



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia
Programa de Maestría en Producción Animal

INFLUENCIA DEL DILUTOR, RAZA Y MES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN OVINO

TESIS QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

DELFINO GARCÍA BECERRIL



DIRECCIÓN GENERAL
DEPTO. DE SERVICIOS ESTUDIALES
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Junio del 2002

Chapingo, Estado de México.

BIBLIOTECA CENTRAL U. A. CH.

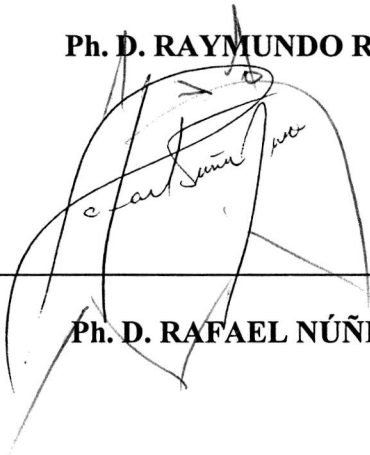
Bib. 97609

**INFLUENCIA DEL DILUTOR, RAZA Y MES EN LA CRIOPRESERVACIÓN
DEL SEMEN OVINO**

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Delfino García Becerril autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Producción Animal estuvo constituido por:

PRESIDENTE: Raymundo Rangel S.

Ph. D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: 

Ph. D. RAFAEL NÚÑEZ DOMÍNGUEZ

ASESOR: 

Ph. D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

A.39386

**INFLUENCIA DEL DILUTOR, RAZA Y MES EN LA CRIOPRESERVACIÓN
DEL SEMEN OVINO**

Tesis realizada por Delfino García Becerril bajo la dirección del Comité Asesor
indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el
grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

DIRECTOR: Raymundo Rangel S.

Ph. D. RAYMUNDO RANGEL SANTOS

ASESOR: Rafael Núñez Domínguez

Ph. D. RAFAEL NÚÑEZ DOMÍNGUEZ

ASESOR: Raymundo Rodríguez de Lara

Ph. D. RAYMUNDO RODRÍGUEZ DE LARA

DEDICATORIA

A mis padres: Cándido García Zúñiga e Hilaria Becerril Miranda. Como muestra de agradecimiento y apoyo incondicional que siempre me han brindado.

A mis hermanos y hermanas: Bernabé, Yolanda, Silvia, José Juan, Francisco y Armando. Por estar siempre a mi lado y brindarme su cariño y amistad

A mis cuñados: Raymundo y muy en especial a Lamberto Orozco Roldan. Por el apoyo que siempre me a brindado, así como consejos y enseñanzas adquiridas a lo largo de su vida.

A mis sobrinos: Grisel, Raymundo, Dana, Diana, Elizabeth y Sandra.
Por los momentos de esparcimiento que hemos convivido.

A todos mis familiares: Que de una u otra manera han alentado mis deseos por continuar adelante, y muy en especial a mi tía Cruz Miranda.

A todos mis compañeros y amigos. Los cuales han contribuido con sus deseos y palabras de aliento en la conclusión del presente trabajo, en especial a Jorge A. Gutiérrez y Gerardo Jaramillo que han aportado algunas opiniones valiosas para este trabajo.

A todas las personas: Que de manera directa o indirecta han participado en el feliz termino de esta obra.

“No te guíes por lo que ves, aunque lo que veas te parezca hermoso; lo que es verdaderamente bello no se ve ni se toca” (Anónimo).

“El hombre superior es cortés, pero jamás rastrero, mientras que el hombre vulgar es descortés y rastrero” (Confucio).

AGRADECIMIENTOS

Al postgrado en producción animal de la Universidad Autónoma Chapingo, por brindarme la oportunidad de ingresar a su programa de maestría.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo brindado en la realización de mis estudio de maestría.

Al Ph. D. Raymundo Rangel Santos por confianza e interés, así como su acertada dirección de este trabajo.

Al Ph. D. Rafael Núñez Domínguez por su interés de que se presentara un buen trabajo de tesis, así como por su invaluable apoyo en la parte estadística de esta investigación.

Al Ph. D. Raymundo Rodríguez de Lara por disponibilidad para la realización de este trabajo.

Al personal académico, personal administrativo y compañeros por el apoyo brindado.

Al grupo AUSTECA S. A y Moléculas Finas de México S. A. de C. V. Por su ayuda en la aportación de reactivos y la disponibilidad de los animales para realizar la investigación.

DATOS BIOGRÁFICOS

1. DATOS PERSONALES

NOMBRE	Delfino García Becerril
FECHA DE NACIMIENTO	24 de diciembre de 1971
LUGAR DE NACIMIENTO	Soyaniquilpan de Juárez Edo. México
PROFESIÓN	Ingeniero Agrónomo Zootecnista

2. DESARROLLO ACADEMICO

1978 - 1984	Escuela Primaria Francisco Villa San Miguel de la Victoria Municipio de Jilotepec Estado de México.
1984 - 1987	Escuela Secundaria Oficial No. 59 Dr. Jorge Jiménez Cantú, Sn. Fco. Soyaniquilpan de Juárez Estado de México.
1987 - 1990	Centro de Bachillerato Tecnológico industrial y de servicios No. 180 (CBTis 180), Jilotepec Estado de México.
1992 - 1997	Licenciatura en el departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo Estado de México.
1999 - 2000	Maestría en producción Animal en el departamento e Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo Estado de México.

3. EXPERIENCIA PROFESIONAL

1992 - 1998	Encargado del área de ventas de la Librería y Papelería Orozco S. A de C. V.
2001 a la fecha	Asesor externo en reproducción en pequeños rumiantes

RESUMEN

INFLUENCIA DEL DILUTOR, RAZA Y MES EN LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN OVINO

Delfino García Becerril,¹ Raymundo Rangel Santos,² Rafael Núñez Domínguez,² y Raymundo Rodríguez de Lara²

El propósito de esta investigación fue estimar la influencia del dilutor, la raza y el mes sobre la incidencia de daños acrosomales (DA) y motilidad postdescongelación (MPD). Los dilutores utilizados fueron el Triladyl de carácter comercial y el dilutor preparado en el laboratorio de carácter experimental. Se utilizaron 5 machos, 3 Dorper y 2 Mutton Merino, durante los meses de octubre a julio del 2000. Los DA se evaluaron utilizando el colorante comercial spermac. La MPD se evaluó mediante el porcentaje de espermatozoides con motilidad rectilínea y progresiva. Los datos se analizaron mediante el procedimiento GLM del paquete computacional SAS. No se encontró efecto significativo del dilutor ($P>0.20$), ni de la raza ($P>0.80$) en la incidencia de daños acrosomales. Sin embargo, el mes resultó altamente significativo ($P<0.002$), observándose la mayor incidencia de daños acrosomales en junio y julio (29 y 28.2%, respectivamente). La MPD no fue afectada por el dilutor ($P>0.20$), mientras que el mes resultó significativo ($P<0.001$), encontrándose que la mayor motilidad se presentó en enero (52%) y la menor en junio (44%) y julio (42%). El efecto de la raza resultó significativo ($P<0.080$), donde los machos Mutton Merino presentaron mayor MPD comparativamente con los machos Dorper (48 vs 46%, respectivamente).

Palabras Clave: Dilutor, criopreservación, daños acrosomales, motilidad postdescongelado.

1. Maestro en Ciencias en Producción Animal del departamento de Zootecnia.

2. Profesores Investigadores del Postgrado en Producción Animal del Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5 Chapingo, Estado de México. CP 53230. Teléfono : 2-16-21 Ext. 16-21 Fax: 2-16-21

SUMMARY

INFLUENCE OF DILUENT, BREED AND MONTH ON THE CRIOPRESERVATION OF RAM SEMEN

Delfino García Becerril ¹, Raymundo Rangel Santos, ² Rafael Núñez Domínguez, ² y Raymundo Rodríguez de Lara ²

The aim of the study was to estimate the influence of diluent, breed and month on the incidence of acrosomal damage (AD) and posthaw motility (PTM). The diluents used were Triladyl, a commercial diluent, and experimental diluent prepared in the laboratory. Five rams were used: 3 Dorper and 2 Mutton Merino, from October of 1999 to July 2000. The AD was determined using the spermac commercial stain. The PTM was evaluated through the percentage of spermatozoa with normal and progressive motility. The data were analyzed through GLM procedure contained in the SAS package. There was no significant effect of diluent ($P>0.20$) and breed ($P>0.80$) on the incidence of acrosomal damage. However, there was a highly significant effect of month ($P<0.002$), recording the highly incidence of acrosomal damage in June and July (29 and 28.2%, respectively). The PTM was not affected by the diluent ($P>0.20$), while the effect of month was significant ($P<0.001$), recording the highest motility in January (52%) and the lowest in June (44%) and July (42%). The effect of breed was also significant ($P<0.08$), where the Mutton Merino rams registered higher PTM compared to Dorper rams (48 vs 46%, respectively).

Key words: Diluent, criopreservation, acrosomal damage, posthaw motility.

1. Maestro en Ciencias en Producción Animal del departamento de Zootecnia.

2. Profesores Investigadores del Postgrado en Producción Animal del Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco Km 38.5 Chapingo, Estado de México. CP 53230. Teléfono : 2-16-21 Ext. 16-21 Fax: 2-16-21

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE GRÁFICAS	vii
ÍNDICE DEL APÉNDICE	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
3. HIPÓTESIS	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. Antecedentes históricos de la criopreservación	5
4.2. Aspectos generales de la criopreservación	6
4.3. Sustancias crioprotectoras	7
4.3.1. Glicerol	8
4.3.2. Yema de huevo	9
4.3.3. Otros crioprotectores	10
4.4. Daños causados por el congelamiento y descongelamiento	11
4.4.1. Alteraciones morfológicas y/o estructurales	11
4.4.2. Alteraciones bioquímicas	13
4.4.3. Alteraciones funcionales	14
4.5. Espermatogénesis	17
4.6. Factores que afectan la calidad del semen	17
4.6.1. Época del año	18
4.6.2. Nutrición	19
4.6.3. Temperatura	19

4.6.4. Edad	20
4.6.5. Líbido	20
4.6.6. Raza	21
4.7. Dilutores utilizados para conservar semen ovino	22
4.7.1. Propiedades de los dilutores	22
4.7.2. Principales dilutores utilizados	23
4.7.3. Diluyentes a base citrato-azúcar	24
4.7.4. Diluyentes a base de leche	24
4.7.5. Diluyentes a base de sacarosa y rafinosa	25
4.7.6. Diluyentes a base de Tris (hidrxi-metil-amino-metano)	26
4.7.7. Otros diluyentes	26
4.8. Tipos de semen a utilizar	27
4.8.1. Semen fresco	27
4.8.2. Semen refrigerado	27
4.8.3. Semen congelado	29
4.9. Obtención y análisis de la muestra	32
4.10. Control hormonal del ciclo estral de la hembra	33
4.11. Factores que afectan la fertilidad y prolificidad de la hembra	34
4.11.1. Raza	34
4.11.2. Época del año	35
4.11.3. Edad	35
4.11.4. Condición corporal	36
4.11.5. Tipo de inseminación	36
5. MATERIALES Y MÉTODOS	38
5.1. Localización	38
5.2. Animales y manejo	38
5.3. Tratamientos	38

5.4. Extracción del semen	39
5.5. Manejo y valoración de la muestra	40
5.6. Dilución de la muestra	43
5.7. Conservación del semen	43
5.7.1. Enfriamiento del semen	44
5.7.2. Envasado del semen	44
5.7.3. Congelamiento del semen	45
5.7.4. Descongelamiento y evaluación del semen	45
5.7.5. Determinación del estado acrosomal	46
5.7.6. Variables de respuesta	48
5.7.7. Análisis estadístico	48
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1. Fase de predilución	50
6.1.1. Fase predilución por mes	50
6.1.2. Fase predilución por época	52
6.2. Fase de postdescongelación	56
6.2.1. Fase postdescongelación por mes	56
6.2.2. Fase postdescongelación por época	63
7. CONCLUSIONES	68
8. IMPLICACIONES	68
9. LITERATURA CITADA	69
10. APÉNDICE	80

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Algunas características de los principales crioprotectores utilizados en el congelamiento de semen	11
Cuadro 2. Ventajas y desventajas del uso de semen líquido y congelado	28
Cuadro 3. Resultados de inseminación artificial por laparoscopia utilizando semen congelado	29
Cuadro 4. Fertilidad obtenida con varios dilutores utilizados en el congelamiento de semen ovino	30
Cuadro 5. Características a evaluar de un eyaculado ovino	32
Cuadro 6. Valoración de la motilidad masal de un eyaculado ovino	32
Cuadro 7. Ingredientes utilizados en la elaboración de los dilutores Triladyl (comercial) y preparado (experimental)	38
Cuadro 8. Espermatozoides normales y afectados por la criopreservación a nivel acrosoma	46
Cuadro 9. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución considerando el efecto de mes	50
Cuadro 10. Promedios mensuales para las características volumen, color, normalidad, concentración, viabilidad y motilidad del semen ovino	52
Cuadro 11. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución considerando el efecto de época	53
Cuadro 12. Promedios por época para las características volumen, color, normalidad, concentración, viabilidad y motilidad del semen ovino	55
Cuadro 13. Análisis de varianza de la variable daños acrosomales considerando el efecto de mes	57
Cuadro 14. Análisis de varianza de la variable motilidad postdescongelado considerando el efecto de mes	60
Cuadro 15. Análisis de varianza para de daños acrosomales considerando el efecto de época	64
Cuadro 16. Análisis de varianza de motilidad postdescongelado considerando el efecto de época	66

ÍNDICE DE GRÁFICAS

		Pág.
Gráfica 1.	Porcentaje de la motilidad espermática predilución de machos Dorper y Mutton Merino en función del mes	51
Gráfica 2.	Porcentaje de la motilidad espermática predilución en función de la raza y época	54
Gráfica 3.	Porcentaje de daños acrosomales de los espermatozoides en semen descongelado utilizando los dilutores Triladyl y Experimental	58
Gráfica 4.	Porcentaje de daños acrosomales en los espermatozoides postdescongelación a través de los meses	59
Gráfica 5.	Porcentaje de daños acrosomales de espermatozoides en semen descongelado por raza del semental	60
Gráfica 6.	Porcentaje de motilidad postdescongelación de espermatozoides de semen ovino a través de los meses	61
Gráfica 7.	Porcentaje de motilidad postdescongelado de espermatozoides ovinos de acuerdo con la raza del semental	62
Gráfica 8.	Porcentaje de motilidad espermática después del descongelamiento de semen ovino utilizando los dilutores Triladyl y Experimental	63
Gráfica 9.	Porcentaje de daños acrosomales de espermatozoides en semen descongelados de acuerdo a la época y raza del semental	65

ÍNDICE DEL APÉNDICE

	Pág.
Cuadro 1. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución en función de la época	80
Cuadro 2. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución en función del mes	80
Cuadro 3. Análisis de varianza para DA en función de la época	80
Cuadro 4. Análisis de varianza para DA en función del mes	81
Gráfica 1. Efecto del mes sobre la motilidad espermática predilución en ovinos	81
Gráfica 2. Motilidad predilución del semen ovino en época reproductiva y no reproductiva	81
Gráfica 3. Motilidad espermática predilución de acuerdo a la raza	82

1. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial constituye una técnica que ha permitido el avance acelerado en los programas de reproducción y mejoramiento genético (Maxwell y Watson, 1996). En estos programas influyen de manera importante factores específicos de la hembra, del macho y de la técnica de inseminación. La tasa de preñez y el número de corderos nacidos se utilizan como parámetros para evaluar estos programas (Halber *et al.*, 1990). La necesidad de cubrir o fertilizar un gran número de hembras con semen de machos genéticamente superiores, requiere de transportar el semen a puntos distantes del lugar de colección, hasta los ranchos donde se realiza la inseminación artificial. Lo anterior aunado a que necesariamente los mismos carneros se tienen que utilizar dentro y fuera de la época reproductiva, estimula en gran medida la investigación para conservar el esperma bajo condiciones artificiales (Salamon y Maxwell, 2000).

Ante la necesidad de conservar el semen por largo tiempo, se desarrollaron las técnicas de conservación de semen líquido y congelado; sin embargo, cuando se utiliza semen congelado en los programas de inseminación transcervical, los porcentajes de gestación son bajos. Lo anterior se ha atribuido a fallas en la fertilización de los oocitos, lo cual se encuentra relacionado con la alteración en la movilidad de los espermatozoides y a daños en el acrosoma (Pursel *et al.*, 1974; Aalsoth y Saacke, 1985; Castañeda *et al.*, 1996; Maxwell y Watson, 1996; Zhao y Buhr, 1996). La búsqueda de nuevas alternativas para mejorar estos porcentajes de gestación y fertilidad ha sido la inseminación intrauterina por laparoscopia y el perfeccionamiento de la criopreservación del semen (Maxwell y Watson, 1996).

Los programas de inseminación artificial a largo plazo hacen estrictamente necesario la preservación de los espermatozoides bajo condiciones artificiales por extensos periodos de tiempo (Gorlach, 1999), lo cual se logra mediante métodos que reduzcan el metabolismo de los espermatozoides (congelamiento a -196°C en nitrógeno líquido), dado que a esta temperatura es prácticamente imposible cualquier movimiento molecular, con lo cual se logra prolongar su vida fértil (Salamon y Maxwell, 1995b). La reducción e incremento de la temperatura, lo cual involucra el congelado y descongelado del semen, inevitablemente reduce la proporción de espermatozoides móviles y viables (Parks y Graham, 1992), lo anterior es causado por una serie de daños de tipo estructural, bioquímico y funcional (Salamon y Maxwell, 1995b).

Los diluyentes utilizados en la conservación del semen ovino incluyen sustancias de naturaleza muy diversa (Maxwell y Watson, 1996). Estas sustancias deben cumplir con requisitos como pH, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Además de contener una fuente de energía para el espermatozoide, no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y sobre todo deben proporcionar a la célula espermática protección frente a los efectos adversos del enfriamiento, congelación y descongelación (Mann, 1964; Molina *et al.*, 1994).

En nuestro país no se tienen líneas de investigación que consideren aspectos como los de formulación y producción a nivel comercial de extensores para la preservación del semen ovino, así como resultados que avalen el éxito de los mismos. Los alcances que se persiguen en este trabajo son los de determinar el posible éxito o fracaso de la formulación y producción de un extensor para semen ovino el cual se comparará con

otro de carácter comercial mediante pruebas de laboratorio. Dentro de las principales limitantes se pueden mencionar la disponibilidad de machos de alto potencial genético de razas productoras de carne las cuales tengan una gran solicitud en el mercado nacional, así como de productores que tengan la disponibilidad de facilitar sus animales para realizar investigación.

2. OBJETIVOS

Evaluar a nivel de laboratorio dos dilutores utilizados en la criopreservación de semen de ovinos.

Evaluar a nivel laboratorio el efecto de la raza, mes y época del año sobre las características predilución y postdescongelación de semen ovino.

3. HIPÓTESIS

Las hipótesis del estudio son:

El tipo de dilutor no afecta las características morfológicas y estructurales de los espermatozoides.

La raza, mes y época del año no afectan las características predilución y postdescongelación del semen ovino.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Antecedentes históricos de la criopreservación

Los primeros estudios realizados para conservar los espermatozoides mediante bajas temperaturas fueron realizados por Spallanzani (1776), quien conservando espermatozoides de mamíferos en frascos pequeños de vidrio y mantenidos a temperaturas bajo cero grados centígrados en nieve, para posteriormente exponerlos a temperaturas ambientales para su descongelado observó motilidad.

Salomon y Maxwell (1995a) realizan una amplia revisión mediante la cual se aportan datos históricos sobre el proceso de la criopreservación de células vivas. En los inicios del siglo XX (1907) Ivanov conservó espermatozoides de caballo por una semana congelados a -15°C , pero no hubo motilidad después del descongelado. Jahnel en 1938, demostró la posibilidad de congelar semen humano en hielo seco (-79°C), y nitrógeno líquido (-196°C) o helio líquido a (-296°C).

El uso de algunos agentes o sustancias que ayudaran al proceso de congelación fue investigado por varios autores. Los primeros reportes sobre el uso de alguna de estas sustancias crioprotectoras consta de 1908, cuando Maximov observó que tanto tejidos como células vegetales sobrevivieron al someterse a congelación a -22°C cuando se encontraban en una solución con pequeñas cantidades de glicerol. Posteriormente Later *et al.* (1937) utilizando una solución de glicerol 1M (9.2%), pudieron congelar semen de conejo, cerdo, toro y carnero con poca sobrevivencia, lo cual fue atribuido a un efecto tóxico de las altas concentraciones del glicerol.

El uso de algunas otras sustancias como crioprotectores también fueron investigadas. Hadapp (1938) vitrificó espermatozoides de rana en una solución con una alta concentración de azúcar (40%). Parkes en (1945) al utilizar concentraciones moderadas de azúcar obtuvo una buena proporción de espermatozoides móviles de humano después del descongelado. Polge (1949) reportó las propiedades protectoras del glicerol, lo cual dio un gran impulso a la crío-preservación del semen de los mamíferos. En 1950 Polge y Smith, perfeccionaron la metodología para el congelamiento del semen de bovinos, la cual, generalmente es utilizada para el congelamiento de semen de otras especies con algunas modificaciones hasta la época actual. Así en 1955 Emmens y Blackshaw, al inseminar 679 borregas solo obtuvieron un 5% de gestaciones al utilizar semen congelado a -79°C . Golkin (1954) utilizando semen diluido en un extensor a base de yema de huevo, citrato de sodio, glucosa y glicerol adicionado por diálisis, conservado por 30-50 días obtuvieron 19 y 43% de fertilidad. De igual manera el descubrimiento del glicerol como un excelente agente crioprotector marcó un gran avance en el proceso de congelamiento del semen de muchas especies, lo anterior se realizó a finales de la década de los 40s (Holt, 2000).

4.2. Aspectos generales de la criopreservación

El objetivo de la criopreservación es la interrupción del metabolismo celular por un tiempo determinado arbitrariamente, con lo cual los espermatozoides se mantienen en una anabiosis artificial (Gorlach, 1999). Los principios de la criopreservación son los mismos para todas las células vivas, siendo el aspecto más importante de este proceso la eliminación del agua del interior de la célula antes de congelar (Gordon, 1999). Además, el momento más crítico de la criopreservación del semen se considera al inicio de la

congelación y al momento del descongelado, puesto que es aquí donde se presentan un sin número de procesos físico-químicos regidos por las diferencias de temperatura y transporte de agua entre las células y el medio (Gorlach, 1999). Estudios recientes sobre congelamiento de semen, mencionan que los espermatozoides que sobreviven al congelado y descongelado, se ven alterados en sus propiedades estructurales de la membrana plasmática, lo cual se semeja a un estado de capacitación prematura y reacción acrosomal (Watson, 1995).

El acrosoma del espermatozoide es una estructura vesicular que contiene una gama amplia de enzimas líticas necesarias para la fertilización, por lo cual la integridad del acrosoma es requisito indispensable para que se de la fecundación (De las Haras *et al.*, 1996; Valcárcel *et al.*, 1997). El acrosoma se localiza en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, la pérdida o desintegración del mismo, se da como resultado del enfriamiento y congelación. Es de suma importancia conocer el porcentaje de alteraciones del acrosoma durante el proceso de congelado y descongelado y para ello existen varias técnicas de carácter enzimático y de colorantes vitales como la triple tinción y el colorante de giemsa entre otros (Watson, 1975; Sukardi *et al.*, 1997).

4.3. Sustancias crioprotectoras

Las sustancias que protegen a los espermatozoides de los mamíferos durante los procesos de congelación y descongelación se denominan sustancias crioprotectoras (Salamon y Maxwell, 1995a). Sin embargo, es conocido que dichas sustancias pueden tener efectos negativos sobre las células espermáticas. Tomando en consideración su viabilidad y fertilidad, las sustancias crioprotectoras se pueden clasificar en dos grupos:

las de rápida penetración al interior de la célula, como son; dimetil-sulfoxido (DMSO), etilenglicol (EG) y propilenglicol (PG). En el otro grupo se incluyen las sustancias de lenta penetración celular, las cuales presentan mayor peso molecular como el glicerol (Molina *et al.*, 1994; Watson, 2000).

4.3.1. Glicerol

El glicerol es la sustancia crioprotectora más comúnmente utilizada para adicionar a los dilutores con la finalidad de conservar semen frío o congelado de la mayoría de las especies de interés zootécnico (Salamon y Maxwell, 2000). El glicerol al igual que otras sustancias que son capaces de penetrar la barrera de la membrana celular, reducen los daños causados por la formación de cristales de hielo en el citoplasma celular del espermatozoide, ya que baja el grado de disociación de las sales, bajando la presión osmótica del medio de congelamiento, con lo cual disminuye el grado de hipertonidad del medio que rodea a la célula. Sin embargo, aun así provoca la salida de líquido intracelular (Salamon y Maxwell, 1995a). La adición de glicerol al semen diluido antes de la congelación, baja el punto de congelación del agua, lo anterior ocasiona una reducción de la cristalización y cambios osmóticos bruscos. El glicerol también deshidrata parcialmente la célula espermática, reduciendo aun más el riesgo de cristalización intracelular (Salamon y Maxwell, 2000).

Generalmente para la congelación de semen de carnero, se utilizan los métodos convencionales al utilizar dilutores hipertónicos. Las óptimas concentraciones a utilizar son de 6 a 8% (v/v), sin embargo, varios investigadores mencionan que el glicerol puede ser tóxico para el espermatozoide (Molina *et al.*, 1994), lo cual reduce su capacidad

fertilizante. Es esto lo que limita la inclusión de altos niveles de glicerol en el medio de congelación, pero además pueden mencionarse otros factores como la tasa de enfriamiento y congelación, la composición del dilutor y el método de adición del glicerol (Salamon y Maxwell, 1995a). De la misma manera en otras investigaciones también se menciona que las concentraciones de glicerol se ven influenciadas por los niveles de yema de huevo en el dilutor, ya que al incrementar la concentración de yema de huevo se puede reducir la concentración de glicerol (Watson, 1995).

4.3.2. Yema de huevo

La yema de huevo generalmente no se considera como un agente crioprotector, pero debido a sus características y el papel que juega en la protección de la célula espermática es posible considerarla como tal. La yema de huevo mantiene la motilidad, integridad del acrosoma y además la integridad de la membrana de la mitocondria y del citoplasma del espermatozoide (Salamon y Maxwell, 1995a). Además, es considerado como un buffer natural, ya que en su presencia las células espermáticas, son capaces de soportar dilutores tanto hipertónicos como hipotónicos. Es un elemento que protege la membrana plasmática y del acrosoma durante el congelamiento, lo cual es atribuido a las lecitinas y lipoproteínas de baja densidad y alto peso molecular; por otra parte se piensa que estimula el sistema enzimático de la misma célula (Sansone *et al.*, 2000).

La cantidad de yema de huevo generalmente utilizada en el medio de congelación va de un 15 a un 30% (v/v), dependiendo de varios factores como la composición del dilutor, concentración de glicerol, así como la especie animal cuyo semen se va a congelar. La

motilidad espermática no varía significativamente cuando se adiciona una u otra concentración (Vishwanath y Shannon, 2000).

4.3.3. Otros crioprotectores

La utilización de otros agentes con funciones crioprotectoras tienden a ser utilizados en el congelamiento de semen ovino, pero ninguno a dado mejores resultados que el glicerol (Salamon y Maxwell, 1995a). Los agentes potenciales a utilizar son el dimetil-sulfóxido, etilenglicol, propilenglicol que pertenecen al grupo de rápida penetración de la membrana, debido a su bajo peso molecular si se comparan con el glicerol (Molina *et al.*, 1994). En el cuadro 1 uno se presentan algunas características de los principales crioprotectores (Clark *et al.*, 1984).

El dimetil-sulfoxido y el etilenglicol son utilizados con mucha frecuencia para el congelamiento de embriones ovinos. Molina *et al.* (1994) mencionan que el DMSO es un agente que muy rápidamente penetra la membrana celular del espermatozoide de carnero, con la cual protege al espermatozoide durante el enfriamiento, pero es altamente tóxico y lo anterior provoca poca sobrevivencia del espermatozoide. El etilenglicol es frecuentemente utilizado en la vitrificación de embriones de varias especies con buenos resultados. Por otra parte el propilenglicol, es más utilizado para minimizar la formación de cristales de hielo en diversos compuestos.

Cuadro 1. Algunas características de los principales crioprotectores utilizados en el congelamiento de semen

Crioprotector	Estructura química	Viscosidad	Penetrabilidad celular	Constante dieléctrica
Glicerol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH-CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	1400	0.6	46.5
Etilenglicol	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	25	3.4	41.4
Propilenglicol	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	60	1.8	27.3

Fuente: Clark *et al.* (1984)

4.4. Daños causados por el congelamiento y descongelamiento

El proceso de la criopreservación acarrea consigo un gran número de daños tanto de tipo estructural (alteraciones morfológicas), bioquímico y funcional, ocasionados por: Cambios en la temperatura, cambios en la presión osmótica debido a la concentración del crioprotector y debido a la formación y disolución de cristales de hielo en forma intra y extracelular.

4.4.1. Alteraciones morfológicas y/o estructurales

Los daños estructurales generalmente ocurren en las membranas de la célula, mitocondria y del acrosoma, También pueden presentarse alteraciones en los filamentos de la cola del espermatozoide, los cuales por lo regular son poco perceptibles después del congelado y descongelado (Salamon y Maxwell, 2000).

Es bien conocido que los cambios en la temperatura, ya sean lentos o rápidos a los que son sometidos los espermatozoides de los mamíferos entre los 30 y 0 °C, provocan una

serie de daños letales para la célula, los cuales son influenciados por la tasa de enfriamiento, intervalos de temperatura y rangos de temperatura (Watson, 1995). Este fenómeno generalmente es conocido como “shock por frío”.

El enfriamiento causa una serie de trastornos en la capa lipídica de la mitocondria y membrana celular, al parecer dichos disturbios ocurren en los rangos de temperatura de enfriamiento de los 15 a 5 °C (Watson, 2000). Sin embargo, otros autores como (Robertson y Watson, 1986; Parks y Graham 1992; Holt, 1994; Curry *et al.*, 1994) mencionan que este rango va de los -4 a -30 °C, Por otra parte Byrne *et al.* (2000), mencionan que el rango es más amplio y va de los -15°C a -60 °C, lo cual es debido al efecto de los crioprotectores.

La sensibilidad de los espermatozoides al shock por frío está determinado por la especie, características del individuo y las características propias del eyaculado (Byrne *et al.* 2000; Yoshida, 2000), en este sentido, los espermatozoides de conejo, cerdo, borrego y macho cabrío son más sensibles a los daños por enfriamiento que los espermatozoides de toro. Salamon y Maxwell (2000), mencionan que de la gran proporción de espermatozoides que presentan motilidad después del descongelado (40-60%), solo un 20 a 30% de este porcentaje no presenta ninguna alteración de cualquier tipo. Un espermatozoide puede ser móvil, pero estar dañado (Salamon y Maxwell, 1995a). Los daños estructurales más comunes ocurren en las membranas del citoplasma y del acrosoma, las cuales son más sensibles que las membranas del núcleo y del sistema locomotor (Yoshida, 2000). El acrosoma, es una estructura en forma de gorra que recubre la parte anterior de la cabeza en el espermatozoide (Hathaway y Hartree, 1963).

Esta estructura contiene una serie de enzimas líticas necesarias para la fertilización las cuales son; la acrosina, que es la enzima de carácter protéico más abundante y la hialuronidasa (De las Haras *et al.*, 1996). Estas enzimas son liberadas mediante un proceso de fusión y vesiculación de las dos membranas más externas de la cabeza del espermatozoide (membrana plasmática y membrana acrosómica externa), lo cual es conocido como *reacción acrosómica* (Hunter, 1987). La reacción acrosómica se presenta inmediatamente después de la capacitación del espermatozoide, la cual consiste en la remoción de los componentes de las membranas originales del epidídimo por parte del espermatozoide (Steinholt *et al.*, 1991).

La integridad del acrosoma es un requisito fundamental para que se de la fertilización, pero al perderse la permeabilidad del acrosoma puede acelerarse la salida del contenido acrosomal e inhibir la penetración del oocito por el espermatozoide (De las Haras *et al.*, 1996). Una serie de técnicas han sido desarrolladas para determinar la integridad del acrosoma, directamente con el uso de un microscopio de contraste de fases (Watson, 1991) o después de la tinción de un frotis con diversos colorantes (Saacke *et al.*, 1968; Watson, 1975; Steinholt *et al.*, 1991; Christensen *et al.*, 1994; Tamuli y Watson, 1994; Edward *et al.*, 1995; Way *et al.*, 1995; Valcársel *et al.*, 1997).

4.4.2. Alteraciones bioquímicas

Es claro que los daños ocasionados por el enfriamiento, afectan de sobremanera la bicapa lipídica de la membrana celular del espermatozoide, pero también pueden afectarse las estructuras proteicas de los acarreadores de la membrana, los cuales sufren

alteraciones de tipo funcional en el transporte de iones hacia el interior o exterior de la misma membrana (Watson, 2000).

Los lípidos son uno de los constituyentes más importantes de la membrana celular, dentro de los cuales un 65-70% son del tipo de los fosfolípidos, los cuales tienen una estructura muy especial determinada por un éter unido a un ácido graso insaturado. Las características de los fosfolípidos le confieren a la membrana propiedades de gran estabilidad y fluidez (Holt, 2000). Se considera que los efectos adversos del enfriamiento al cual se someten los espermatozoides antes y durante el congelamiento tienen un efecto desestabilizador en los fosfolípidos, cambiando su fluidez natural y causando una condensación en forma de gel (fase de transición), lo que ocasiona una mala permeabilidad (Holt, 2000). Watson (2000) menciona que con el enfriamiento se incrementa la permeabilidad de la membrana, y con esto se puede incrementar de igual manera la fuga o acceso de sustancias, pero además se descompensa el efecto regulador del calcio y la bomba Na^+/K^+ .

4.4.3. Alteraciones funcionales

La adición o remoción de la sustancia crioprotectora ocasiona una gama de trastornos de carácter osmótico causados por alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide (Watson, 2000). Holt (2000), menciona que las sustancias crioprotectoras pueden clasificarse de acuerdo a su sitio de acción en :

- a)** Sustancias que son capaces de penetrar al interior del citoplasma celular, dentro de las cuales encontramos al glicerol, metanol, etilenglicol, propilenglicol y dimetil-sulfóxido entre otras.

b) Todas aquellas sustancias que no pueden penetrar al interior del citoplasma celular, debido a su alto peso molecular y gran tamaño. En este grupo se encuentran los disacáridos, trisacáridos y goma arábica, además de la yema de huevo.

Generalmente el crioprotector más utilizado es el glicerol, cuyas concentraciones han sido muy estudiadas (Molina *et al.*, 1994; Salamon y Maxwell, 1995b). La concentración del crioprotector depende del dilutor y especialmente de la presión osmótica. Esta misma característica puede verse influenciada por los niveles de yema de huevo a utilizar, debido a que si se incrementan los niveles de yema de huevo se puede reducir los requerimientos en cuanto a la concentración de glicerol (Salamon y Maxwell, 1995b). La concentración del crioprotector en altos o bajos niveles, afecta en gran medida la sobrevivencia de los espermatozoides, los cuales a su vez son muy susceptibles a los efectos tóxicos de los crioprotectores en altas concentraciones (Molina *et al.*, 1994; Watson, 2000).

Los daños causados por la formación y disolución de cristales de hielo durante el congelamiento y descongelamiento del semen son acompañados por cambios en la presión osmótica de la fracción de congelamiento. Cuando la fracción de congelamiento es enfriada cerca del punto de congelación, los cristales de hielo se forman debido a la cristalización del agua presente dentro y fuera de la célula (Watson, 2000). La proporción de agua que se cristaliza y se convierte en hielo depende de la presión osmótica de la solución y de la temperatura (Holt, 2000).

Los espermatozoides pueden dañarse durante la criopreservación, el descongelamiento, o ambos, ya sea por la formación de grandes cristales de hielo intracelular o por el aumento en la concentración intracelular de soluto y los cambios que la acompañan y que dan por resultado la deshidratación de la célula durante la criopreservación. La congelación rápida reduce al mínimo los daños por los efectos de la solución, ello conduce a la formación de grandes cristales de hielo que causan graves daños mecánicos. Por otro lado la congelación lenta evita la formación de grandes cristales de hielo, pero a su vez esto provoca un incremento en los daños causados por la solución (Hafez, 1994). Cuando una solución celular es enfriada por debajo de 0 °C, se forman cristales de hielo extracelular que causan concentraciones altas de soluto en el líquido acuoso restante. La membrana celular actúa como barrera para evitar la diseminación de los cristales de hielo dentro de los compartimentos intracelulares. Dado que hay una presión diferencial y el agua tiende a transportarse hacia fuera de la célula (Watson, 1995), al adicionar algún crioprotector como glicerol, etilenglicol, propilenglicol entre otros, al medio de congelación, se produce congelamiento a más bajas temperaturas. Esto probablemente retarda la deshidratación de la célula, con el consiguiente daño causado por la solución, por lo tanto no hay formación de grandes cristales de hielo, pero si se da un efecto tóxico asociado con cambios en molaridad de la solución. El descongelado del semen encierra una reacción de carácter reversible en cuanto a la entrada de líquidos al citoplasma celular, con la consiguiente formación de cristales pequeños o grandes, todo esto determinado por la tasa de descongelación lenta o rápida (Holt, 2000).

4.5. Espermatogénesis

La espermatogénesis es la suma de una serie de eventos que ocurren en el interior de los testículos de los mamíferos y cuya finalidad es la producción de espermatozoides (Johnson *et al.*, 2000). Este proceso ocurre en los tubos seminíferos de las gónadas del macho, resultado de una serie de eventos cronológicos mediante los cuales las células germinales o espermatogonias, se dividen mitóticamente en varias ocasiones hasta dar origen a los espermatocitos, los cuales a su vez se dividen mediante meiosis lo cual hace que se reduzca a la mitad el número de cromosomas (células haploides), dando como resultado final la formación del espermatozoide (Austin y Short, 1982; McLeod y Phillips, 1998; Jonson *et al.*, 2000). La espermatogénesis puede ser dividida en tres estadios de desarrollo; espermatocitogénesis, la cual es considerada la fase proliferativa, la meiosis o fase de producción de las células haploides y la espermiogénesis que es la última fase del proceso en la cual se da origen a una serie de transformaciones morfológicas de espermátida a espermatozoide (Amann *et al.*, 1976).

4.6. Factores que afectan la calidad del semen

El éxito de un programa de manejo reproductivo en ovinos no solo depende de la hembra si no también del macho, el cual tiene que mantener una buena actividad sexual y calidad de semen (Gordon, 1999). Estas características pueden verse afectadas por factores genéticos y ambientales, aunque el factor genético en cuanto a calidad se considera relativamente pequeño (Vivanco, 1998). La producción de semen en el carnero se inicia en la pubertad, pero hay que tomar en consideración que una gran cantidad de razas de ovinos son estacionales y responden con mejor calidad de eyaculados en los meses de otoño cuando la cantidad de horas luz disminuye (Martin y

Banchero, 1999). La actividad testicular de los carneros, es altamente afectada por la duración del día (horas luz), además del efecto de la nutrición, ambos factores intervienen en gran medida determinando el tamaño de los testículos, el cual esta íntimamente relacionado con la producción de espermatozoides (Langford *et al.*, 1989). La libido está estrechamente ligada con la raza y la frecuencia de eyaculados lo cual afecta directamente la calidad de los mismos (Price *et al.*, 1992; Thwaites, 1995a).

4.6.1. Época del año

Generalmente se admite que aunque el carnero produce semen a lo largo de todo el año, su actividad sexual alcanza su máximo en otoño y su mínimo en primavera, pudiendo reducirse su fertilidad en el período anual de días crecientes (Daza, 1997). Un gran número de estudios se han realizado para determinar la influencia de la época del año, así como la localización geográfica sobre la calidad espermática de distintas razas ovinas. Eldon (1993), menciona que a medida que se incrementa la latitud, los ovinos originarios de estas regiones se vuelven más estacionales, es decir la época reproductiva se reduce al ultimo trimestre del año. El autor también menciona que a medida que se reduce la latitud y nos acercamos más al ecuador la estación de apareamiento se puede extender a lo largo de todo el año. Si tomamos como cierta la premisa de que el tamaño testicular es directamente proporcional a la producción de espermatozoides, encontramos que los testículos son pequeños y flácidos durante la primavera y el verano en razas con una marcada estacionalidad, sin embargo, al acercarnos al fin del verano el tamaño testicular empieza a crecer hasta alcanzar el máximo tamaño al inicio del otoño (Martin y Banchero, 1999). El efecto de la estación en la calidad del semen se ve claramente evidenciada en los estudios realizados por Roca *et al.* (1992), quienes

mencionan que el porcentaje de morfo-anormalidades del espermatozoide es los meses de abril a junio se incrementan considerablemente, y en especial los daños del acrosoma. Esto se puede presentar en diferentes razas ovinas y caprinas. Colas *et al.* (1986), mencionan que las variaciones estacionales en la calidad del semen de los pequeños rumiantes tienden a ser asociadas con otras situaciones como cambios en la duración del día y variaciones en la temperatura ambiente.

4.6.2. Nutrición

En carneros, el nivel nutricional afecta el tamaño testicular de manera notable (Martín y Banchemo, 1999), además actúa sobre el eje hipotálamo-pituitario, lo cual afecta la liberación de GnRH (factor liberador de gonadotropinas) ocasionando una baja respuesta del testículo (Gordon, 1999). Thwaites (1995b), encontró que la desnutrición causa una progresiva disminución del tono y volumen testicular. Además, se indica un aparente efecto de la frecuencia de eyaculados sobre el volumen testicular y calidad del semen, ocasionando un estado de agotamiento y desnutrición del macho, al ser sobre-explotado en periodos de tiempo cortos y sometido a alimentación inadecuada (Thwaites, 1995a).

4.6.3. Temperatura

La fertilidad de los carneros es particularmente afectada por las altas temperaturas ambientales (Hafez, 1994). La calidad del eyaculado y la capacidad del testículo para producir andrógenos es afectada por altas temperaturas corporales producidas por altas temperaturas ambientales (Thwaites, 1995b). Las altas temperaturas son consideradas uno de los factores más importantes que afecta la calidad espermática, el shock por calor causa altos porcentajes de anormalidades morfológicas (Colas, 1980).

4.6.4. Edad

La edad de los carneros influye de manera importante en la producción seminal, siendo las características mayormente afectadas el volumen seminal y la concentración espermática, no así la motilidad (Vivanco, 1999). La producción de espermatozoides por parte del carnero se inicia en la etapa de la pubertad, inicialmente la calidad seminal se considera baja pero a medida que se incrementa la edad esta mejora considerablemente (Osinowo *et al.*, 1988). Fulkerson *et al.* (1982), mencionan que la única razón por la que deben utilizarse sementales menores de un año es cuando estos intervienen en programas de mejoramiento genético y se requiere reducir el intervalo generacional, pero esto acarrea baja producción de esperma si se compara con el semen producido por sementales adultos.

4.6.5. Líbido

La libido se refiere a los componentes motivacionales bajo los cuales se desempeña un macho al momento del apareamiento, estos componentes son cortejo, monta, deservaine y cópula, así como su inmediata reanudación en un periodo de tiempo corto (Prace *et al.*, 1992). La libido se ve drásticamente disminuida en razas introducidas a climas tropicales debido a las altas temperaturas predominantes durante casi todo el año (Bunge *et al.*, 1993). Además, se ha demostrado que una alta frecuencia pre-copulatoria y copulatoria baja drásticamente la motivación sexual o libido (Prace *et al.*, 1992). La libido se ve afectada por una disminución en el nivel alimenticio, generalmente cuando los animales son sometidos a una restricción energética (Daza, 1997).

4.6.6. Raza

Los parámetros de mayor importancia descritos en los estudios de calidad seminal incluyen volumen, motilidad y concentración espermática pero además se observa una gran variación entre razas, las cuales pueden verse afectadas por el ambiente con lo cual se pone de manifiesto la interacción entre raza y ambiente (Vivanco, 1999).

Algunas razas de pelo (Pelibuey y Black belly) originarias de Africa, se han difundido por todo el trópico mexicano, e incluso en zonas templadas debido a su fácil adaptabilidad (González *et al.*, 1991). Los machos maduros pueden llegar a pesar entre 45 a 60 kg, Dichas razas se consideran como no estacionales con lo cual la calidad seminal no se ve afectada por la estación del año, sin embargo, la concentración y motilidad espermática pueden verse afectadas durante los meses de primavera y verano debido a las altas temperaturas y alta humedad relativa predominante en estos meses (González *et al.*, 1991).

El comportamiento reproductivo en lo referente a razas de lana (Texel, Dorper, Mutton Merino, Suffolk) generalmente es afectado por la estación del año. En la época de anestro que generalmente es en primavera y verano la secreción de gonadotropinas y esteroides disminuye drásticamente, ocasionando un estado de inactividad sexual (González *et al.*, 1991). La raza Mutton Merino es originaria de Sudáfrica, se considera una raza de doble propósito altamente productora de carne y de buena calidad de lana, los machos pueden pesar más de 100 kg (Cloete *et al.*, 2000). La Raza Dorper es originaria de Sudáfrica producto de la cruce de Dorset Horn y Persa Cabeza Negra, se considera una raza sintética fijada a través de selección y cruzamiento (Milne, 2000). Es

una raza con una gran resistencia a condiciones adversas como calor extremo, lluvia, frío, con una gran rusticidad y que puede utilizar forrajes de baja calidad entre otras (Milne, 2000). Es considerada como una raza no estacional, con una excelente producción de espermatozoides a lo largo de todo el año y con un alto libido (Cloete *et al.*, 2000).

4.7. Dilutores utilizados para conservar semen ovino

4.7.1. Propiedades de los dilutores

Dilutor es: Es todo aquel compuesto que tiene una adecuada capacidad amortiguadora, adecuada presión osmótica, provee de fuentes de energía y brinda una adecuada protección al espermatozoide por periodos cortos o largos de tiempo, de igual manera al adicionársele una sustancia protectora, protege a la célula espermática contra los daños causados por la criopreservación. Debido a que el plasma seminal brinda una limitada protección a los espermatozoides, en cuanto a los cambios de temperatura, acumulación de sustancias tóxicas (CO_2) y se encuentra en una forma muy concentrada, se hace estrictamente necesario diluir el eyaculado, utilizando compuestos especialmente formulados (Salomon y Maxwell, 1995a). Los medios para la dilución del semen de cualquier especie deben cumplir con las siguientes características:

- a) Contener una o más sustancias de tipo iónico que mantengan una adecuada presión osmótica y que protejan de los cambios bruscos de pH. Tales sustancias pueden ser; Tris (hidroxi-metil-amino-metano), ácido cítrico, citrato de sodio y carbonato de sodio entre otros.

- b) Contener una fuente de lipoproteínas de baja densidad que proteja contra el shock por frío. En este grupo encontramos a la yema de huevo y leche.
- c) Contener un agente crioprotector como glicerol, etilenglicol, propilenglicol o dimetilsulfóxido. También se pueden utilizar otros elementos como disacáridos o trisacáridos de alto peso molecular para brindar al medio características de hípertoncicidad.
- d) Contener una fuente de energía, por lo regular son monosacáridos como la glucosa o fructosa.
- e) Contener otros aditivos como antibióticos que protegen contra la proliferación de agentes patógenos como bacterias y hongos, en algunos casos también se utilizan enzimas que ayudan a mantener la integridad de la membrana celular.

4.7.2. Principales dilutores utilizados

Actualmente existe una gran cantidad de dilutores para conservar el semen de los mamíferos, entre los más utilizados se encuentran los elaborados a base de: ácido cítrico-yema de huevo más una fuente de energía, los dilutores a base de leche de vaca y los constituidos por buffers orgánicos como el Tris más otros compuestos como crioprotectores. A continuación se describen los principales dilutores utilizados para la dilución y conservación de semen de carnero (Salamon y Maxwell, 2000).

a)Diluyentes a base de citrato-azúcar

Los dilutores a base de citrato como sustancia buffer combinada con algún tipo de azúcar, se utilizaron para conservar semen de carnero con algunas restricciones debido a que en un principio se utilizaron para conservar semen de toro. Para ser utilizada en la

conservación de semen de carnero se le tuvieron que realizar algunas modificaciones como utilizar diferentes tipos de azúcar como arabinosa, fructosa o glucosa, lo cual estaba determinado por el grado de sobrevivencia de los espermatozoides al ser descongelados. Los mejores resultados se obtuvieron con la arabinosa, pero aun así muchos otros autores han utilizado combinaciones de citrato-glucosa-yema de huevo o citrato-fructosa-yema, cuya presión osmótica es de 8-12 atmósferas. Esta alta presión no es conveniente para preservar el semen de carnero ya que se requiere un medio isotónico de alrededor de 7.7 atmósferas.

La adición de glicerol como crioprotector ocasiona una disminución en la presión osmótica por lo cual se puede utilizar este medio para conservar semen de carnero. Los resultados con este dilutor con semen congelado en ampollitas, utilizando glucosa o fructosa indistintamente fluctuaron entre un 17 a 40%. Los dilutores a base de citrato-azúcar fueron poco utilizados para el congelamiento del semen en la década de los 60's (Salamon y Maxwell, 2000).

b) Dilutores a base de leche

Los dilutores a base de leche fueron adaptados para congelar semen de carnero en su mayor parte a base de leche reconstituida combinada con arbinosa, glucosa, fructosa o yema de huevo. Estudios comparativos con el dilutor citrato-glucosa-yema de huevo de obtuvieron resultados similares. Generalmente este tipo de dilutores es ampliamente utilizado para conservar semen en forma líquida (en refrigeración con temperaturas por arriba de los 15 °C) con excelentes resultados. Sin embargo, al utilizarse el dilutor a base de leche para conservar semen a temperaturas de 0 a 5 °C se obtienen resultados de

fertilidad muy bajos. El principal problema que se tiene para congelar semen es que al querer realizársele un examen al microscópico es extremadamente difícil. Los resultados obtenidos con semen congelado, son muy controversiales, ya que se tienen porcentajes de pariciones de 0 a 23% o de 30 a 45%, sin embargo, con semen fresco se han reportado tasas de pariciones de 50 a 75% (Salamon y Maxwell, 2000).

c) Diluyentes a base de sacarosa y rafinosa

La sacarosa y rafinosa son consideradas como dilutores de carácter sintético, porque se crearon para proteger la integridad del acrosoma del espermatozoide, ya que son azúcares de alto peso molecular que tienen la capacidad de proteger mejor al espermatozoide durante el congelamiento si se comparan con azúcares de bajo peso molecular como la glucosa o fructosa. Se considera que en orden de eficiencia en cuanto a la estabilización de la capa lipídica y acarreadores protéicos de la membrana plasmática tenemos que el orden es el siguiente:

Rafinosa > Sacarosa > Lactosa > Fructosa > Glucosa y este efecto protector puede ser mejor si se combinan diferentes tipos de azúcares en altas proporciones. Los niveles de fertilidad utilizando la sacarosa son pobres y se mencionan rangos de 19 a 55%. Por otro lado al utilizar rafinosa se reportaron porcentajes de 40 a 50% con inseminación cervical con semen congelado, utilizando 150 a 180 millones de espermatozoides por dosis y doble inseminación (Salamon y Maxwell, 2000).

d) Diluyentes a base de Tris (hidroxi-metil-amino-metano).

El Tris ha sido utilizado en un gran número de trabajos realizados al inicio de la década de los 70's. congelando un alto número de dosis de semen de carnero, generalmente en

forma de pellets. Se considera que el semen de carnero tiene la capacidad de resistir concentraciones de Tris desde 250 a 400 mM. De la misma manera se reportó que un dilutor preparado a base de Tris (300 mM)-glucosa (27.75 mM)-ácido cítrico (94.7 mM)-yema de huevo (15%) más antibiótico, al utilizarse en el congelamiento de semen en hielo seco se obtuvieron tasas de pariciones de 30-57% con inseminación cervical. Recientemente se han determinado con mayor precisión las concentraciones de esta base amortiguadora cuya osmolaridad va de 325 mM a 375 mM en combinación con mono o disacárido en mayores o menores concentraciones. En la actualidad el dilutor Tris-glucosa-yema de huevo elaborado por Visser y Salamon (1973), es el más utilizado para congelar semen de carnero (Salomon y Maxwell, 2000).

e) Otros dilutores

Otros sustancias controladoras del pH utilizadas para la preparación de dilutores son (TES, HEPES y PEPES). Sin embargo, los niveles de fertilidad son poco satisfactorios (13-67% de gestaciones) con semen fresco. Al combinarse con leche descremada se obtuvieron mejores resultados, siendo comparado con el dilutor Tris-glucosa-yema de huevo, el cual conserva mucho mejor la integridad acrosomal y mejora la sobrevivencia del espermatozoide al ser congelado (Salomon y Maxwell, 2000).

4.8. Tipos de semen a utilizar

En la actualidad se utilizan dos formas para conservar el semen líquido (fresco o refrigerado) y semen congelado. El empleo de cualquiera de las formas antes mencionadas está determinada por la combinación de varios factores como: temperatura de conservación, tasa de enfriamiento, composición química del dilutor, concentración

del crioprotector y el control higiénico para mantener la sobrevivencia del espermatozoide (Yoshida, 2000).

4.8.1. Semen fresco

El uso de semen fresco ha sido muy difundido en la inseminación artificial en ovinos, generalmente es utilizado inmediatamente después de su colección y dilución requerida. Por lo regular se conserva a temperatura de 30 °C por no más de 4 horas, debido a que la actividad metabólica es muy alta, lo cual incrementa la concentración de ácido láctico en el medio lo cual tiene un efecto negativo en la motilidad y viabilidad del espermatozoide (Vivanco, 1998). Una de sus mayores ventajas es que se mantienen altas tasas de fertilidad con un bajo número de espermatozoides, lo cual está determinado por el tipo de inseminación a realizar y su consiguiente tasa de dilución (Yoshida, 2000). En el Cuadro 2 se indican algunas ventajas del uso de semen fresco y semen congelado.

4.8.2. Semen refrigerado

El método mayormente utilizado para conservar el semen en forma líquida por periodos de tiempo mayores a 24 horas es mediante la reducción de la temperatura, debido a que con esto se produce una reducción en la actividad metabólica y de la motilidad aumentando la vida media del espermatozoide hasta su utilización. La motilidad se detiene totalmente a los 5 °C pero se puede restituir si se eleva nuevamente la temperatura a los niveles normales, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por el “shock por frío” (Vivanco, 1998). Cuando el semen es conservado a temperaturas cercanas a los cero grados centígrados, se debe de tener en cuenta que los espermatozoides se someten a un “shock por frío”, lo cual puede causar

cambios irreversibles en la célula espermática (Salamon y Maxwell, 2000). El descubrimiento de las propiedades protectoras de las lipoproteínas de la yema de huevo contribuye a incrementar la sobrevivencia y protección del espermatozoide cuando se somete al proceso de enfriamiento (Vishwanath y Shannon, 2000). Evaluaciones en el laboratorio han demostrado que el semen diluido y refrigerado a 5 °C muestra una gran variabilidad en sobrevivencia y fertilidad en las subsiguientes 72 horas postdilución. Existen algunos dilutores en los cuales los espermatozoides pueden conservarse a 4 °C durante 8 a 15 días con una buena viabilidad, pero su capacidad fertilizadora se pierde en el día seis (Leboeuf *et al.*, 2000). La conservación del semen a 5 °C reduce la actividad metabólica, pero también puede acarrear consecuencias perjudiciales como el decremento en la actividad de la bomba Na/K intracelular, lo cual provoca una marcada disfunción en el cruzamiento intra-membranal de algunos iones, con lo cual al incrementarse la concentración de Na dentro de la célula, acarrea una disminución en la sobrevivencia del espermatozoide (Vishwanath y Shannon, 2000).

Cuadro 2. Ventajas y desventajas del uso de semen líquido y congelado

Tipo de semen	Ventajas	Desventajas
Líquido	• Baja concentración espermática • Alta fertilidad • Conservación barata • Facilidad de uso en campo	• Rangos de supervivencia corto • Utilizase lo más pronto posible • Generalmente se utiliza en explotaciones donde se cuenta con la presencia física del macho
Congelado	• Conservación por periodos de tiempo largos • Flexibilidad de uso • Facilita el comercio	• Alta concentración de espermatozoides por dosis • Conservación costosa • Menor fertilidad

Fuente: Vishwanath y Shannon (2000).

En un ambiente líquido con alta dilución, la fertilidad del espermatozoide se mantiene por 3-5 días cuando se conserva a una temperatura de 10 a 21 °C (Yoshida, 2000). Salomon y Maxwell (1993) mencionan que la fertilidad del semen refrigerado declina rápidamente después de las 24 horas. El descenso en fertilidad se considera entre un 10-33% por cada día transcurrido, si lo anterior se compara con la fertilidad obtenida con semen fresco (75-80%), encontramos que con semen refrigerado por 24, 48 y 72 horas se tienen porcentajes de fertilidad de 45-50%, 25-30% y 15-20%, respectivamente.

4.8.3. Semen congelado

La conservación del semen mediante congelación implica una gama de procesos extremadamente complicados, que se inician al momento de la obtención de la muestra y terminan después de la descongelación (Vishwonath y Shannon, 2000). La conservación de los espermatozoides a temperaturas de -79 °C en hilo seco o -196 °C en nitrógeno líquido, conserva indefinidamente su potencial fertilizante, (Cuadro 3). Algunos autores mencionan periodos de tiempo que van de 3,000 y hasta 10,000 años, sin embargo, otros autores mencionan periodos más reducidos (Vishwonath y Shannon, 2000).

Cuadro 3. Resultados de inseminación artificial por laparoscopia utilizando semen congelado

Tiempo de almacenamiento (años)	No. de hembras inseminadas	Pariciones de (%)
3	172	52.9
5	70	52.9
7	143	51.7
11	159	55.3
16	193	61.7
27	205	60.5

Fuente: Salamon y Maxwell (2000).

El descubrimiento fortuito del glicerol como una sustancia efectiva para la crio preservación del semen de los mamíferos, introdujo por completo un nuevo sistema de conservación, cuya metodología se practica hasta nuestros días. Inicialmente esta metodología fue creada para preservar el semen de los bovinos, la cual se ha trasladado a otras especies con algunos pequeños cambios. Los resultados obtenidos en bovinos han sido de las siguientes magnitudes: resultados pobres (3-15% de gestación), moderados (20-48%) y satisfactorios (alrededor de un 70%) (Holt, 2000). En el Cuadro 4 se indican algunos resultados obtenidos en ovinos en distintos años y con distintos dilutores.

Cuadro 4. Fertilidad obtenida con varios dilutores utilizados en el congelamiento de semen ovino

Referencia	Dilutor	Método de congelación	No. esperm. Móviles ($\times 10^6$)	No. hembras inseminadas	% de pariciones
Kuznecov y Kuprjanova (1959)	Citrato-Glucosa-Yema	Ampolletas	24-40	399	22.1
Platov (1968)	Lactosa-Yema-Glicerol	Pellets	NR	45	22.0
Salamon (1971)	Rafinosa-citrato-Yema	Pellets	155	250	44.8
Visser y Salamon (1974)	Tris-Glucosa-Yema	Pellets	180	69	36.0
Tsakalof <i>et al.</i> (1975)	Leche-Fructosa-Yema	Viales	NR	146	50.7
Fiser <i>et al.</i> (1987)	Tris-Fructosa-Acido cítrico-Yema-Glicerol+Dextran sódico	Pajillas	320	33	72.7
Maxwell (1986)	Tris-Glucosa-Yema-Glicerol	Pajillas	20	115	57.4
Molina <i>et al.</i> (1996)	Tris-Glucosa-Yema-Glicerol	Pajillas	20	42	66.7
Sánchez-Partida <i>et al.</i> (1997)	Tris-Glucosa-Yema-Glicerol	Pajillas	30	39	41.0

Fuente: Salamon y Maxwell (1995a; 2000).

NR = No Reportados.

La utilización del semen congelado brinda una gran flexibilidad al empleo de la inseminación artificial y posibilita el comercio internacional de semen. La reducción de

la temperatura seminal por debajo de los 4 °C enfrenta los problemas de la cristalización del agua intra y extracelular, causando daños estructurales con ruptura de la membrana celular por el aumento del volumen del agua, al cristalizarse y por aumento de la presión osmótica intracelular al aumentar la concentración de sales (Vivanco, 1998). Al adicionarse el glicerol al semen diluido, antes de la congelación, baja el punto de congelación del agua al mezclarse ambas sustancias, lo cual ocasiona una reducción de la cristalización y cambios osmóticos bruscos. El glicerol también deshidrata parcialmente la célula espermática, reduciendo aun más el riesgo de cristalización intracelular (Salamon y Maxwell, 2000).

Gillan y Maxwell (1998) encontraron que la congelación del semen de carnero a pesar de todos los aditivos convencionales (glicerol, yema de huevo y algunos azúcares de alto peso molecular como disacáridos y trisacáridos), producen la capacitación prematura del espermatozoide, debido a la reacción espontánea del acrosoma. Es importante recordar que durante el proceso de descongelación entre un 40 a 50% de la población de espermatozoides no sobrevive por lo cual se tiene que incrementar la concentración por dosis y además buscar hacer más efectivo el proceso (Watson, 2000).

4.9. Obtención, análisis y procesamiento de la muestra

El semen de carnero generalmente es colectado mediante vagina artificial, en muy pocas ocasiones se utiliza la extracción con electroeyaculador. La vagina artificial se encuentra temperada a 45 °C. Una vez obtenida la muestra se procede a realizar la evaluación de la misma en cuanto a sus características macro y microscópicas, las cuales se describen en

los Cuadros 5 y 6 para posteriormente proceder a su dilución, enfriamiento, empajillado, y finalmente congelación en nitrógeno líquido.

Cuadro 5. Características a evaluar de un eyaculado ovino

Característica	Descripción
Color	Blanco, Lechoso, Cremoso pálido
Volumen (ml)	De 0.8 a 1.5
Motilidad masal	Solo se congelan muestras de buena calidad (categoría 4 ó 5)
Vivos y muertos (%)	Mayor al 70% de vivos y menos de 30% de muertos.
Concentración (células /ml)	Muy buena de 3.5 a 6.0×10^6 Rangos normales de 2.5 a 5.0×10^6
Normalidad (%)	Mayor al 75% (no más del 25% de anormalidades)

Fuente: Evans y Maxwell (1987).

La motilidad masal se valora de acuerdo al cuadro 6 cuyos rangos a utilizar son solo los de muy buena y buena motilidad 5 y 4, respectivamente.

Cuadro 6. Valoración de la motilidad masal de un eyaculado ovino

Valor	Clase	Descripción
5	Muy buena	Densa, ondas de movimiento(remolinos) muy rápidas. No se pueden observar las células individuales. El 90% o más de los espermatozoides son activos.
4	Buena	Movimientos vigorosos, pero las ondas y remolinos no son rápidos como los del valor 5. Alrededor del 70 a 85% de los espermatozoides son activos.
3	Regular	Solo aparecen ondas de movimiento lento se pueden ver los espermatozoides aislados. El 45 al 65% de los espermatozoides son activos.
2	Pobre	No aparecen ondas, aunque se observa movimiento de los espermatozoides. Se considera de carácter pobre y además solo de un 20 al 40% de las células espermáticas están vivas.
1	Muy pobre	Hay muy pocos espermatozoides (solo alrededor de un 10%) vivos y presentan movimiento muy débil.
0	Muertos	Ningún espermatozoide presenta movimiento

Fuente: Evans y Maxwell (1987)

4.10. Control hormonal del ciclo estral de la hembra

En los mamíferos, los procesos reproductivos están gobernados por el sistema nervioso central (SNC), los cual se realizan por áreas específicas del cerebro (el hipotálamo) y son modificados por dos glándulas endocrinas, la pituitaria y la glándula pineal (McLeod y Phillips, 1998). En la actualidad se sabe que el SNC controla la función reproductiva a través de mensajeros específicos como el GnRH que establece la unión neuroquímica entre el cerebro y el eje hipofisiario-gonadal (Caraty *et al.*, 1995) ocasionando un efecto de cascada (McLeod y Phillips, 1998). El factor liberador de gonadotropinas (GnRH), regula la biosíntesis y liberación de las mismas LH y FSH, las cuales a su vez, actúan sobre los receptores a nivel de los folículos ováricos regulando su maduración, y por lo tanto la esteroidogénesis (Caraty *et al.*, 1995). McLeod y Phillips (1998) mencionan que el ciclo estral es una secuencia de eventos hormonales que se inician justamente al terminar el ciclo anterior. La fase luteal del estro es caracterizada por altas concentraciones plasmáticas de progesterona, estos niveles son bajos al momento del estro, pero se incrementan rápidamente 3 a 5 días después de la ovulación. Los cambios en concentración de progesterona afectan de sobremanera la secreción de gonadotropinas por la hipófisis, con lo cual la concentración de LH baja durante la fase luteal, incrementándose a medida que los niveles de progesterona disminuyen. La disminución en la secreción pulsátil de LH, que se observa durante el anestro estacional, resulta de una baja frecuencia de liberación de pulsos de GnRH, de la misma manera, al aumentar la frecuencia de sus pulsos durante la época reproductiva, origina picos muy pronunciados sobre todo justo antes de la ovulación. En resumen se puede mencionar que las variaciones en la secreción de hormonas ováricas y en la sensibilidad del SNC,

son las responsables de las modificaciones en la secreción de gonadotropinas que regulan la vida reproductiva de los mamíferos (Gallegos *et al.*, 1999).

4.11. Factores que afectan la fertilidad y prolificidad de la hembra

4.11.1. Raza

El componente genético y el origen racial diferencian notablemente las características estacionales en cada raza, así como la actual tendencia hacia un incremento en la duración del periodo reproductivo como además un aumento de la prolificidad, a incrementado el uso de un mayor número de grupos raciales (López *et al.*, 2001). Daza (1997) menciona que la variación en la eficiencia reproductiva de las razas ovinas se debe a la interacción genotipo-ambiente donde se desenvuelven. Las razas ovinas productoras de carne más pesadas del Norte de Europa (Suffolk y otras) presentan una estacionalidad mucho más marcada que otras razas de distribución universal (López, 1999). Sin embargo, existen razas de ovinos cuyos orígenes son zonas tropicales como es el ganado de pelo al cual se le considera como no estacional, por lo tanto puede reproducirse a lo largo de todo el año, siendo afectado en mayor grado por el estado nutricional y la disponibilidad de forraje (Gordon, 1997).

4.11.2. Época del año

Las ovejas son consideradas como animales poli-éstricos estacionales, cuya época reproductiva inicia al finalizar el verano y termina con el fin del invierno (Gordon, 1997). La época del año es considerada como el factor medioambiental más importante en la reproducción de los pequeños rumiantes (López, 1999). La estacionalidad viene marcada por el fotoperiodo y por lo tanto por la latitud. En el hemisferio norte, algunas

de las razas Europeas, en latitudes de 60° N, presentan un periodo muy corto de actividad sexual entre los meses de noviembre y febrero. Las razas que viven en zonas tropicales, al no darse prácticamente variaciones interestacionales del fotoperiodo, no presentan anestro estacional, pero se manifiesta sobre el aspecto reproductivo la alimentación (Daza, 1997). Sin embargo, Delgadillo *et al.* (2000) mencionan que algunas razas de cabras originarias de zonas tropicales pueden llegar a presentar anestro estacional, similar al que presentan las razas de zonas templadas.

4.11.3. Edad

Las corderas y las ovejas primíparas tiene una estación sexual más corta que las ovejas adultas, además las primeras exhiben un celo más corto. Con lo anterior se deduce que la fertilidad es más elevada en las ovejas adultas incrementándose con la edad hasta los 4-6 años (Daza, 1997). La fertilidad así como la prolificidad muestran una evolución variable con la edad, estableciéndose el máximo específico para cada raza a partir del tercer parto (López *et al.*, 2001). Generalmente, condiciones de subnutrición provocan un retraso en la pubertad, lo cual reduce la eficiencia reproductiva, tasa de crecimiento, y ocasiona prolongados anestros post-parto (Walkden-Brown y Bocquier, 2000).

4.11.4. Condición corporal

Delgadillo *et al.* (2000) mencionan como el principal modulador de la actividad sexual en zonas tropicales a la condición corporal o estado nutricional. En la hembra, los procesos reproductivos completos encierran la preñez, la lactancia y la capacidad potencial de reproducción del próximo ciclo (Walkden-Brown y Bocquier, 2000). Los mecanismos reguladores de la reproducción se ven afectados por el estado actual de

nutrición, así como por los niveles de reservas corporales (Wallace *et al.*, 1999). Rhind *et al.* (1989), mencionan que una condición corporal baja puede afectar considerablemente la implantación y sobrevivencia de los embriones en los primeros estadios de desarrollo, lo cual es causado por los bajos niveles circulantes de progesterona en el oviducto y el útero.

4.11.5. Tipo de inseminación

Los niveles de fertilidad que se pueden obtener en borregas son variables, lo anterior va a depender de la técnica de inseminación y el tipo de semen utilizado, por lo general se mencionan porcentajes de entre un 30 a un 80% (Meza y Ross, 2000). La baja fertilidad que se obtiene con la inseminación cervical utilizando semen congelado, es debida al impedimento en el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductivo de la oveja. Lo anterior puede mejorarse utilizando la inseminación intrauterina por laparoscopia, con la cual se deposita el semen directamente en el lumen del cuerno uterino (Eppleston *et al.*, 1994). Gordon (1997), reporta tasas de fertilización superiores al 90% utilizando inseminación intrauterina por laparoscopia al utilizar semen fresco y de 55% con semen congelado.

Los principales beneficios que aporta la inseminación intrauterina son: las dosis de semen que se requieren son mucho más bajas que en cualquier otro tipo de inseminación, se puede utilizar tanto semen fresco como congelado sin afectar en gran medida el porcentaje de fertilidad y los tiempos de inseminación por animal se reducen (Tervit *et al.*, 1984; Maxwell, 1986; Evans y Maxwell, 1987).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización

El estudio se realizó durante los meses de noviembre de 1999 a julio del 2000 en el Rancho “Los Pinos”, Municipio de Texcoco, Estado de México, el cual se localiza a los 19° 31' de Latitud Norte y 98° 53' de Longitud Oeste, con una altura de 2,353 m.s.n.m. El clima de la región es de tipo templado, con verano fresco largo y con lluvias en verano, con una precipitación media anual de 650 mm. La temperatura media anual es de 15 °C y la fórmula climática correspondiente es Cb (Wo) (W) (i') g de acuerdo con la clasificación climática de Köppen, modificada por García (1988).

5.2. Animales y manejo

Se utilizaron cinco machos adultos de las razas Dorper (n=3) y Mutton Merino (n=2) con un peso corporal promedio de 90 kg. Los machos se alojaron en corraletas individuales cercanas al laboratorio donde se procesaron las muestras, se les proporcionó una dieta a base de concentrado (250 gramos/diarios/animal) con 12% de proteína y agua de buena calidad *ad libitum* complementada con heno de alfalfa. La extracción de semen se realizó dos veces por semana.

El procedimiento de manejo consistió en sacar al macho de su corral y llevarlo hasta el potro de extracción, donde se encontraba una oveja que se utilizó de señuelo para la extracción del semen.

5.3. Tratamientos

Los tratamientos fueron: 1) El dilutor Triladyl (Minitüb Abfüll-Und Labortechnik GmbH and Co., Germany) de carácter comercial para congelamiento de semen de toro y 2) El dilutor preparado en el laboratorio de reproducción animal del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Los ingredientes utilizados en la elaboración o preparación de los dilutores, se presentan en el Cuadro 7. Inmediatamente después de concluir el proceso de congelamiento, se procedió a descongelar dos dosis de semen de cada semental y se utilizó la tinción SPERMAC (Minitüb Abfüll-Und Labortechnik GmbH and Co., Germany) para determinar el porcentaje de daños acrosomales después del congelado del semen. Este reactivo consta de cuatro frascos con diferentes soluciones (solución fijadora, solución A, solución B, solución C).

Cuadro 7. Ingredientes utilizados en la elaboración de los dilutores Triladyl (comercial) y el preparado (experimental)

Ingredientes	Triladyl	Preparado(exp)
Tris (hidroxi-metil-aminometano) (mM)	-----	3 60.0
Fructosa (mM)	-----	()
Glucosa (mM)	()	33.3
Ácido Cítrico (mM)	-----	113.7
Glicerol (%)	-----	6.0
Gentamicina (mg)	25.0	25.0
Lincomicina (mg)	15.0	15.0
Espectinomicina (mg)	30.0	30.0
Tilocina (mg)	5.0	50.0
Yema de huevo (%)	20.0	20.0
Agua tri-destilada (ml)	250.0	740.0

(-----) Se desconoce la cantidad de reactivo utilizado.

() No se utiliza en la fórmula.

5.4. Extracción del semen

El semen fue colectado mediante vagina artificial utilizando la técnica descrita por Evans y Maxwell (1987), la cual consiste de un tubo rígido de plástico de 11 a 12 cm de longitud y 5.5 centímetros de diámetro provisto en su interior de una camisa de látex rugoso. El tubo rígido lleva un orificio lateral, provisto de un tornillo, por donde se introduce agua a una temperatura de 48 a 50 °C, para que al momento de ser utilizada se encuentre aproximadamente entre 42 y 45 °C. La cantidad de agua que se añade es aproximadamente 1/2 a 2/3 del volumen del tubo; posteriormente, la camisa se insufla con aire por el mismo orificio lateral para que la vagina artificial presente condiciones similares a las de una vagina natural en cuanto a presión y temperatura. En un extremo de la vagina se coloca un cono de látex semi-rígido o flexible de aproximadamente 15 a 18 cm y al final del mismo se coloca un tubo de plástico graduado en el cual se deposita el semen después de la eyaculación.

Una vez que la vagina artificial se encuentra lista, se procede a realizar la colección del semen, la cual se realiza con la ayuda de un potro donde se sujeta a la oveja que servirá de señuelo. El macho es conducido de su corral al lugar de extracción, dejándolo en un principio dar una monta falsa para incrementar su *libido* y posteriormente se deja que realice la monta. Justo en el momento en que el macho salta, se procede a desviar el pene hacia la vagina artificial donde ocurre la eyaculación, inmediatamente se procede a sacudir enérgicamente la vagina para que todo el eyaculado acceda al tubo colector. Después de la colección se limpia y retira el tubo colector, procediendo a identificarlo y colocarlo en baño María a 37 °C (Evans y Maxwell, 1987).

5.5. Manejo y valoración de la muestra

Al obtener el eyaculado se determinan cuidadosamente el volumen y color. El volumen en carneros varía de 0.8 a 1.5 ml por eyaculado, dependiendo de la edad y condición del animal, frecuencia de recolecciones y destreza del operario (Evans y Maxwell, 1987).

El color o consistencia del eyaculado depende de la relación espermatozoides y plasma seminal, por lo que eyaculados acuosos contienen baja concentración espermática y viceversa, eyaculados con una coloración cremosa contienen una alta concentración espermática (Evans y Maxwell, 1987). Para este caso se clasificaron los eyaculados en tres categorías, 1) acuoso, 2) lechoso y 3) cremoso. Un semen normal es de color blanco, lechoso o cremoso; por el contrario, coloraciones como gris-pardo representan la existencia de contaminantes o infecciones y un tono rosáceo indica presencia de sangre, y un color amarillento, denota la presencia de orina (Daza, 1997).

La valoración de las características microscópicas es de suma importancia, ya que de ella depende la utilización o no del eyaculado. Las características evaluadas fueron: motilidad masal, concentración, morfología de los espermatozoides y conteo de vivos y muertos. La motilidad masal se valoró mediante las ondas de movimiento del semen, debido a que es la forma más simple y rápida (Evans y Maxwell, 1987). Sólo eyaculados con buena motilidad se utilizaron para procesarse y posteriormente fueron congelados; con base en el cuadro de motilidad propuesto por Evans y Maxwell (1987) sólo se utilizaron las muestras valoradas en los rangos de 4 y 5 (Cuadro 6).

La concentración espermática se expresa con base en el número de espermatozoides por mililitro y es de gran importancia ya que la tasa de dilución depende de ella. Esta

característica se determinó mediante la ayuda de la cámara de Neubauer, además de una pipeta de conteo de glóbulos rojos. La muestra a utilizar se diluyó en una proporción de 1 a 200; esto se logró succionando el semen con la pipeta hasta la marca de 0.5 y posteriormente se absorbió la solución de Hayem hasta la marca 101, mezclando perfectamente las dos soluciones agitando suavemente. Posteriormente, se procedió al llenado del área de conteo e inmediatamente después se procedió a localizar la cuadrícula de conteo con el objetivo de 10X para luego cambiarse al objetivo de 40X, con el cual se realizó el conteo de las células espermáticas localizadas en cinco cuadros grandes, los cuatro de las esquinas y el del centro. La concentración de espermatozoides por mililitro de semen se calculó multiplicando el número total de espermatozoides de las cinco cuadrículas grandes por 10^7 (Evans y Maxwell, 1987; Daza, 1997; Gordon, 1997).

La proporción elevada de espermatozoides muertos y anormales, morfológicamente tienen una influencia negativa sobre la fertilidad, debiéndose rechazar los eyaculados que contengan más de 15% de espermatozoides anormales y un porcentaje de 20% de células muertas (Daza, 1997). El conteo de espermatozoides vivos y muertos al igual que de normales y anormales se realizó en el mismo frotis, cuya preparación fue de la siguiente manera: en un porta objetos temperado se colocó una pequeña gota de semen, a la cual se le adicionaron 2 ó 3 gotas de colorante vital de Eosina-Nigrosina y se homogeneizó con un palillo, para posteriormente realizar un frotis, el cual se dejó secar al aire e inmediatamente después se procedió a realizar el conteo de 100 células espermáticas en distintos campos del frotis, con la ayuda del objetivo de inmersión (100X). Los espermatozoides muertos se tiñen parcialmente de rosa, mientras que las

células vivas no se tiñen. De la misma manera, se procedió a realizar un conteo en las células vivas del frotis para determinar el porcentaje de anomalías presentes (Evans y Maxwell, 1987; Hafez, 1994; Daza, 1997).

5.6. Dilución de la muestra

La dilución de semen se justifica por el hecho de poder inseminar un mayor número de hembras que las que se podrían inseminar con semen no diluido, para mantener su poder fecundante desde su recolección hasta la fecundación (Daza, 1997). Una vez valorado el eyaculado y comprobado que reúne las condiciones óptimas necesarias para considerarse de buena calidad, se procede a la dilución con la siguiente fórmula:

$$TD = (VOL. \times CONC. \times MOT.) / 200 \times 10^6$$

Donde:

DT = Tasa de dilución

VOL. = Volumen

CONC. = Concentración

MOT. = Motilidad

200×10^6 = Concentración por dosis.

Los eyaculado se dividió en dos porciones iguales en diferentes tubos, para poderse mezclar con los dos dilutores utilizados como tratamientos. La sustancia crioprotectora que debe de tener el dilutor puede adicionarse en dos tiempos (método de dos pasos), o en el momento de la dilución (método de un paso); utilizándose este último por su simplicidad y mejor manejo del semen antes de la congelación (Evans y Maxwell, 1987). Posteriormente se procedió a dar inicio al enfriamiento y conservación del semen.

5.7. Conservación del semen

La reducción de la temperatura del semen reduce la tasa metabólica y disminuye la motilidad, pero estos cambios pueden ser reversibles si se restablece la temperatura orgánica normal (Vivanco, 1998). El método que se utilizó para conservar el semen fue el de congelación en nitrógeno líquido.

5.7.1. Enfriamiento del semen

La disminución de la temperatura del semen de 37 °C hasta 5 °C se realizó en el refrigerador. El semen contenido en un tubo de plástico, se colocó en medio de un recipiente de cristal aislado con una capa de algodón, se tapó el recipiente y se depositó en el interior del refrigerador cuya temperatura se encontraba a 5 °C. En este lugar se mantuvo 4.5 horas. Durante las dos primeras horas se da la disminución de la temperatura de la muestra hasta igualarse con su entorno, el tiempo restante se da para permitir el equilibrio del glicerol, estableciendo un balance intracelular y extracelular en cuanto a concentración, el cual regularmente se presenta cuando se alcanzan los 5 °C (Salamon y Maxwell, 2000).

5.7.2. Envasado del semen

Después del enfriamiento del semen se procedió al empajillado, no sin antes constatar que la motilidad de la muestra era buena. El envasado se realizó en pajillas de plástico de 0.25 ml, las cuales fueron llenadas con la ayuda de una jeringa de 1 ml, teniendo cuidado en no llenar completamente la pajilla, con lo cual queda un espacio vacío el cual se llena con alcohol polivinílico, introduciendo las pajillas en agua a la misma temperatura para permitir la formación de un gel sellador. Transcurridos 10 minutos del

inicio del empajillado, se procedió al secado de las mismas, para así dar inicio al congelamiento.

5.7.3. Congelamiento del semen

El congelamiento del semen se realizó en vapores de nitrógeno (-80 a -100 °C) y el proceso consistió en depositar las pajillas de forma horizontal sobre una gradilla de plástico, la cual se encontraba en el interior de un recipiente de unicel redondo. Las pajillas se colocaron a 4 cm por encima de la superficie del nitrógeno líquido, con lo cual se regula la velocidad de congelamiento la cual se considera que es de 10 a 100 °C x minuto (Salamon y Maxwell, 2000). Las pajillas se expusieron por 20 minutos a los vapores de nitrógeno y posteriormente se procedió a depositar las pajillas directamente en el nitrógeno líquido (-196 °C).

5.7.4. Descongelamiento y evaluación del semen

Las dosis que se almacenan en el termo de nitrógeno deben demostrar que tiene una buena motilidad postdescongelamiento. La prueba se realizó mediante la descongelación (37 °C/45 seg) de dos pajillas tomadas al azar del eyaculado que se congeló; se colocó una gota de semen sobre un porta objetos temperado a 37 °C y se evaluó su motilidad masal e individual con la ayuda de un cubre objetos y el objetivo de 40 X. Sólo las muestras cuya motilidad individual progresiva era superior a un 40% se consideraron de buena calidad y se almacenaron en el termo de nitrógeno. De estas mismas muestras con buena motilidad se procedió a realizar un análisis más detallado para determinar el porcentaje de espermatozoides afectados a nivel del acrosoma durante el proceso de

congelamiento y descongelamiento, así como el posible efecto del tipo de dilutor, macho y mes de colección sobre la mayor o menor incidencia de las mismas.

5.7.5. Determinación del estado acrosomal

El colorante utilizado fue de carácter comercial denominado SPERMAC (Minitüb Abfüll-Und Labortechnik GmbH and Co., Germany) y puede utilizarse para la determinación de morfo-anormalidades del semen fresco o diluido de varias especies. El estado del acrosoma se determinó al realizar un conteo de cien células espermáticas de un frotis cuya elaboración a continuación se describe; se utilizó un microscopio de contraste de fases de la marca Aeroscope y el objetivo de inmersión (100X).

El frotis se realizó inmediatamente después de la evaluación de la motilidad postdescongelación de la misma pajilla y se dejó secar al aire libre, procurando que no transcurriera un periodo mayor de 5 min entre la realización del frotis y la aplicación de la solución fijadora. La fijación del frotis se realizó por inmersión en la solución fijadora, por un mínimo de 6 min inmediatamente después se procedió a la tinción utilizando el siguiente procedimiento:

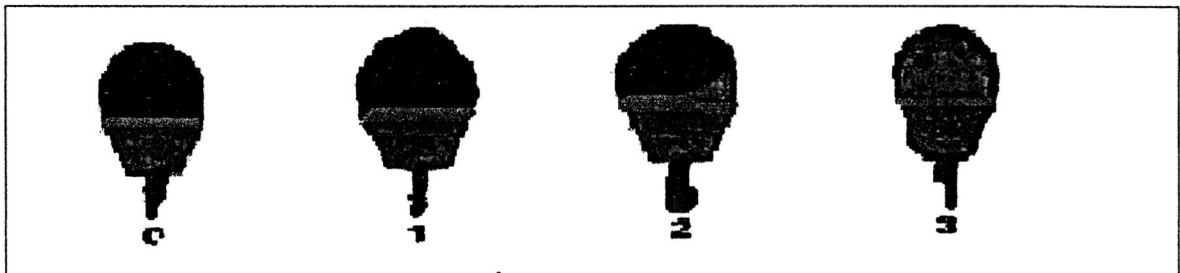
- a) El frotis se lavó en agua corriente durante 5–6 exposiciones para posteriormente eliminar el exceso de agua con papel secante.
- b) Inmediatamente después, se sumergió el frotis en el colorante A (rojo) por un periodo de 1-2 min transcurrido este tiempo, se lavó y secó de la manera antes mencionada.
- c) Se sumergió el frotis en el colorante B (verde) por un periodo de 1 min; se lava y seca de la forma antes mencionada.

d) Se procedió entonces a sumergir el frotis en la solución C (azul) por un periodo de 1 min. se lavó y secó como se indicó anteriormente.

El frotis se examinó inmediatamente después de ser realizado considerando las características que se mencionan en el Cuadro 8. El examen se realizó con el objetivo de inmersión (100X) y la lente de contraste de fases, con lo cual, se denota que las diversas partes del espermatozoide se colorearon como se menciona en seguida:

- ❖ El acrosoma se tiñe de verde
- ❖ La región ecuatorial se tiñe de un verde pálido
- ❖ El resto de la cabeza se tiñe de rojo
- ❖ El cuello y la cola se tiñen de verde

Cuadro 8. Espermatozoides normales y afectados por la criopreservación a nivel del acrosoma



0 y 1) espermatozoides normales con el acrosoma intacto; 2) espermatozoide afectado perdiendo el acrosoma; 3) espermatozoide que no tiene acrosoma

Watson *et al.* (1991) mencionan que se pueden clasificar los espermatozoides en base a su estado acrosomal de tres formas:

- a) Normal. Los bordes están lisos y regulares, el acrosoma se distingue como una cresta prominente y además se denota el segmento ecuatorial.

- b) Intermedia. La porción anterior del segmento ecuatorial puede estar más prominente que los márgenes laterales a menudo se distingue la cresta acrosomal intacta.
- c) Acrosoma perdido. Este estado se caracteriza por el desprendimiento parcial o total del acrosoma.

5.7.6. Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron: motilidad predilución (MPRED), daños acrosomales (DA) y motilidad postdescongelado (MPD).

5.7.7. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó con el procedimiento GLM (General Lineal Model) del paquete SAS (SAS, 1998) y la comparación de medias se realizó mediante el procedimiento de Tukey (Steel y Torrie, 1988).

Los modelos estadísticos utilizados para el análisis de las variables de respuesta fueron los siguientes:

$$MPRED_{ijk} = \mu + R_i + M_j + R_i * M_j + \beta_1(C - \bar{c}) + \epsilon_{ijk}$$

Donde:

$MPRED_{ijk}$ = La motilidad predilución del semen del macho de la i-ésima raza en el j-ésimo mes.

μ = Media general

R_i = Efecto de la i-ésima raza, $i = 1, 2$.

M_j = Efecto del j-ésimo mes, $j = 1, 2, \dots, 9$.

$R_i * M_j$ = Efecto de la interacción entre raza y mes.

C = Efecto de la concentración espermática como covariable.

β_1 = Coeficiente de regresión lineal asociado con la covariable C.

ϵ_{ijk} = Efecto del error experimental. $\epsilon_{ijk} \sim NI(0, \sigma^2 \epsilon)$.

El modelo estadístico utilizado para evaluar los daños acrosomales (DA) y motilidad postdescongelación (MPD) fue:

$$DA \text{ ó } MPD_{ijkl} = \mu + D_i + M_j + R_k + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

DA ó MPD_{ijkl} = Daños acrosomales ó motilidad postdescongelación, respectivamente, correspondiente al i-ésimo dilutor, en el j-ésimo mes y a la k-ésima raza.

D_i = Efecto del i-ésimo dilutor, $i = 1, 2$.

Adicionalmente, las variables MPRED, DA y MPD se analizaron sustituyendo el efecto del mes (que en algunos casos tenía pocas repeticiones), por el de época (que al sumar meses con pocas repeticiones con otros meses con más repeticiones dentro de la misma época manifestó algunos resultados significativos). La época reproductiva comprendió los meses de octubre a febrero; la no reproductiva consideró los meses de marzo a julio, sin incluir a mayo en el cual no se obtuvieron observaciones.

Los modelos cuando se incluyó al efecto de época fueron similares a los que se utilizaron cuando se analizó al efecto mes, excepto que para MPRED se consideró adicionalmente a la viabilidad espermática como covariable, y para DA y MPD se incluyó la interacción entre época y raza.

Estos análisis se realizaron tanto con los valores originales de las variables respuesta, como utilizando la transformación arcoseno. Sin embargo, dado que los resultados de los análisis no variaron con la transformación, se decidió utilizar los resultados de los análisis de varianza con los valores originales.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Fase de predilución

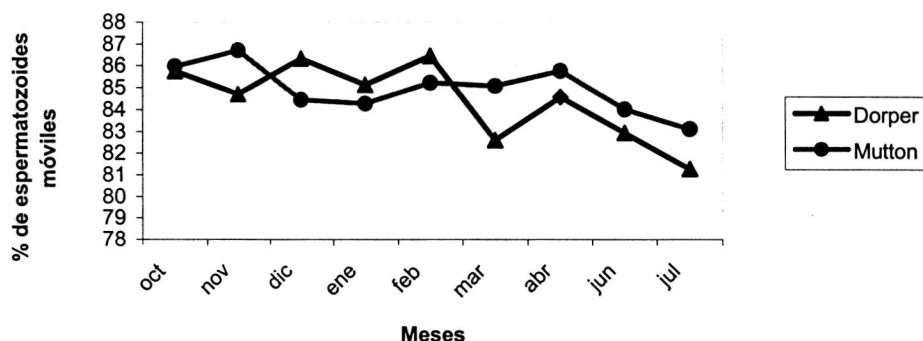
6.1.1. Fase de predilución por mes

En el Cuadro 9 se presenta el análisis de varianza para la motilidad espermática predilución (MPRED), considerando como efectos principales al mes y la raza, de la misma manera la concentración espermática fue valorada como covariable. Se encontró que la MPRED estuvo influenciada ($P < 0.02$) por la interacción mes por raza.

Cuadro 9. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución considerando el efecto de mes

FV	GL	CM	FC	Pr>F
Mes	8	16.552	3.62	0.0007
Raza	1	4.821	1.05	0.3062
Mes * Raza	8	10.842	2.37	0.0193
Concentración	1	76.989	16.82	0.0001
Residual	168	4.576		
Total	187			

En la Gráfica 1 se presenta la variación en cuanto a la MPRED en función del mes y la raza del semental. En ambas razas se observa una tendencia de disminución de la motilidad espermática a partir del mes de febrero. Sin embargo, la variación en motilidad a través de los meses depende de la raza.



Gráfica 1. Porcentaje de la motilidad espermática predilución de machos Dorper y Mutton Merino en función del mes

Vivanco (1983) citado por el mismo autor en (1998), menciona que la interacción significativa entre raza y ambiente es típica en la mayoría de los estudios y que además, la interacción de raza con mes en características seminales denota la diferente capacidad de adaptación de las distintas razas en los diferentes ambientes.

Mandiki *et al.* (1998) mencionan que la producción de espermatozoides, volumen y motilidad se incrementan durante los meses de agosto a diciembre y declinan en los meses de marzo y junio, esto al estudiar la influencia del mes y edad sobre tamaño testicular, calidad seminal y capacidad reproductiva en las razas Texel, Suffolk e Ile-de-France. Lo antes mencionado corrobora en gran medida los resultados de este estudio, ya que la mayor motilidad se presenta en los meses de octubre a febrero independientemente de la raza.

Osinowo *et al.* (1988) reportan motilidades espermáticas en la raza ovina Yankasa de 82% en carneros de 10 meses de edad, de la misma forma reportan interacción entre la edad y el día de colección. Vivanco (1998) menciona que el efecto del mes, si es que no

esta ligado al efecto estacional, es también bastante arbitrario y depende en su mayoría del efecto de la región geográfica y refleja variaciones climáticas.

En el caso de la covariable concentración que resultó altamente significativa ($P < 0.01$) se estimó que por cada unidad porcentual que se incrementa la concentración espermática, la motilidad del semen predilución se incrementa un 0.22%.

El Cuadro 10 presenta las características evaluadas para cada eyaculado en los distintos meses de duración del estudio. Se denota claramente que estas características son mucho mejores en los meses de octubre a febrero; sin embargo, durante los meses de marzo a julio los porcentajes bajan significativamente, lo cual puede estar influenciado por la capacidad del testículo para producir andrógenos, debido a que a medida que se incrementa la temperatura ambiental, esta capacidad disminuye, independientemente de la raza, todo esto causado por las altas temperaturas que se presentan en los meses de marzo a julio (Hafez, 1994).

Cuadro 10. Promedios mensuales para las características volumen, color, normalidad, concentración, viabilidad y motilidad del semen ovino

Mes	Volumen		Color		Normalidad		Concentración*		Viabilidad		Motilidad	
	MEDIA	D. E	MEDIA	D. E	MEDIA	D. E	MEDIA	D. E	MEDIA	D. E	MEDIA	D. E
Octubre	1.12a	0.21	2.50a	0.50	88.59a	2.29	3020.41b	344.57	88.27a	2.70	85.87a	0.35
Noviembre	1.10a	0.17	3.00a	0.00	89.65a	3.53	4176.61a	660.28	89.04a	2.99	85.71a	0.46
Diciembre	1.11a	0.19	3.00a	0.00	86.57a	3.22	3640.86b	250.44	88.28a	1.43	85.39a	0.65
Enero	1.16a	0.25	3.00a	0.00	86.66a	1.86	3430.00b	206.30	85.33a	1.36	84.69a	0.94
Febrero	1.02a	0.27	2.72a	0.45	91.45a	2.77	3131.82b	358.60	84.72a	4.02	85.84a	0.47
Marzo	1.02a	0.32	2.45a	0.50	88.36a	2.73	3109.09b	355.51	86.36a	3.36	83.83b	0.47
Abril	1.02a	0.12	2.28a	0.46	85.42a	2.82	3115.71b	172.03	85.85a	2.03	85.18a	0.59
Junio	1.00a	0.37	2.00a	0.00	83.00a	2.39	2658.50c	236.78	84.25a	1.58	83.53b	0.81
Julio	1.01a	0.15	2.00a	0.00	83.16a	1.85	2646.67c	231.64	82.83a	1.74	82.19c	0.73

Medias con la misma literal por columna no presentan diferencias significativas ($P > 0.05$)

* La concentración está expresada en millones por mililitro.

Dufour *et al.* (1984) con base en un estudio realizado en dos razas de ovinos (Suffolk y Dorset), encontraron que la máxima producción espermática se registra durante los meses de noviembre a enero y la mínima se presenta en el mes de julio. En el mismo estudio mencionan que la motilidad espermática cambia significativamente de acuerdo con el mes del año, ya que la máxima motilidad se presentó en los meses de octubre y noviembre (72%) y la mínima se observó en los meses de mayo y julio (50%), existiendo además diferencias entre machos y razas.

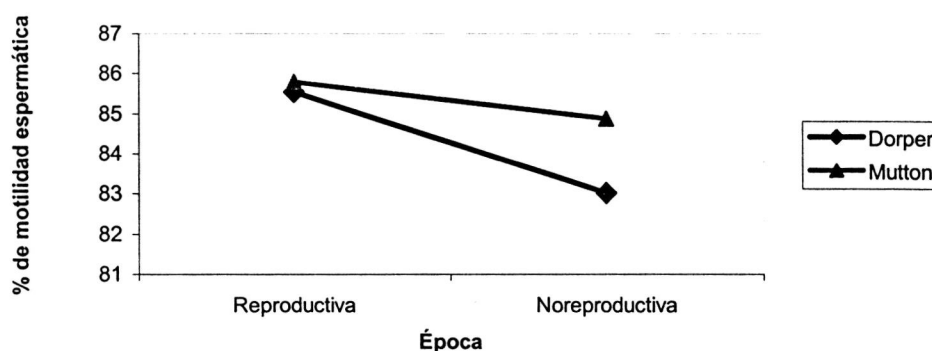
6.1.2. Fase de predilución por época

El Cuadro 11 presenta el análisis de varianza para motilidad espermática predilución considerando el efecto de época. Se encontró que la motilidad espermática predilución está influenciada ($P<0.03$) por la interacción época por raza. De la misma manera se encontró que la concentración espermática fue altamente significativa ($P<0.01$) y la viabilidad espermática resultó significativa ($P<0.09$). En el caso de la concentración espermática, por cada punto porcentual que se disminuye esta covariable la motilidad se ve reducida en un 0.22%. Por otra parte por cada punto porcentual que la viabilidad baja durante la época no reproductiva con respecto a la época reproductiva la motilidad espermática se ve disminuida en un 0.094%.

Cuadro 11. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución considerando el efecto de época

FV	GL	CM	FC	Pr>F
Época	1	88.05654112	17.61	0.0001
Raza	1	41.32506236	8.26	0.0045
Época * Raza	1	24.87828570	4.97	0.0269
Concentración	1	308.11265265	61.61	0.0001
Viabilidad	1	15.07899016	3.02	0.0842
Residual	182	5.00083856		
Total	187			

En la Gráfica 2 se presenta la variación de la motilidad espermática predilución en función de la época y la raza del semental. Se observa que la motilidad espermática predilución se ve disminuida en mayor grado en la época no reproductiva, pero esto depende en gran medida de la raza, ya que la raza Dorper manifiesta una mayor caída en esta variable si se compara con la otra raza en la misma época. Daza (1997), menciona que el efecto de la época es variable según la raza y parámetro seminal considerado. De la misma manera Vivanco (1998) menciona que la producción de semen y sus características están afectadas por factores genéticos y ambientales, siendo de mayor importancia los factores ambientales.



Gráfica 2. Porcentaje de la motilidad espermática predilución en función de la raza y la época

Colas (1979) menciona que la calidad del semen de carnero depende de la época de colección y que se obtienen mejores eyaculados y por lo tanto mayores porcentajes de fertilidad durante la época reproductiva, la cual está comprendida durante los meses de septiembre a febrero en el Hemisferio Norte. Lo anterior confirma los resultados obtenidos en este estudio, ya que los mejores eyaculados en las dos razas en estudio se obtuvieron en la época reproductiva comprendida entre los meses de octubre a febrero.

Karagiannidis *et al.* (2000b) al utilizar machos de 3 razas caprinas en las cuales determinaron sus características seminales a lo largo de todo un año, encontraron que la motilidad espermática durante la época reproductiva fue significativamente mayor ($P<0.001$) comparada con la observada en la época no reproductiva en 3 de las 5 razas utilizadas (Alpina: 64.04 y 55.11%, respectivamente; Saanen: 68.73 y 59.64%, respectivamente; y Damasco: con 69.04 y 61.04%, respectivamente).

Ibrahim (1997) menciona que la estación del año ejerce un marcado efecto sobre las características seminales, reportando que el semen obtenido en las estaciones de otoño e invierno no fue significativamente diferente ($P>0.05$), sin embargo, con respecto a las otras dos estaciones del año resultó altamente significativo ($P<0.001$). Los días largos y las altas temperaturas, tienen un marcado efecto sobre la actividad sexual y los atributos seminales de los carneros y de machos cabríos.

Fresno *et al.* (2000) trabajando con 10 machos cabríos adultos encontraron, diferencias significativas ($P<0.05$) en las características del semen caprino al ser estudiado en dos épocas distintas. El volumen y la concentración afectaron de manera directa a la motilidad espermática, siendo de mayor calidad los eyaculados obtenidos en la época reproductiva, lo anterior avala lo mostrado en el Cuadro 11.

En el Cuadro 12 se presentan las características evaluadas de los eyaculados ovinos en función de la época de estudio. Se observó que las características concentración, viabilidad y motilidad espermática son de mejor calidad en la época reproductiva, en comparación con las muestras obtenidas en la época no reproductiva.

Cuadro 12. Promedios por época para las características volumen, color, normalidad, concentración, viabilidad y motilidad del semen ovino

Época	Volumen		Color		Normalidad		Concentración*		Viabilidad		Motilidad	
	Media	D. E	Media	D. E	Media	D. E	Media	D. E	Media	D. E	Media	D. E
Reproductiva	1.10a	0.21	2.78a	0.41	86.13a	3.24	3526.32a	692.54	87.81a	3.29	85.66a	0.20
No Reproductiva	1.02a	0.25	2.25a	0.43	85.75a	3.38	2947.29b	350.23	85.17b	2.86	83.95b	0.32

Medias con la misma literal por columna no presentan diferencias significativas ($P>0.05$)

* La concentración está expresada en millones por mililitro.

Sinha y Singh (2000) encontraron diferencias significativas ($P<0.01$) entre 5 razas de caprinos, para las características volumen, motilidad masal, viabilidad y concentración espermática. La época del año sólo fue significativa ($P<0.05$) para viabilidad y normalidad. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio.

Karagiannidis *et al.* (2000a) al realizar un estudio para la evaluación de las características seminales a lo largo de todo un año en dos razas ovinas (Chios y Friesian), encontraron que el volumen en la estación no reproductiva en la raza Chios fue de 1.34, mientras que para la raza Friesian fue de 1.28, sin embargo, en la época reproductiva fueron de 1.52 y 1.51, respectivamente. La concentración espermática para la raza Chios fue de 3,640 y 4,360 millones por mililitro en la época no reproductiva y reproductiva, respectivamente. Mientras tanto esta misma característica para la raza Friesian fue de 3,820 y 4,255. En lo concerniente a la motilidad espermática se encontró que durante la época no reproductiva fue de 70 y 69% respectivamente, mientras que en la época reproductiva fue de 74 y 73%, respectivamente. Lo anterior corrobora los resultados mostrados en el Cuadro 12, en el cual se denota que las características macro y microscópicas de los eyaculados obtenidos en la época reproductiva son de mejor calidad que los obtenidos en la época no reproductiva.

6.2. Fase de postdescongelación

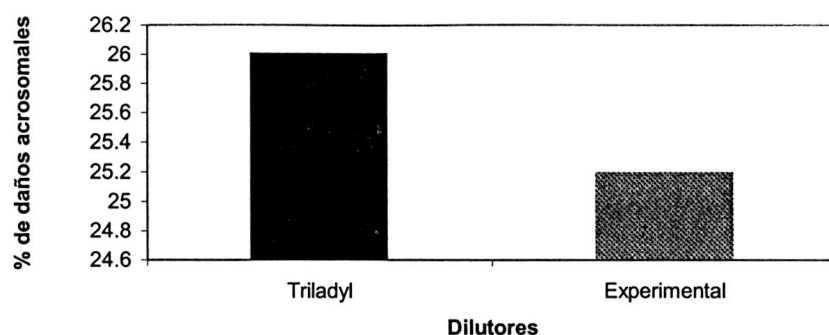
6.2.1. Fase de postdescongelación por mes

La criopreservación del semen de las dos razas ovinas en estudio (Dorper y Mutton Merino) se realizó en nitrógeno líquido evaluando las variables de respuesta daños acrosomales (DA) y motilidad postdescongelación (MPD), tomando como efectos principales el dilutor, la raza y el mes. En el Cuadro 13 se muestra el análisis de varianza para daños acrosomales de los espermatozoides al realizarse la descongelación.

Cuadro 13. Análisis de varianza de la variable daños acrosomales considerando el efecto de mes

FV	GL	CM	FC	Pr>F
Dilutor	1	30.72340426	1.62	0.2006
Mes	8	60.95195633	3.27	0.0017
Raza	1	1.69602662	0.09	0.7631
Residual	177	18.61336221		
Total	187			

El dilutor no tuvo un efecto significativo ($P>0.20$), sobre el porcentaje de daños acrosomales de los espermatozoides. Es decir que al utilizar el dilutor de carácter comercial Triladyl o el preparado en el laboratorio, el porcentaje de daños acrosomales después del descongelado fue similar entre los 2 dilutores ($P>0.02$). Lo anterior se esquematiza en la Gráfica 3.



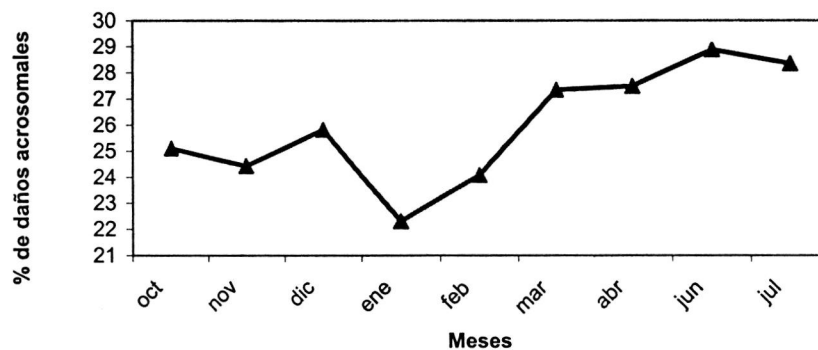
Gráfica 3. Porcentaje de daños acrosomales de los espermatozoides en semen descongelado utilizando los dilutores Triladyl y Experimental

Cooper *et al.* (1996) mencionan que al utilizar dilutores con base en Tris-citrato, así como a base de leche, se logra una buena protección de las membranas celulares, ya que los porcentajes de daños acrosomales fueron de 13.7 y 27.5 %, respectivamente. Lo anterior concuerda con lo obtenido en el presente trabajo, ya que los porcentajes de daños acrosomales varían de un 25.2% cuando se utilizó el dilutor experimental a un 26% al utilizar el dilutor comercial. Cabe señalar que Molina *et al.* (1994), reportaron que la integridad del acrosoma está determinada por el tiempo de incubación ($P < 0.001$) y las diferencias entre eyaculados ($P < 0.01$) y no así por la composición del dilutor o la concentración del azúcar utilizada. Lo anterior de cierta manera contradice los resultados obtenidos en el presente estudio ya que independientemente del tiempo de incubación los porcentajes de daños en el acrosoma en los dilutores con base en Tris- glucosa- ácido cítrico inmediatamente después de la descongelación son altos.

De las Haras *et al.* (1996) encontraron que al utilizar un dilutor a base de Tris-yema de huevo para conservar semen fresco y congelado de ovinos, se presentan porcentajes de daños en el acrosoma muy divergentes, ya que al evaluar los daños acrosomales para

semen fresco mantenido a 37 °C durante la primera hora solo obtuvo un 2%, sin embargo, al evaluar el semen de la misma muestra inmediatamente después de la descongelación encontraron que los daños en el acrosoma se incrementaron hasta un 17%, pero a medida que transcurría el tiempo el porcentaje se incrementó hasta un 80%, lo cual se atribuye al efecto de la enzima amidasa responsable de la conversión de la proacrosina en acrosina.

Los daños del acrosoma varían ($P < 0.002$) a través de los meses, ya que el menor porcentaje de los mismos se presentó en los meses de noviembre, enero y febrero y en contraparte este porcentaje se elevó considerablemente en los meses de junio y julio, como lo muestra la Gráfica 4.

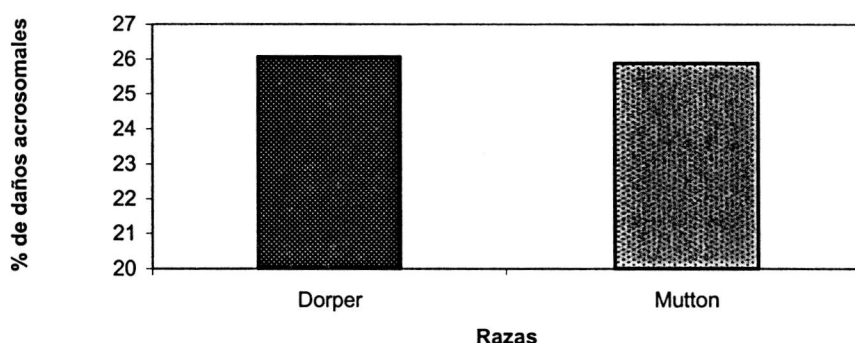


Gráfica 4. Porcentaje de daños acrosomales en espermatozoides postdescongelación a través de los meses

Saacke *et al.* (1968) mencionan que los daños acrosomales están íntimamente relacionado con los procesos espermatogénicos, ya que durante los meses de mayor incidencia de calores (mayo-agosto) se presentan mayores porcentajes de daños acrosomales en semen de toros Holstein. La temperatura de incubación no afecta la mayor o menor presentación de daños en el acrosoma, pero sí el tiempo de incubación,

según lo reportan Gómez *et al.* (1997) quienes encontraron un 33.5% de espermatozoides con daños en el acrosoma al inicio de la incubación a 30 y 39 °C. Sin embargo, después de una hora, reportaron porcentajes de 60% a la temperatura de 30 °C y de 67% para los 39 °C. Lo anterior reafirma los resultados de el presente estudio, ya que los porcentajes de DA inmediatamente después de la descongelación fueron similares.

La raza no afectó significativamente ($P>0.76$) el porcentaje de daños acrosomales, encontrando similares porcentajes para ambas razas lo cual se muestra en la (Gráfica 5).



Gráfica 5. Porcentaje de daños acrosomales de espermatozoides en semen descongelado por raza del semental

Lambrechts *et al.* (2000) al realizar un experimento con dos líneas genéticas de la raza Merino, encontraron que el porcentaje de DA fue de 26.6 y 36.4% para la línea 1 y 2, respectivamente, existiendo diferencias significativas ($P<0.05$) entre líneas dentro de la misma raza, lo cual es diferente a lo obtenido en presente estudio.

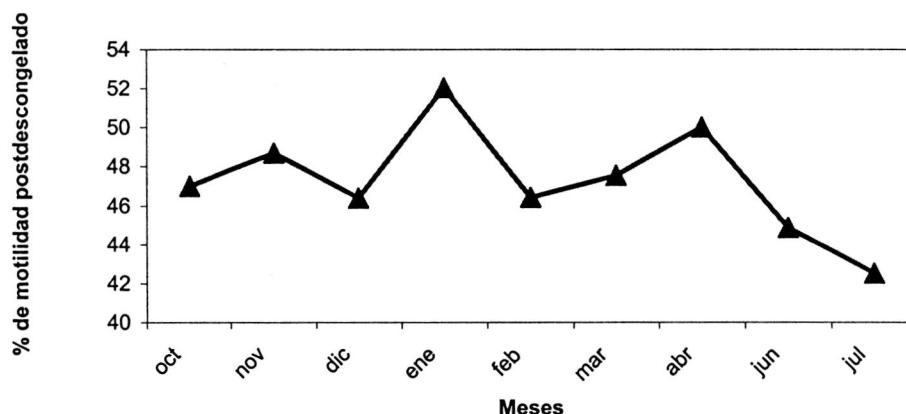
Al realizar el análisis de varianza para la motilidad espermática postdescongelación (MPD) como se muestra en el Cuadro 14, se encontró que el efecto del mes resultó

altamente significativo ($P<0.002$), con lo cual se puso de manifiesto que las condiciones ambientales, influyen en gran medida en los resultados postdescongelación de los espermatozoides.

Cuadro 14. Análisis de varianza de la variable motilidad postdescongelado considerando el efecto del mes

FV	GL	CM	FC	Pr>F
Dilutor	1	34.89893617	1.78	0.1843
Mes	8	85.11102092	4.33	0.0001
Raza	1	61.91045281	3.15	0.0776
Residual	177	19.64647378		
Total	187			

En la Gráfica 6 se muestra la variabilidad de la motilidad espermática postdescongelación en función del mes estudiado, encontrándose que durante los meses de junio y julio se presentan los menores porcentajes de motilidad, lo cual puede deberse a la calidad del líquido seminal afectado por las altas temperaturas en dichos meses.

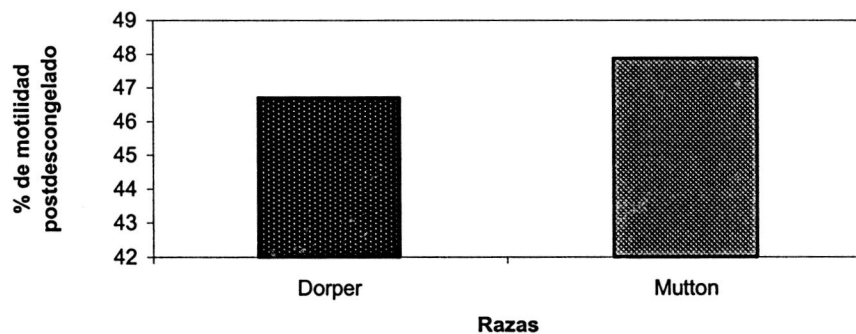


Gráfica 6. Porcentaje de motilidad postdescongelación de semen ovino a través de los meses

Las diferencias entre los eyaculados de distintos machos puede deberse a diferencias en los constituyentes del líquido seminal, los cuales son aportados por el epidídimo o glándulas accesorias; estos componentes le confieren al espermatozoide mayor o menor

resistencia durante el congelamiento y descongelamiento (Way *et al.*, 1995), lo cual podría explicar la variación entre muestras que congelan perfectamente y muestras que no congelan aun proviniendo de un mismo macho.

El efecto de la raza resultó significativo ($P < 0.08$) para motilidad postdescongelado, ya que la raza Mutton Merino presentó un porcentaje ligeramente mayor al encontrado en la raza Dorper (Gráfica 7).

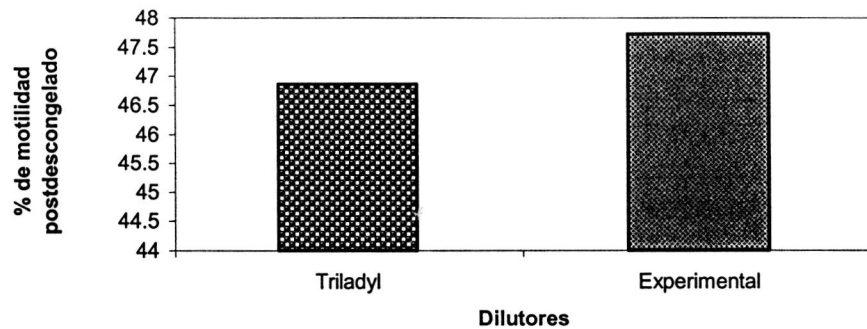


Gráfica 7. Porcentaje de motilidad postdescongelado de espermatozoides ovinos de acuerdo con la raza del semental

El-Alamy y Foote (2001) encontraron que la motilidad individual postdescongelado para la raza Finn fue de 63% y de la raza Dorset fue de 62%, no encontrando diferencias significativas entre razas ($P > 0.05$) para esta variable. Los resultados son contrarios a los obtenidos en el presente estudio.

El dilutor no tuvo efecto significativo ($P > 0.20$) para MPD, lo cual se muestra en la Gráfica 8. En esta gráfica se observa que los porcentajes de espermatozoides con movimiento progresivo de acuerdo con el dilutor son muy similares, lo cual indica que

cualquiera de los dos dilutores pueden utilizarse para congelar semen de carnero, sin afectar la motilidad después del descongelamiento.



Gráfica 8. Porcentaje de motilidad espermática después del descongelamiento de semen ovino utilizando los dilutores Triladyl y Experimental

Resultados similares fueron reportados por Rasul *et al.* (2000), quienes evaluaron el porcentaje de motilidad inmediatamente después del descongelado, utilizando el sistema visual, obteniendo diferencias significativas ($P < 0.07$) al utilizar diferentes buffers, ya que se observaron porcentajes de 60% para HEPEST, 53% para TCA y 48% para Citrato. Gil *et al.* (2000) encontraron que los porcentajes de motilidad masal inmediatamente después de ser descongelada la muestra fueron de 57.5% cuando se utilizó un dilutor a base de leche, mientras que al determinar la motilidad individual encontraron que el porcentaje disminuía hasta un 46.5%. Al realizarse la comparación de motilidad masal contra motilidad individual, cuando utilizaron un dilutor a base de Tris-citrato-fructosa, obtuvieron porcentajes de 43.8 y 33.7%, respectivamente.

Fiser *et al.* (1987) reportaron motilidades postdescongelado de 43% al utilizar un dilutor a base de Tris-fructosa y una tasa de congelamiento rápida; la motilidad no varió al

utilizar una tasa de congelamiento lenta ya que está sólo bajo (0.5%). Sánchez-Partida *et al.* (1998) reportaron motilidades postdescongelado de 70, 65, 60 y 58% al utilizar un dilutor a base de Tris-citrato, el cual se suplementó con prolina y glicina en diferentes concentraciones. Es importante mencionar que los resultados fueron generados durante la primera hora de incubación en baño maría a 37 °C.

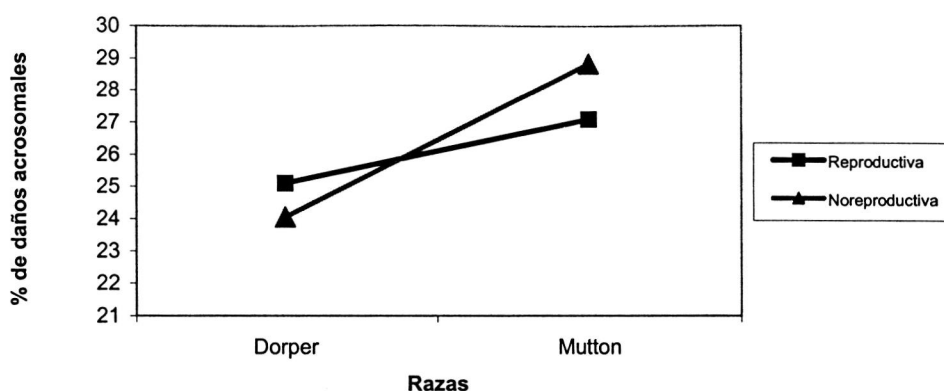
6.2.2. Fase de postdescongelación por época

El análisis de varianza para daños acrosomales cuando se consideró el efecto de la época se muestra en el Cuadro 15; se encontró un efecto significativos de la interacción época por raza ($P<0.05$), lo cual indica que las diferencias en DA entre épocas depende de la raza del semental.

Cuadro 15 . Análisis de varianza para la variable daños acrosomales considerando el efecto de la época

FV	GL	CM	FC	Pr>F
Dilutor	1	30.722340426	1.70	0.1941
Época	1	440.76243554	24.37	0.0001
Raza	1	4.55294044	0.25	0.6164
Época * Raza	1	74.94477163	4.15	0.0432
Residual	183	18.08374787		
Total	187			

En la Gráfica 9 se muestra la proporción de daños de daños acrosomales de espermatozoides en semen descongelado, de acuerdo con la época y raza. El porcentaje de DA fue mayor (25%) en la época reproductiva que en la época no reproductiva (24%) cuando se consideró a la raza Dorper, sin embargo, lo contrario se observó cuando se consideró la raza Mutton Merino, ya que esta presenta porcentajes de 25 y 29%, respectivamente.



Gráfica 9. Porcentaje de daños acrosomales de espermatozoides en semen descongelados de acuerdo a la época y raza del semental

Aisen *et al.* (2000) encontraron que los daños acrosomales del semen de carneros F1 (Friesian x Corriedale) obtenido durante la época reproductiva y diluidos en un dilutor con base de Tris-citrato-fructosa, fue de 32.7%. Valcárcel *et al.* (1997) estudiando machos de la raza Merino menciona que sólo de un 10 a un 15% de los espermatozoides viables después de la descongelación presentan acrosomas intactos, mientras que de un 45 a un 50% de la población total muestran acrosomas perdidos o dañados.

Tamuli y Watson (1994) reportaron porcentajes de daños acrosomales dentro de la época reproductiva en carneros de un $13.67 \pm 1.0\%$ al utilizar eosina-nigrosina-giemsas; sin embargo, este colorante no permite distinguir con claridad la región post-acrosomal, ya que se forma una coloración púrpura en el extremo que no se detecta fácilmente con el microscopio convencional de luz.

Byrne *et al.* (2000) mencionan que independientemente del macho o raza cuya fertilidad con semen congelado se ha probado en un gran número de veces, el porcentaje de daños

acrosomales puede ser alto al utilizar tasas de congelamiento rápida (39.7%); de la misma forma, al utilizar una tasa de congelamiento lenta, los autores también reportan porcentajes de acrosomas dañados considerables (36%), con lo cual deben de existir muchos otros factores que afecten de sobremanera a dicha variable.

El dilutor no tuvo efecto significativo ($P>0.19$) en la incidencia de daños acrosomales. O'Neill *et al.* (2002) mencionan que no sólo el dilutor, la época y la raza afectan la proliferación de daños en el acrosoma, si no que puede ser afectada también por la curva de congelamiento, ya que al comparar curvas de congelamiento rápido, intermedio y lento encontraron que el porcentaje de espermatozoides con pérdidas del acrosoma con tasas de congelamiento lento fue mayor (43.9%) que el obtenido con tasas de congelamiento rápido (36.6%).

El Cuadro 16 muestra los resultados del análisis de varianza para la motilidad postdescongelado considerando el efecto época. Se encontró que sólo hubo efecto significativo ($P<0.10$) de la raza del semental. En el presente estudio, los carneros Mutton Merino presentaron porcentajes de motilidad postdescongelado ligeramente mayores (48%) a los presentados por los machos de la raza Dorper.

Cuadro 16 . Análisis de varianza de motilidad postdescongelado considerando el efecto de época

FV	GL	CM	FC	Pr>F
Dilutor	1	34.89893617	1.55	0.2148
Época	1	34.04424594	1.51	0.2205
Raza	1	62.88297993	2.79	0.0965
Residual	183	22.52420472		
Total	187			

Edward *et al.* (1995) mencionan que existe una gran variabilidad en cuanto a las características individuales de un eyaculado provenientes del mismo macho, con lo cual estas diferencias se deben maximizar al tratarse de machos de diferentes razas, cuyas características en cuanto a la motilidad espermática pueden ser atribuidas a factores genéticos o en un determinado momento a la composición química del dilutor.

La motilidad postdescongelado puede verse afectada por el macho o por el dilutor según lo reportado por Van Wagtendonk *et al.* (2000) quienes mencionan que la motilidad postdescongelación puede variar de 35% hasta un 43% de acuerdo al macho y dilutor utilizados. Los resultados antes mencionados son similares a los obtenidos en el presente estudio.

El dilutor no presentó efecto significativo ($P>0.21$) para MPD. Molina *et al.* (1994) mencionan que los crioprotectores así como su concentración afectan la motilidad espermática postdescongelado; cuando utilizaron 6% (v/v) de glicerol en el dilutor, obtuvieron la mejor motilidad (46%). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que los dilutores utilizados también contenían en su formulación un 6% de glicerol y se obtuvieron porcentajes de 47% para el dilutor Triladyl y 48% para el dilutor experimental. Sin embargo, Anzar y Graham (1996) reportaron motilidades postdescongelado de semen de toro superiores (68%), a las del presente estudio. El-Alamy *et al.* (2001) quienes reportaron motilidades postdescongelación de 71% para dilutores a base de tris-yema de huevo, mientras que la motilidad en dilutores a base de leche fue de un 64%.

7. CONCLUSIONES

- a)** Las características espermáticas predilución (concentración y motilidad) en machos Dorper y Mutton Merino son afectadas por el mes de recolección.
- b)** El porcentaje de daños acrosomales y motilidad postdescongelación no varían independientemente del dilutor empleado.
- c)** El porcentaje de daños acrosomales es afectado por el mes ó época en que se obtiene el eyaculado, y en el caso de la época varia en función de la raza.
- d)** La motilidad postdescongelación tendió a ser mayor en la raza Mutton Merino que en la raza Dorper.

8. IMPLICACIONES

- a)** El dilutor de carácter experimental puede emplearse en mayor escala debido a su fácil elaboración, bajo costo de producción y buenos resultados a nivel laboratorio.
- b)** Se deben congelar eyaculados obtenidos durante los meses de octubre a enero, ya que presentan mejores porcentajes de motilidad postdescongelado y menores incidencias de daños acrosomales.

9. LITERATURA CITADA

- Aalsoth, E. And Saacke, R. 1985. Morphological change of acrosome on motile bovine spermatozoa due to storage at 4° C . J. Reprod. Fert. 74:473-478.
- Abdel-Rahman, A. H., El-Belely, S.M., Al-Qarawi, A.A. and El-Mougy, A.S. 2000. The relationship between semen quality and mineral composition of semen in various ram breeds. Small Ruminant Research 38:45-49.
- Ahmad, K. and Foote, H. R. 1985. Motility and fertility of frozen bull spermatozoa in Tris-yolk y milk extenders containing amikacin sulfate. J. Dairy Sci. 68:2083-2086.
- Aisen, G. E., Alvarez, L. H., Venturino, A. and Garde, J. J. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. Theriogenology 53: 1053-1061.
- Amann, R. P., Johnson, L., Thompson. D. L. and Pickett, B. W. 1976. Dairy spermatozoa production, epididymal spermatozoa reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus Monkey. Biol. Reprod. 15:586-592.
- Anzar, M. and Graham, F. E. 1993. Filtration of bovine semen. I. Development of a sephadex ion-exchange filter. Animal Reproduction Science 31:187-195.
- Anzar, M. and Graham, F. E. 1993. Filtration of semen. II. Factors affecting the recovery rate of spermatozoa. Animal Reproduction Science 31:197-204.
- Anzar, M. and Graham, F. E. 1996. Role of sperm motility and acrosome integrity in the filtration of bovine semen. Theriogenology 45:513-520.
- Asher, W. G., Berg, K. D. and Evans, G. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. Animal Reproduction Science 62:195-211.
- Austin, C.R. and Short, R.V. 1982. Reproduction in Mammals (1) Germ Cells and Fertilization". Second edition. Cambridge University Press. London Great Britain. Pp.182.
- Becker-Silva, S. C., Marques, A. P. and Andrade, P. D. 2000. Sexual development in Saanen bucks from birth to 12 months old. *In*: 7th . International Conference on Goats. France. 15-21 of May. Pp.432.
- Beconi, M.T., Franca, C.R., Mora, N.G. and Affranchino, M.A. 1993. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. Theriogenology 40:841-851.
- Bravo, W. P., Skidmore, A.J. and Zhao, X. X. 2000. Reproductive aspect and storage of semen in camelida. Animal Reproduction Science 62:173-193.

- Bunge, R., Thomas, D. L., Nash, T. G. and Fernando, R. L. 1993. Performance of hair breeds and prolific wool breeds of sheep in southern Illinois: Effect of breed of service sire on lamb production of Suffolk and Targhee ewes. *J. Animal Sci.* 70:321-325.
- Byrne, P.G., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, P. J. and Boland, P. M. 2000. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility *in vivo* and *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 62:265-275.
- Caraty, A., Evans, N. P. and Fabre-Nys, C. J. 1995. The preovulatory gonadotrophin-releasing hormone surge: a neuroendocrine signal for ovulation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 49:245-255.
- Castañeda, C. J., Becerril, A. J. y Valencia, M. J. 1996. Efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes de la congelación o después de la congelación sobre la fertilidad, morfología acrosomal y motilidad de los espermatozoides. *Vet. México* 24. Pp.11-16.
- Christensen, P., Whitfield, H. C. and Parkinson, J. T. 1994. The use of bright-field microscopy in evaluating bovine acrosome reaction. *Theriogenology* 42:655-662.
- Clark, P., Fahy, G. M. and Karow, A. M. 1984. Factors influencing renal cryopreservation. II. Toxic effects of three cryoprotectants in combination with three vehicle solution in nonfrozen rabbit cortical slice. *Cryobiology* 21:274-284.
- Cloete, S. W. P., Snyman, M. A. and Herselman, M. J. 2000. Productive performance of Dorper sheep. *Small Ruminant Research* 36:119-135.
- Colas, G. 1979. Fertility in the ewes after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced estrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. *Livestock Production Science* 6:151-166.
- Colas, G. 1980. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reprod. Nutr. Develop.* 20:1787-1799.
- Colas, G., Guerin, Y., Leimare, Y., Montassier, Y. And Despieres, J. 1986. Variations saisonniers du diamètre testiculaire et de la morphologie des spermatozoides chez le bélier Venden et chez le bélier Texel. *Reprod. Nutr. Develop.* 26:863-875.
- Cooper, A. T., Wang, S., Liu, Y., Bunch, D. T. and Holyoak, R. G. 1996. A new method to evaluate the viability of cryopreserved ram semen using a resazurin reduction assay. *Theriogenology* 45:15-24.

- Curry, M. R., Millar, J. D. and Watson, P. F. 1994. Calculated optimal cooling rates for ram and human sperm cryopreservation fail to conform with empirical observations. *Biol. Reprod.* 51:1014-1021.
- Das, K. and Rajkonwar, C. D. 1996. Acrosomal changes of buck spermatozoa after equilibration and freezing in egg yolk citrate glycerol extender. *Indian Veterinary Journal* 35:35-40.
- Daza, A. A. 1997. *Reproducción y Sistemas de Explotación del Ganado Ovino*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. Pp.384.
- Deka, C. B. and Roa, R. A. 1986. Effect of glycerol level in Tris-based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology* 26:231-239.
- De las Haras, M. A., Valcárcel, A., Furnus, C., Pérez, L., Moses, D. and Baldassarre, H. 1996. Changes in sperm-bound amidase activity suggest subtle damage to ram sperm acrosome by freezing/thawing, not detected by light microscopy. *Animal Reproduction Science* 45:81-89.
- Delgadillo, A. J., Flores, A. J., Veliz, F. G. and Poindron, P. 2000. Photoperiodic treatment of bucks markedly improves the response of seasonally anovulatory goats to the male effect. *In* 7th. International Conference on Goats. France, 15-21 of may. Pp.396.
- Donoghue, M. A. and Wishart, J. G. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* 62:213-232.
- Dufour, J. J., Fahmy, H. M. and Minvielle, F. 1984. Season changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in ram with long or short breeding season. *J. Animal Sci.* 58:416-422.
- Duran del Campo A. 1980. *Anatomía y Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos*. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur. SRL. Uruguay. Pp.246.
- Echegaray T, J. L. 1991. *Uso de dilutores de semen y métodos de sincronización estral en la inseminación artificial de ovinos*. Tesis de Licenciatura. Departamento de Zootecnia UACH. Chapingo Estado de México.
- Edward, Y. A., Windsor, P. D., Purvis, W. I., Sánchez-Partida, G.L. and Maxwell, W. M. C. 1995. Distribution of variance associated with measurement of post-thaw function in ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:129-134.
- El-Alamy, M. and Foote, H. R. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset ram in multiples semen extenders. *Animal Reproduction Science* 65:245-254.

- Eldon, J. 1993. time of onset and potential length of the breeding season of Icelandic sheep: luteal activity. *Animal Reproduction Science* 34:101-109.
- Eppleston, J. Salamon, S. Moore, W. S. and Evans, G. 1994. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science* 36:211-225.
- Espinoza R, F. y Esquivel D. V. 1995. Inseminación Intrauterina en ovejas Suffolk. Tesis de Licenciatura del Departamento de Zootecnia Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. Pp.76.
- Evans, G. And Maxwell, W. M. C. 1987. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. Butterworths, Sydney. Pp.30-153.
- Fiser, S. P., Ainsworth, L. and Fairfull, W. R. 1987. Evaluation of new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* 28:599-607.
- Fresno, M., Alvares, S., Darmanin, N., Delgado, V. J., Leboeuf, B. and Terqui, M. 2000. Reproduction testis volume and semen production in Canarian Goats. *In: 7th. International Conference on Goats. France. Pp.439.*
- Fulkerson, W.J., Synnott, A.L. and Lindsay, D.R. 1982. Numbers of spermatozoa required to effect a normal rate of conception in naturally mated Merino ewes. *J. Reprod. Fétil.* 66:129-132.
- Gallegos, S. J., Pérez, H. P. and Albarran, A. 1999. Neuroendocrinología del ciclo reproductivo de la oveja. *In: memorias del 1^{er}. Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción de Rumiantes. 8, 9 y 10 de septiembre. C. P. Montecillos México. Pp.26.*
- García, C. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen. Instituto de Geografía. UNAM, México. Pp.39-42.
- Gillan, L. Evans, G. and Maxwel. W. M. C. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen- thawed ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:1031-1036.
- Gómez, C.M., Catt, W. J., Gillan, L., Evans, G. and Maxwell, W. M. C. 1997. Effect of culture, incubation and acrosome reaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa for *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 9:665-673.
- Gordon, I. 1997. Reproduction in Sheep and Goats. Vol.2. CAB. international. NY. USA. Pp:53-77.
- Gordon, I. 1999. Reproducción Controlada del Ganado Vacuno y Búfalos. Ed. Acribia, Zaragoza. España. Pp.45.

- Gorlach, A. 1999. Transferencia de Embriones en el Ganado Vacuno. Traducción a cargo de Susana Ortiz Blanco. Editorial Acribia, Zaragoza España. Pp.60-80.
- Hafez, E. S. E. 1994. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5ª. Edición. Ed. Mc-Graw-Hill. México, D. F. Pp.625.
- Halbert, G. W., Dobson, H., Walton, J. S., Shorpe, P. and Bukrell, B. C. 1990. Field evaluation of a technique for transcervical intra-uterine insemination of ewes. *Theorigenology* 33:1231-1243.
- Hammerstedt, R. H., Graham, J. K. and Nolan, J. P. 1990. Cryopresevation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11:73-88.
- Hammerttedt, H. R. 1996. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. *Animal Reproduction Science* 42:77-87.
- Haresign, W. 1992. Manipulation of reproduction in sheep. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 45:127-139.
- Hathaway, R. R. and Hartree, E. F. 1963. Observation on the mammalian acrosome: experimental removal of acrosome from ram and bull spermatozoa. *J. Reprod Fert.* 5:225-232.
- Holt, V. W. and North, R. D. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51:414-424.
- Holt, V. W. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science* 62:3-22.
- Hunter, F. H. R. 1987. Reproducción de los Animales de Granja. Editorial Acribia, Zaragoza. España. Pp.70-80.
- Ibrahim, A. S. 1997. Seasonal variation in semen quality of local and crossbred ram raised in the United Arab Emirates. *Animal Reproduction Science* 49:161-167.
- Johnon, L., Varner, D.D., Roberts, E.M., Smith, L.T., Keillor, E.G. and Scrutchfield, L.W. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* 60-61:471-480.
- Johnson, A.L., Weitze, F. K., Fiser, P. and Maxwell, C. M. W. 2000. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science* 62:143-172.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., Alexopoulos, C. and Amarantidis, I. 2000a. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian ram in Greece. *Small Ruminant Research* 37:125-130.

- Karagiannidis, A., Varsakeli, S. and Karatzas, G. 2000b. Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goats born and raised in Greece. *Theriogenology* 53:1285-1293.
- Lambrechts, H., Van-Niekerk, E. F., Cloete, P. W. S., Coetzer, A. W. and Van der Horst, G. 2000. Sperm viability and morphology of two genetically diverse Merino lines. *Reprod. Fertil. Dev.* 12:337-344.
- Langford, A. G., Shrestha, B. N. J. and Marcus, J. G. 1989. Repeatability of scrotal and semen quality measurements in ram in a short-day light regime. *Animal Reproduction Science* 19:19-27.
- Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62:113-141.
- López, S. A. 1999. Manejo reproductivo en pequeños rumiantes. *In: memorias del I^{er} Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción de Rumiantes.* 8, 9 y 10 de septiembre. C. P. Montecillos México. Pp. 95-127.
- López, S. A., González de Bulnes, A. y Santiago, M. J. 2001. Manejo reproductivo en pequeños rumiantes. *In: Memorias del 2^{do} Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción en Rumiantes.* 18 al 21 de septiembre. CP. Montecillos, México. Pp.1-21.
- Lorton, P. S., Sullivan, J.J. and Bean, B. 1988a. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. I. Evaluation of seminal quality. *Theriogenology* 29:503-517.
- Lorton, P.S., Sullivan, J.J. and Bean, B. 1988b. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. III. Evaluation of fertility. *Theriogenology* 29:609-614.
- Mandiki, M. N. S., Darrycke, G., Bister, L. J. and Paquay, R. 1998. Influence of season and age on sexual maturation parameters of Texel, Suffolk and Ile-de-France rams. 1. Testicular size, semen quality and reproductive capacity. *Small Ruminant Research* 28:67-79.
- Mann, T. 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Methuen. London. Pp.233-236.
- Martin, B. G. y Banchero, H. G. 1999. Nutrición y reproducción en rumiantes. *In: Memorias del 1^{er} Curso Internacional de Fisiología de la Reproducción de Rumiantes.* 8, 9 y 10 de septiembre. Montecillos, México. Pp.27-58.
- Maxwell, W. M. C. 1986. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Animal Reproduction Science* 10:309-316.

- Maxwell, W. M. C. and Waltson, P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal. Reproduction. Science* 42:55-65.
- Meza, H. C. A. and Ross, T. T. 2000. Factors affecting fertility and prolificity of dairy goats inseminated with frozen-thawed semen. *In: 7th. International Conference on Goats. France, 15-21 of may. Pp.476.*
- McLeod, B. J. and Phillips, D. J. 1998. Hormonal control of the reproductive processes. *In: Reproductive management of grazing ruminants in New Zealand. Occasional Publication 12 of the New Zealand Society of Animal Production. Ed. For Fielden and Smith. Pp.23-46.*
- Milne, C. H. 2000. The history of the Dorper sheep. *Small Ruminant Research* 36:99-102.
- Miller, S. J. 1980. Artificial Breeding Techniques in Sheep. *Current. Therapy in Theriogenology* 24:947-950.
- Molina, F. Evans, G., Quintana, C. and Maxwell, W.M.C. 1994a. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris. Base diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 38:113-116.
- Molina, F. C., Evans, G. and Maxwell, W. M.C. 1994b. Incorporation of penetrating cryoprotectants in diluents for pellet-freezing ram spermatozoa. *Theriogenology* 42:849-858.
- O'Neill, J. D., Hanrahan, P. J. and Boland, P. M. 2002. The effect of different freezing curves on the viability, mitochondrial activity and acrosome integrity of ram spermatozoa. *Animal Science* 70:213-217.
- Osinowo, O. A., Ahmed, M. S. and Ekpe, G. A. 1988. Semen quality and sperm output of Yankasa rams at different ages. *Theriogenology* 29:381-386.
- Parks, J. E. and Graham, J. K. 1992. Effects of cryopreservation procedure on sperm membranes. *Theriogenology* 38:209-222
- Parvizi, N. 2000. Neuroendocrine regulation of gonadotropins in the male and the female. *Animal Reproduction Science* 60-61:31-47.
- Price, E. O., Erharh, H., Borgwardt, R. and Dally, M. R. 1992. Measures of Libido and their relation to serving capacity in the ram. *J. Animal Sci.* 70:3376-3380.
- Pursel, V. G., Johnson, L. A. and Schalman, L. L. 1974. Acrosome morphology of boar spermatozoa during in vitro aging. *J. Anim. Sci.* 38:113-116.

- Rasul, Z., Anzar, M., Jalali, S. and Ahman, N. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 59:31-94.
- Rhim, T. J., Kuehl, D. and Jackson, G. L. 1993. Seasonal changes in the relationships between secretion of gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone, and testosterone in the ram. *Biol. Reprod.* 48:197-204.
- Rhind, M. S., Mckelvy, W. A. C., McMillen, S., Gunn, R. G. and Elston, D. A. 1989. Effect of restricted food intake, before and/or after mating, on the reproductive performance of Greyface ewes. *Anim. Prod.* 48:149-155.
- Rhind, M. S., Wetherill, G.Z. and Gunn, R.G. 1990. Diurnal profiles of LH, prolactin and progesterone and their inter-relationships in ewes in high or moderate levels of body condition. *Animal Reproduction Science* 24 :119-126.
- Robertson, L. and Watson, P. F. 1986. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. *J. Reprod. Fertil.* 77:177-185.
- Roca, J., Martínez, E., Sánchez-Valverde, A. M., Ruiz, S. and Vázquez, M. J. 1992. Seasonal variations of semen quality in male goats: study of sperm abnormalities. *Theriogenology* 38:115-125.
- Rodriguez, F. and Ruttle, J. L. 1986. Uso experimental de la *Aloe vera* procesamiento y conservación del semen de carnero. E. S. A. H. E. Ciudad Juárez, Chihuahua. México. Pp.18.
- Saacke, G. R., Amann, P. R. and Marshall, E. C. 1968. Acrosomal cap abnormalities of sperm form subfertile bull. *J. Animal Sci.* 27:1391-1400.
- Saacke, G. R., Dalton, C. J., Nadir, S., Nebel, L. R. and Bame, H.J. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science* 60-61:663-677.
- Salamon, G. A., Zamora, H. H., De Lucas, T. J. y Trejo, J. A. 1982. Anestro post-parto en Ovejas Criollas. *In: Memorias de la XVI Reunión de Investigación Pecuaria en México.* Pp.604- 608.
- Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. 1995a. Frozen storage of semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science* 37:85-249.
- Salamon, S. and Maxwell, W. M. C. 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science* 38:1-36.

- Salomon, S. and Maxwell, W. M. C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62:77-111.
- Sánchez-Partida, G. L., Setchell, P. B. and Maxwell, W. C. M. 1998. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post-thaw motility of ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 10:347-357.
- Sansone, G., Nastri, M.J.F. and Fabbrocini, A. 2000. Storage of buffale (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science* 62:55-76.
- Scott, M. A. 2000. A glimpse at spear function *in vivo*: spear transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science* 60-61:337-348.
- Shin, J. S., Lein, H. D. and Patten, H. V. 1988. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. II. Control of *Mycoplasmas*, *Ureaplasmas*, *campylobacter fetus subsp. Venerealis* y *Haemophilus somnus*. *Theriogenology* 29:577-591.
- Sinha, N. K., and Singh, D. 2000. Semen production in goats under tropic conditions. *In*: 7th. International Conference on Goats. France. Pp.441.
- Smith, F.J., Parr, J., Murray, G., Oliver, E.J., Beaumont, S. and Upreti, C. G: 1995. Effect of diluent type and time on the pregnancy rate of ewes inseminated laparoscopically with chilled ram semen. *Proceedings of the Zealand Society of Animal production*. Pp.245-247.
- SAS. 1998. SAS/STAT. User's Guide (Release 6.12) SAS Institute Inc, Cary, NC, USA.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. 1988. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2^a. Edición. Mc- Graw- Hill Interamericana. México. Pp.622.
- Steinholt, C. H., Chandler, E. J., and Tirado, V. 1991. Evaluating acrosome reaction steps with brightfield and differential interference contrast microscopy technique. *J. Dairy Sci.* 74:3822-3826.
- Sukardi, S., Curry, M. R. and Watson, P. F. 1997. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Animal Reproduction Science* 46:89-96.
- Tamuli, K. M. and Watson, F. P. 1994. Use of simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Reproduction Science* 35:247-254.
- Tasseron, F. Amir, D. and Schndler, H. 1977. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution cooling and freezing. *J. Reprod. Fertil.* 55:461-462.

- Telfer, E. E., Webb, R., Moor, R. M. and Gosden, R. G. 1999. New approaches to increasing oocyte yield from ruminants. *Animal Science* 68:285-298.
- Tervit, H. R., Goold, P. G., James, R. W. and Fraser, M. D., 1984. The insemination of sheep with fresh and frozen semen. *Proc. New Zeland Soc. Anim. Prod.* Pp.11-13.
- Thibier, M. and Guerin, B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62:233-251.
- Thwaites, G. J. 1995b. Effect of undernutrition on the size and tone of the ram's testes. *Small Ruminant Research* 16:283-286.
- Thwaites, G. J. 1995a. The comparative effects of undernutrition, exercise and frequency of ejaculation on the size and tone of the testes and on semen quality in the ram. *Animal Reproduction Science* 37:299-309.
- Valcárcel, A., De las Haras, M. A., Pérez, L., Moses, D. and Baldassarre, H. 1997. Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Animal Reproduction Science* 45:299-309.
- Van Wagtendonk-de Leeuw, M. A., Haring, M. R., Kaal-Lansberger, L. M. T. E. and den Daas, J. H. G. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* 54:57-67.
- Vargas C, J. S. y Vega, H. O. 1996. Inseminación Intrauterina en ovinos. Tesis de Licenciatura del Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo México. Pp.76.
- Vázquez, I., Graham, E. F. Martinez, F. Alcaide, M. and Soriano, I. 1986. Fertility with frozen ram semen in Manchego sheep. *In: 11th Internatinal Congr. on Anim. Reprod. and A. I. Dublin.* Pp.305.
- Visser, D. and Salomon, S. 1973. Fertility of ram spermatozoa frozen in Tris-based diluent. *Aust. J. Biol. Sci.* 26:513-516.
- Vishwanath, R. and Shannon, P. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Animal Reproduction Science* 62:23-53.
- Vivanco, M. W. 1998. Inseminación Artificial en ovinos. *In Memorias del Seminario Internacional Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y caprinos Chapingo México, 26-27 de Octubre.* Pp.135-194.
- Wallace, J. M., Bourke, D. A. and Aitken, R. P. 1999. Nutrition and fetal growth: Paradoxical effects in the overnourished adolescent sheep. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54:385-399.

- Walkden-brown, S. W. and Bocquier, F. 2000. Nutrition regulation of reproduction in goats. *In: 7th. International Conference on Goats. France, 15-21 of may. Pp.389-394.*
- Watson, F. P. 1975. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec. 97:12-15.*
- Watson, F. P. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen .*Marshall's Physiology of Reproduction . Reproduction in the Male . Edinburgo. Pp.747-869.*
- Watson, F. P., Jones, S. P. and Plummer, M. J. 1991. A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. *Animal Reproduction Science 24:93.108.*
- Watson, F. P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev. 7:871-891.*
- Way, L. A., Henault, A. M., and Killian, J, G. 1995. Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. *Theriogenology 43:1301-1316.*
- Yoshida, M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Animal Reproduction Science 60-61:349-355.*
- Zhao, Y. and Buhr, M. 1996. Localization of various ATPases in fresh and cryopreserved bovine spermatozoa. *Animal. Reproduction. Science. 44:139- 148.*

10. APÉNDICE

Cuadro 1. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución considerando el efecto de la época

FV	GL	CM	FC	Pr>F
Época	1	51.331	10.26	0.0016
Raza	1	18.016	3.60	0.0595
Época * Raza	1	18.256	3.65	0.0577
Concentración	1	142.328	28.45	0.0001
Viabilidad	1	7.723	1.54	0.2157
Volumen	1	1.185	0.24	0.6271
Color	1	7.726	1.54	0.2156
Normalidad	1	4.185	0.84	0.3616
Residual	179	5.003		
Total	187			

Cuadro 2. Análisis de varianza para motilidad espermática predilución considerando el efecto del mes

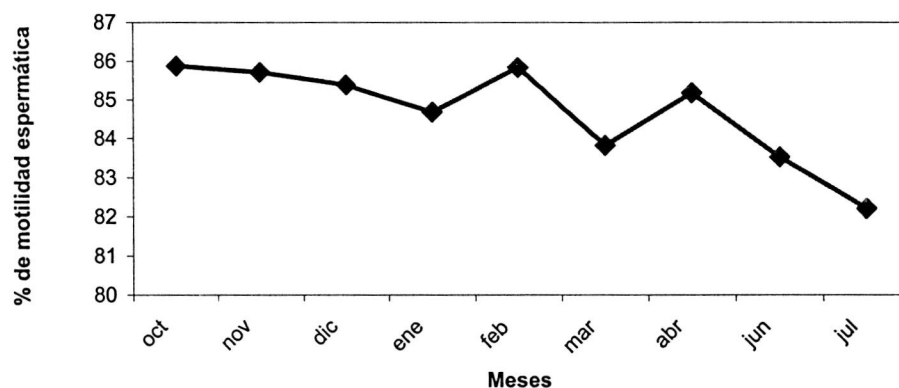
FV	GL	CM	FC	Pr>F
Mes	8	15.323	3.32	0.0015
Raza	1	0.335	0.07	0.7878
Mes * Raza	8	11.207	2.43	0.0166
Concentración	1	55.681	12.06	0.0007
Viabilidad	1	2.630	0.57	0.4514
Volumen	1	4.925	1.07	0.3031
Color	1	19.868	4.30	0.3960
Normalidad	1	0.183	0.04	0.8424
Residual	165	4.615		
Total	187			

Cuadro 3. Análisis de varianza para DA considerando el efecto de la época

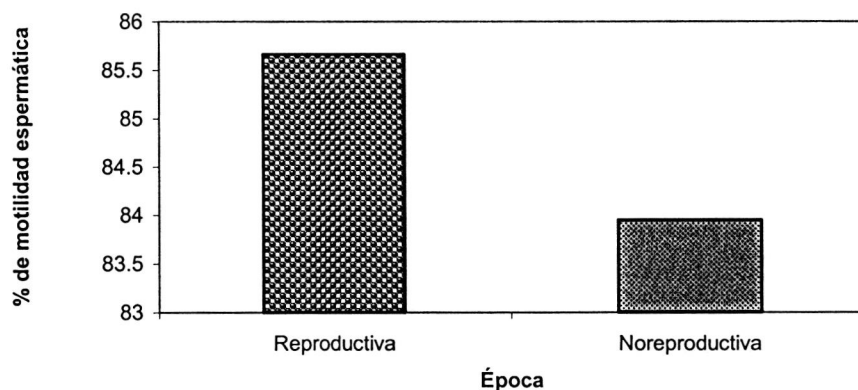
FV	GL	CM	FC	Pr>F
Dilutor	1	45.025	2.47	0.1174
Época	1	440.762	24.22	0.0001
Raza	1	4.553	0.25	0.6175
Dilt * Época	1	15.064	0.83	0.3641
Dilt * Raza	1	0.934	0.05	0.8209
Época * Raza	1	74.964	4.12	0.0438
Residual	181	18.195		
Total	187			

Cuadro 4. Análisis de varianza para DA considerando el efecto del mes

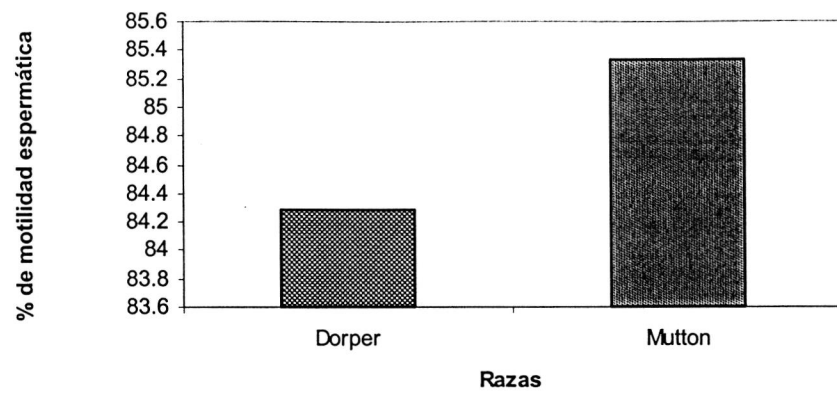
FV	GL	CM	FC	Pr>F
Dilutor	1	37.406	1.99	0.1603
Mes	8	65.699	3.49	0.0010
Raza	1	13.326	0.71	0.4011
Dilutor * Raza	1	0.926	0.05	0.8246
Dilutor * Mes	8	8.717	0.46	0.8802
Mes * Raza	8	26.961	1.43	0.1861
Residual	160	18.801		
Total	187			



Gráfica 1. Efecto del mes sobre la motilidad espermática predilución en ovinos



Gráfica 2. Motilidad predilución del semen ovino en época reproductiva y no reproductiva.



Gráfica 3. Motilidad espermática predilución de acuerdo a la raza

