watson P., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* Volume 42: 55-65.

Mejía O., 2003. Memorias del curso teórico-práctico "Inseminación artificial en ovinos". México.

Muñoz G., 2005. Manual de producción en ovinos y caprinos. Venezuela.

Salamon S., 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España.

Sauveur S., 1991. El huevo para consumo: bases productivas. España.

Watson P., 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* Volume 60-61: 481-492.

Wong D. 1995. Química de los alimentos: mecanismos y teoría. 1° Edición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza. España.