

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**“EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACION Y FUENTE
DEL AGENTE GELIFICANTE EN LA CALIDAD Y
FERTILIDAD DE MUESTRAS SEMINALES DE
CARNEROS”**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:
INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

Guillermo Canchola García

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Juan González Maldonado

La presente tesis “EFECTO DEL TIEMPO DE CONSERVACION Y FUENTE DEL AGENTE GELIFICANTE EN LA CALIDAD Y FERTILIDAD DE MUESTRAS SEMINALES DE CARNEROS” fue realizada por Guillermo Canchola García y dirigida por el Dr. Juan González Maldonado, ha sido evaluada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

Consejo particular

DIRECTOR

Dr. Juan González Maldonado

SINODAL

Dr. Saúl Hernández Aquino

SINODAL

Dr. Rodrigo Flores Garivay

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la Universidad Autónoma de Baja California por darme la oportunidad de desarrollarme académicamente siempre con los valores y la calidad que esta universidad nos brinda, al Instituto de Ciencias Agrícolas por ser mi segunda casa durante varios años, al igual por ser parte de mi formación como alumno y como persona, por brindarme las herramientas necesarias para concluir con mis objetivos dentro de ella.

Al personal docente y administrativo que siempre estuvo para apoyar con las necesidades que se presentaban, por las enseñanzas de todos esos buenos maestros que de hoy en adelante serán parte de lo que yo logre en un futuro, gracias por brindarme su conocimiento, su tiempo y atención durante esta etapa.

Al Dr. Juan Gonzalez Maldonado, por ser un excelente profesor y persona dentro y fuera del aula, por apoyar y atender cuando se le requería, por demostrar esa dedicación e interés por enseñar a todos sus alumnos, por darme la oportunidad y confianza de trabajar y hacer posible este trabajo de investigación guiándome en todo momento y sobre todo por ser una de mis inspiraciones para seguir desarrollándome profesionalmente en el área de zootecnia.

DEDICATORIA

Especialmente dedicada a mis padres, Guillermo Canchola Magaña y Verónica García Ríos, por siempre ser mi apoyo incondicional, mi pilar y motivación para seguir adelante a pesar de los momentos difíciles que se llegaron a presentar, por darme la educación, el amor y los valores para ser una persona de bien, infinitamente gracias a ellos porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.

A mis hermanos y sobrinos, por ser parte de mi motivación de seguir adelante, por brindarme su apoyo y compañía que sin saberlo es de gran ayuda para seguir día con día.

A Dios por no dejarme solo en ningún momento, por ser mi apoyo en tantas ocasiones, por brindarme las oportunidades y las capacidades para poder sobre llevar todo lo que se me ha presentado, por cuidar de mi y de mi familia en todo momento.

A mis compañeros y amigos, que durante toda mi formación fueron motivo de alegría y apoyo para seguir adelante, que muchos otros fueron de gran influencia y dejaron enseñanzas muy agradables en mi persona.

ÍNDICE

Sección	Página
I. ÍNDICE DE CUADROS	vi
II. LISTA DE SÍMBOLOS / NOMENCLATURA	vii
III. RESUMEN	viii
IV. ABSTRACT	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. Revisión de literatura.....	2
2.2 Evaluación de muestras	4
2.3 Métodos tradicionales de conservación de muestras seminales.....	5
2.4 Uso de agentes gelificantes en la conservación de semen	7
2.6 Fertilidad y calidad de las muestras seminales después de su conservación en liquido	9
2.7 Sincronización y detección del celo en la oveja.....	10
2.8 Técnicas de inseminación artificial en ovinos.....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. OBJETIVO.....	16
5. HIPOTESIS.....	16
6. MATERIALES Y METODOS.....	17
6.1 Localización del área de estudio	17
Fase 1	17
6.2 Unidades y diseño experimental	17
6.3 Manejo de la muestra.....	18
6.4 Variables de respuesta	18
Fase 2	19
6.5 Unidades y diseño experimental	19
6.6 Manejo de la muestra.....	19
6.7 Variables de respuesta	19
Fase 3	20
6.8 Unidades y diseño experimental	20
6.9 Preparación y manejo de las muestras de semen	20

6.10 Sincronización del celo e inseminación artificial	21
6.11 Variable de respuesta	21
6.12 Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS	23
8. DISCUSION	25
9. CONCLUSION	28
10. LITERATURA CITADA	29

I. ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

Página

Cuadro 1. Influencia del tipo de agente gelificante en la conservación de semen de carnero refrigerado durante seis días en variables de viabilidad espermática.23

Cuadro 2. Influencia del tipo de agente gelificante en la conservación de semen de carnero después de ser expuesto a temperatura ambiente por cuatro horas.24

II. LISTA DE SÍMBOLOS / NOMENCLATURA

Símbolo/nomenclatura	Significado
°C	Grado Celsius
mL	Mililitros
cm	Centímetros
μL	Microlitro
pH	Potencial hidrógeno
LH	Hormona luteinizante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
mg	Miligramo

III. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto de la suplementación del diluyente de semen de carnero con gelificantes (grenetina y agar) durante su conservación en refrigeración y temperatura ambiente. Los tratamientos a evaluar fueron los siguientes: Control, Gelificante grado, Gelificante grado alimenticio. Las muestras de semen del grupo Control no fueron suplementadas con ningún agente gelificante. Las muestras de semen del grupo Gelificante grado bacteriológico fueron suplementadas con 6 mg de grenetina y 2 mg de agar del grado que se indica. Las muestras de semen del grupo Gelificante grado alimenticio fueron suplementadas con 6 mg de grenetina y 2 mg de agar del grado que se indica. Los tratamientos fueron conservados en refrigeración por 144 h, o a temperatura ambiente por 4 h. Además, se evaluaron los porcentajes de gestaciones de ovejas inseminadas con semen conservado con y sin la adición de gelificantes del grado alimenticio. Las variables de respuesta fueron el número de espermatozoides motiles, con motilidad progresiva, vivos, con buena integridad de membrana y el porcentaje de gestaciones. La suplementación de agentes gelificantes, sin importar la fuente utilizada, mejoró ($p < 0.05$) todas o algunas de las variables de respuestas evaluadas en las muestras de semen después de 4 y 144 h de conservación. Los porcentajes de gestación de las ovejas no fueron dependientes ($p > 0.05$) del tipo de semen utilizado. En conclusión, la suplementación de las muestras de semen de carnero con grenetina y agar mejora los porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva, motiles, vivos y con buena integridad de membrana durante su conservación en refrigeración o a temperatura ambiente.

Palabras clave: agar, gestaciones, grenetina, ovejas, ovinos.

IV. ABSTRACT

The present study aimed to measure the effect of gelling agents (gelatin and agar) supplementation on ram semen samples cold and room temperature stored. The treatments were: Control, Gelling bacteriological grade, and Gelling food grade. The semen samples in the Control group were not supplemented with gelling agents. The semen samples in the Gelling bacteriological grade group were supplemented with 6 mg of gelatin and 2 mg of agar. The semen samples in the Gelling feed grade group were supplemented with 6 mg of gelatin and 2 mg of agar. The treatments were either cold stored for 144 h or room temperature stored for four h. In addition, pregnancy rates were evaluated in a group of sheep inseminated with either ram semen samples stored with or without gelling supplementation. The response variables were the number of motile, with progressive motility, live, and good membrane integrity spermatozoa. The gelling supplementation, disregarding the source, improved all or some of the response variables evaluated after 4 and 144 h of cold and room temperature storage. The pregnancy rate in sheep was not affected by gelling supplementation. In conclusion, the ram semen supplementation with gelatin and agar improved the percentage of spermatozoa with progressive motility, motile, live, and good membrane integrity after cold and room temperature storage.

Key words: agar, gelatin, gestation, ovine, sheep.

1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas reproductivas han evolucionado continuamente para hacerlas más eficientes en cuanto a su propósito. El ámbito reproductivo es de gran importancia en las explotaciones ganaderas. Es por ello que se busca mejorar y dar cada vez más opciones viables a los productores de este sector para que su actividad económica sean más eficiente.

Una de las tecnologías reproductivas que más ha impactado el desarrollo, en todos los ámbitos, ha sido la inseminación artificial. Esto se debe a que normalmente se complementa con otras tecnologías, tales como extracción y conservación de semen, sincronización del celo y producción de embriones (Foote, 2002). El éxito de la inseminación artificial depende de varios factores, pero la calidad del semen utilizado es de gran importancia, ya que un semen de baja calidad producirá bajos porcentajes de gestaciones (Gibbons et al., 2019). Además, el tipo de semen a utilizar es trascendental, ya que el semen fresco ofrece mejores porcentajes de fertilidad que el congelado (Alvarez et al., 2019). Sin embargo, la vida media del semen mantenido en fresco y en refrigeración disminuye continuamente, a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento (López-Sáez et al., 2000), lo que limita considerablemente su uso masivo a nivel de unidad de producción. Sin embargo, es común que en unidades de producción especializadas se cuente con sementales de elevado valor genético, y se haga necesario el uso de semen fresco y refrigerado para la inseminación artificial.

Por tanto, con el objetivo de alargar la vida útil de este tipo de semen, se ha evaluado el uso de gelificantes, tales como grenetina (López-Sáez et al., 2000). Pero existe una gran diversidad de estas sustancias, tales como el agar (Saha & Bhattacharya, 2010). Pero su efecto en la calidad de muestras seminales de carnero no ha sido evaluado. Además, no existe información que mida el efecto de adicionar diferentes fuentes del mismo gelificante; por ejemplo, de grado alimenticio y bacteriológico. Lo

anterior es de gran relevancia, ya que la diferencia en el costo entre uno y otro es significativa, lo que pudiera limitar su adaptación a nivel de unidad de producción.

2. Revisión de literatura

2.1. Extracción de muestras seminales

La extracción de semen en carneros suele llevarse a cabo mediante la utilización de dos métodos principales. Estos son la vagina artificial y el electroeyaculador, pero también se puede hacer por aspiración testicular, canulación del ducto deferente y colectores vaginales (Ávalos-Rodríguez et al., 2018). Sin embargo, los dos primeros son los más utilizados a nivel de unidad de producción.

La vagina artificial es quizás el método más utilizado en la colecta de muestras seminales, especialmente en pequeños rumiantes. Esta consiste en un tubo rígido de plástico de 12 a 20 cm de largo y 4 a 10 cm de diámetro. El tubo porta una válvula en su exterior para introducir aire y agua. En la parte interna del tubo rígido se coloca una funda de látex, cuyos extremos se aseguran al tubo rígido. La vagina artificial se prepara con agua atemperada (42 °C y 45 °C), para simular la temperatura de la vagina (Ávalos-Rodríguez et al., 2018). En la parte final de la vagina artificial se coloca un cono, de látex o silicón, y un tubo colector. La colecta de semen con vagina artificial requiere que el macho sea entrenado. Generalmente, se utiliza una hembra en celo, la cual se inmoviliza para que macho pueda montarla de forma controlada. Una vez que el macho ha montado, se dirige el pene hacia el interior de la vagina artificial, para coleccionar el semen. Una alternativa al uso de hembras en celo, es el uso de objetos inanimados, pero el semental requiere acondicionamiento previo a hembras en celo (Flores et al., 2005)

El método de colecta de semen por electroeyaculación se basa en la contracción de las glándulas seminales mediante impulsos eléctricos enviados vía rectal. Este método de colecta suele utilizarse en machos que se muestran renuentes a eyacular con vagina artificial. No se requiere de una hembra en celo. El electro eyaculador

es un dispositivo de forma cónica, 2.5 cm de diámetro 15 cm de largo (Ávalos-Rodríguez et al., 2018). El procedimiento de colecta consiste en introducir el electro eyacular unos 15-20 cm en el recto del animal. Una vez introducido, se procede a realizar descarga eléctrica (6-10 V) sincrónicas hasta lograr la exteriorización del pene y la eyaculación. Es importante que el macho se encuentre bien sujetado en todo momento, ya que este método de colecta le resulta estresante (Edgar et al., 1956). En general, se observa un incremento en la frecuencia cardíaca y respiratoria, pateo, y contracciones musculares (Cameron, 1977).

En la comparación de los métodos de colecta de semen (vagina artificial y electro eyaculador, se asumen que la calidad de las muestras seminales es mayor en machos colectados con vagina artificial, ya esta recrea de mejor manera el proceso natural de eyaculación y es menos estresante (Jiménez-Rabadán et al., 2016). Además, la repetibilidad de los valores de calidad de las muestras seminales es mayor cuando se utiliza vagina artificial (Moore, 1985). En un estudio donde se compararon los dos métodos de colección de semen, se obtuvo una mayor concentración de semen (1.6 vs 1.1 millones de células espermáticas por mililitro de semen) y un mayor porcentaje de espermatozoides vivos (60.5 vs 49.9%) en muestras de semen de carnero obtenidas con vagina artificial en comparación con el electro eyaculador (Mattner & Voglmayr, 1962).

Otros métodos de colecta de semen menos utilizados, tales como las obtenidas de nivel testicular (ductos deferentes y epidídimo) suelen llevarse a cabo cuando se desea obtener muestras de semen de ejemplares que han muerto recientemente, o que presentan algún impedimento físico que limita el uso de métodos convencionales de semen (Liliana et al., 2015). La colecta de semen del epidídimo es el más socorrido, ya que esta parte del tracto reproductivo del macho contiene células espermáticas con capacidad fecundante (Benítez-González Edgar, 2018).

2.2 Evaluación de muestras

Una vez que se han extraído las muestras seminales de los carneros, el siguiente procedimiento a desarrollar es su evaluación, para determinar si son de buena o mala calidad. La evaluación de la muestra seminal puede llevarse a cabo por medios automatizados (Tsakmakidis, 2010) o manuales (Cueto et al., 2016). Algunas de las variables a considerar durante la evaluación del semen de carnero son las siguientes: volumen, color, motilidad masal, concentración espermática, integridad de membrana, vivos y muertos, por mencionar algunas (Quintero Moreno et al., 2017).

El color de una muestra de semen es generalmente blanco lechoso. Otros colores, tales como rojizos, cafés y turbios son indicativos de la presencia de sangre, contaminación fecal y baja concentración espermática. En muchos de los casos, el color estará también asociado a la concentración espermática de la muestra (Cueto et al., 2016). Además, muestras de semen con colores claros están asociados con espermatozoides vivos, mientras que colores oscuros se asociación con espermatozoides muertos (Hernández-Carrillo et al., 2022). La evaluación del color es subjetiva, pueden variar los resultados entre técnicos inexpertos, pero mejoran conforme se incrementa la experiencia.

El volumen se mide directamente en el tubo colector de semen, en la vagina artificial (Cueto et al., 2016). El volumen de semen suele variar de 1 a 2 mL (Pezzanite et al., 2010). Esta variable tiene una gran variación en sus valores. La raza, época del año, alimentación, y edad del animal son factores conocidos que afectan el volumen del eyaculado (Malejane et al., 2014).

La motilidad masal se mide de manera subjetiva con la ayuda de un microscopio. Se mide en una escala de 0 a 5, el valor más bajo indica la ausencia de movimiento en la muestra; mientras que el más alto indica un movimiento vigoroso de las olas formadas por las células espermáticas (Páez-Barón & Corredor-Camargo, 2014).

La concentración espermática mide la cantidad de células espermáticas por unidad de volumen del eyaculado. La medición de esta variable se lleva a cabo mediante la dilución de una muestra del eyaculado, para poder visualizar de manera individualizada a cada espermatozoide. Las lecturas del valor de esta variable de obtienen por medio de hematocitómetro o espectrofotometría (Quintero Moreno et al., 2017). Una concentración optima de células espermáticas es 3.5 millones mL^{-1} de eyaculado (Buchelly et al., 2018), aunque se pueden obtener valores tan bajos como 1500 millones mL^{-1} de eyaculado (Malejane et al., 2014).

La integridad de membrana es una medición que evalúa el estado de salud de la membrana plasmática del flagelo espermático. La medición se lleva a cabo mediante la colocación de una muestra de semen en una solución hiposmotica. Esto ocasionará la entrada de agua al interior del flagelo, lo que producirá su hinchamiento y enroscamiento, pero solo en espermatozoides saludables. Aquellos con mala integridad de membrana no sufrirán ningun cambio (Quintero et al., 2017). El porcentaje de espermatozoides con buena integridad de membrana suele ser superior al 60% en muestras de semen de buena calidad (Asaduzzaman et al., 2021).

El número/porcentaje de espermatozoides vivos se determina como la cantidad de células espermáticas que no se tiñen de color violeta, después de someter una muestra de semen a un barrido con eosina-nigrosina (Quintero et al., 2017). En las células teñidas de color violeta se asume que están muertas, porque su membrana plasmática no limita la entrada de la tinción (Asaduzzaman et al., 2021). Valores normales para esta variable son superiores al 70% en muestras de buena calidad (Asaduzzaman et al., 2021).

2.3 Métodos tradicionales de conservación de muestras seminales

Una vez que la muestra de semen ha pasado las pruebas de calidad, se decide el método de su conservación. Los métodos de conservación suelen clasificarse en

refrigeración y congelación. El primero es más barato, y permite conservar la muestra de semen por un periodo de tiempo limitado; mientras que el segundo es más caro, pero la vida media del espermatozoide en conservación es indefinida (Salamon & Maxwell, 2000). La conservación del semen permitió el desarrollo y diseminación de la inseminación artificial en las unidades de producción animal con mayor impacto económico; tales como en los bovinos lecheros, carne, ovinos, caprinos, cerdos y equinos (Foote, 2002).

La conservación de semen se hace posible mediante la adición de diluyentes a la muestra, y la reducción gradual en la temperatura del ambiente donde se encuentra la muestra. El diluyente proporciona un medio nutritivo para las células espermáticas, antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias, y crioprotectores para mantener vivo al espermatozoide durante su conservación a bajas temperaturas (Allai et al., 2018), principalmente a través de minimizar el choque térmico y la formación de cristales intracelulares, que puedan dañar los componentes de la célula (Saha et al., 2022).

Algunos de los componentes más comunes de los diluyentes son la yema de huevo, glicerol, lecitina de soya, agua de coco, leche, y propileno glicol (Ur et al., 2013). La tasa de dilución del semen con el diluyente dependerá de la concentración final deseada (Kumar et al., 2018).

La temperatura de conservación en líquido suele variar entre 15 y 4 °C. La eficacia de la conservación del semen dependerá en gran medida de la calidad y tipo de diluyente utilizada, así como de la temperatura de conservación (Murphy et al., 2018). Por ejemplo, los patrones de motilidad se mantienen con valores más altos cuando la muestra de semen se conserva a 5 °C en comparación con las que se conservan a 17 °C (Sadeghi et al., 2020).

Cuando el semen se decide crio-preservar, este se mantiene en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C. (Rodríguez-Almeida et al., 2008). La conservación de

de las células espermáticas es posible gracias a los crio-preservadores en el diluyentes, tales como el glicerol y propilen glicol (Kumar et al., 2018).

2.4 Uso de agentes gelificantes en la conservación de semen

Los gelificantes son sustancias que se adicionan a un medio líquido para espesar su consistencia, y cambiar su estado físico, pasando de líquido a semisólido cuando son expuestos a bajas temperaturas. (Loaiza-Alanis, 2008). Algunos agentes gelificantes son la grenetina, el alginato y agar.

La grenetina es un polímero obtenido a partir de la degradación hidrolítica del colágeno (Gil et al., 2008). La grenetina está compuesta en su mayoría (57%) por glicina, prolina e hidroxiprolina (Alipal et al., 2019). El alginato es un biopolímero no toxico, biodegradable y renovable, extraído habitualmente de algas pardas pertenecientes a la clase filogénico *Phaeophyceae*, también puede ser extraído del cultivo microbiano (Hurtado et al., 2020). El agar es un polisacárido extraído de algas marinas rojas del género *Eucheuma* pertenecientes a la familia de las *Rodophyceae* (Loaiza-Alanis, 2008).

Los agente gelificantes han sido utilizados en la conservación de muestras seminales. Su incorporación ha tomado relevancia ya que permite alargar la vida media de las células espermáticas en refrigeración (Gheller et al., 2018). La inclusión de agentes gelificantes al diluyente permite almacenar la muestra de semen en estado semisólido, cuando es sometida a bajas temperaturas (15-4 °C). El almacenamiento en esta forma limita el movimiento del espermatozoide, lo cual se traduce en una menor acumulación de productos tóxicos, un mejor balance antioxidante del diluyente, lo cual permite incrementar la vida media del espermatozoide (Bandeira et al., 2018; Gheller et al., 2018; Kumar et al., 2019).

La suplementación con grenetina mejora significativamente la motilidad de semen de caprinos almacenado por 72 h (Salvador et al., 2006). En conejos, la suplementación del medio con 0.7 y 1.4% mejoró la motilidad de los

espermatozoides después de 96 h de almacenamiento. Además, los porcentajes de gestaciones en conejas inseminadas con muestras de semen conservadas con gelatina por 48 h fueron similares a los obtenidos en conejas inseminadas con semen diluido sin gelatina (López-Gatius et al., 2005). Esto indica que la adición de grenetina al diluyente mantiene la capacidad fecundante del espermatozoide por periodos largos de almacenamiento. En otro estudio en cerdos, se encontró que la adición de grenetina al diluyente incrementó el porcentaje de espermatozoides vivos (Nagy et al., 2002). De manera contradictoria, la adición de 1.5 y 3.0% de grenetina no mejoró las características del semen evaluadas, ni los porcentajes de gestaciones. Sin embargo, se observó un menor movimiento retrogrado del semen, al momento de la inseminación artificial en cerdas que recibieron las muestras de semen conservadas con gelatina (Corcini et al., 2011).

El alginato suele añadirse al diluyente para formar esferificaciones. El contacto de la muestra de semen diluida con alginato con una solución que contenga calcio produce la formación instantánea de esferas, la parte externa se gelifica y la interna permanece en estado líquido (Nebel et al., 1993). Son escasos los estudios que evalúan únicamente el efecto de la adición de alginato al diluyente. La justificación para la formación de esferas de semen con alginato es que, dentro del tracto reproductivo de la hembra, permite llevar a cabo una liberación lenta y gradual de los espermatozoides. Esto es de gran valor, especialmente para los cerdas, ya que puede limitar el número de inseminaciones que se llevan a cabo durante un celo (Torre et al., 2000).

Por último, en relación al alginato, su suplementación no solo mejoró la integridad de la membrana de las muestras de semen almacenadas en nitrógeno líquido. Si no que además mejoró la capacidad antioxidante y antimicrobial del diluyente (Kumar et al., 2019).

Existen otros agente gelificantes que han sido menos estudiados en reproducción animal, tales como la goma xantana. En un estudio en equinos se evaluaron

diferentes cantidades de goma xantana (0.01, 0.12 y 0.25%) sobre la calidad de semen almacenado a 5 °C por 72 h. Los resultados de este trabajo de investigación mostraron que la dosis más alta de goma xantana es perjudicial para el espermatozoide. Sin encontrarse diferencias significativas entre el grupo control y las muestras de semen conservadas con las dosis más bajas del gelificante (Gheller et al., 2019). Por otra parte, desconocemos sobre la disponibilidad de información acerca de estudios que hayan evaluado la adición de agar al diluyente de semen, en alguna especie de interés zootécnico, sobre su calidad y fertilidad.

2.6 Fertilidad y calidad de las muestras seminales después de su conservación en líquido

La fertilidad y calidad de la muestra de semen, después de un periodo de conservación dependerá de varios factores, pero los más importantes son la temperatura de almacenaje, las características intrínsecas del diluyente, y la temperatura de descongelamiento (Bertha et al., 1999). La disminución en la calidad y fertilidad de la muestra de semen tienen a disminuir a medida que se incrementa el periodo de almacenamiento. En un estudio realizado en carneros, se observó que los valores de las variables integridad de la membrana, espermatozoides motiles y motilidad masal disminuyeron conforme transcurrían los 16 días de almacenamiento a 5°C, pero la severidad del efecto de almacenamiento es dependiente del tipo de diluyente utilizado (López-Sáez et al., 2000).

Las variaciones en la disminución de la calidad de la muestra, por efecto del diluyente es normal, ya que la composición química entre uno y otro es distinta. Especialmente en el aporte de antioxidantes. Estos compuestos son de vital importancia, ya que se sabe que a medida que se incrementa el tiempo de almacenamiento se incrementa la acumulación de especies reactivas de oxígeno y la lipoperoxidación de las membranas celulares (Salamon & Maxwell, 2000). Además del efecto de almacenamiento, se sabe que el efecto de conservación, mediante la adición de diluyentes, genera daños subletales, los cuales

comprometen su calidad y capacidad fecundante (Rubio-Guillén et al., 2009; Rizkallah et al., 2022).

La preservación de la capacidad fecundante del espermatozoide, durante el almacenamiento líquido, dependerá del tipo de inseminación utilizado; ya que se sabe que su fertilidad disminuye después de las 24 h de conservación cuando se utiliza la inseminación cervical, pero puede mantenerse hasta los 10 días de conservación, cuando se utiliza la inseminación intrauterina (Maxwell & Salomon, 1993). Al respecto, no se encontraron cambios en los porcentajes de gestaciones en ovejas inseminadas con semen almacenado por 12 h (Menchaca et al., 2006). Sin embargo, estos disminuyeron significativamente a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento (0-72 h) (O'Hara et al., 2010).

La temperatura de almacenamiento juega un papel muy importante. Se sabe que la disminución en los valores de variables, tales como número de espermatozoides vivos, disminuyen más drásticamente, por efecto del largo del periodo de almacenamiento, cuando la muestra de semen se almacena a 15 °C en comparación con las almacenadas a 5 °C (O'Hara et al., 2010). Es probable que esto se deba a que a menores temperaturas la capacidad metabólica y la producción de productos de desecho del espermatozoides es más limitada que a temperaturas altas (Rizkallah et al., 2022).

2.7 Sincronización y detección del celo en la oveja

El ciclo estral de la oveja tiene una duración promedio de 17 días, durante este periodo se desarrollan de tres a cuatro ondas foliculares, siendo la última la que produce uno o varios folículos preovulatorios (Bartlewski et al., 2011). Este puede dividirse en dos fases principales, folicular y lútea. La primera tiene una duración de cuatro a cinco días, mientras que la segunda dura de 11 a 13 días (Wagenmaker et al., 2010). Durante la fase folicular se desarrollará el folículo preovulatorio y durante la lútea el cuerpo lúteo, alcanzando su máxima producción de progesterona a los cinco días del ciclo estral (Wagenmaker et al., 2010). Los folículos preovulatorios

son los encargados de producir estradiol, para inducir el comportamiento del celo, el pico de GnRH/LH y la ovulación (Driancourt et al., 1985).

La duración del celo en la oveja suele durar de 27 a 31 h, la diferencia de horas entre el inicio del celo y el pico de LH es de tres a seis horas, y la ovulación se presente entre las 22 y 37 horas posteriores al inicio del celo (Quirke et al., 1981). Después de la ovulación, se desarrolla el cuerpo lúteo. En caso de no existir una gestación, el endometrio produce prostaglandinas para inducir su regresión y promover la aparición de un nuevo celo (Driancourt et al., 1985).

Los eventos reproductivos más trascendentales, regresión del cuerpo lúteo y la aparición del celo, serán el objeto de estudio de los protocolos de sincronización. Estos se basan en la aplicación de análogos de las hormonas que la oveja produce de manera endógena para inducir la aparición de un evento reproductivo en el momento más deseado (Whisnant et al., 2000). Las hormonas que comúnmente se utilizan en la sincronización del celo son la progesterona, prostaglandina y la gonadotropina coriónica equina (eCG).

La progesterona es una de las hormonas más utilizadas en la sincronización del celo. La función de la progesterona es controlar el patrón de secreción de LH y controlar crecimiento folicular. La progesterona suele ser proporcionada a la hembra por periodos que varían de cinco a doce días (Lozano-gonzález et al., 2012). La progesterona se suplementa en forma de esponjas y dispositivos intravaginales. Los análogos de progesterona más comúnmente utilizados en la sincronización del celo son acetato de fluorogestona, medroxiprogesterona y la fuente natural de la hormona (Skliarov et al., 2021).

La progesterona suele ser complementada con otras hormonas para sincronizar de manera efectiva el celo. La inyección de prostaglandina al final del periodo de suplementación de progesterona suele aplicarse para inducir la regresión del cuerpo lúteo (Lozano-gonzález et al., 2012). Este puede iniciar tan rápido como dos a tres

horas posteriores a su aplicación (Walt, 1978). La regresión del cuerpo lúteo producirá una caída en las concentraciones endógenas de progesterona, y un aumento en las de estradiol; lo que facilitará el inicio del celo (Prieto et al., 2011). De manera natural, la secreción de prostaglandinas da inicio el día 13 del ciclo estral (Baird & Scaramuzzi, 1975). Cuando se utilizan solas como método de sincronización, se aplican dos inyecciones de esta hormona a intervalos de nueve e 11 días. Este método de sincronización es solo efectivo durante la época de estacionalidad reproductiva (Yu et al., 2018). El celo suele presentarse a partir de las 48 h de aplicación de la hormona y hasta los cinco días posteriores (Yu et al., 2018).

La eCG es otra hormona que se utiliza en la sincronización del celo. Esta hormona es producida por la yegua gestante, y su función principal es inducir el desarrollo folicular, ya que tiene función predominante de FSH (Vilanova et al., 2019). Esta hormona es también utilizada para inducir la superestimulación ovárica de las ovejas. Sin embargo, su uso es limitado debido a disponibilidad en el mercado y larga duración dentro del sistema del animal (Somanjaya et al., 2021). La aplicación de la hormona eCG suele llevar a cabo al final del periodo de suplementación con progesterona o al momento de la inyección con prostaglandina, su aplicación tiene como objetivo homogenizar la incidencia de celos (Omontese et al., 2016).

Otro método de sincronización del celo, pero no tan efectivo como los que utilizan las hormonas antes mencionadas, es el efecto macho. Este consiste en la introducción repentina del carnero a un corral con hembras (Fabre-Nys et al., 2016). La entrada del macho ocasiona un incremento en la secreción de LH y producción de estradiol, y la posterior aparición del celo (Fabre-Nys et al., 2015). Este método natural de sincronización funciona mejor durante la transición hacia la época reproductiva de la oveja (Rosa & Bryant, 2002). La aparición de las primeras ovulaciones, posteriores a la introducción del macho, ocurren entre los tres y cinco días (Ungerfeld et al., 2004).

2.8 Técnicas de inseminación artificial en ovinos

La inseminación artificial fue la biotecnología más importante en el área de ciencia animal durante el siglo pasado. Esto se debe a que permite utilizar el material genético de los mejores sementales, sin importar su ubicación, lo que permitió acelerar el mejoramiento genético y potencial productivo de los diversos sistemas de producción animal (Foote, 2002).

Los métodos de inseminación en ovejas son variados. Los más aplicados son la inseminación por vía vaginal, cervical e intrauterina. Los materiales que se requieren para llevar cada una de ellas son distintos, especialmente cuando se utiliza la vía laparoscópica (Parkinson & Morrell, 2018). Además, los porcentajes de gestaciones que se obtienen también son diferentes, obteniéndose valores más altos cuando se utiliza la inseminación por vía laparoscópica (64 vs 42 vs 17% para la inseminación por vía laparoscópica, cervical y vaginal, respectivamente) (Maxwell & Hewitt, 1986). Adicionalmente, se observan mayores porcentajes de gestaciones cuando se utiliza semen fresco en comparación con el congelado (65 vs 83%) (Wolynetz et al., 1979).

La inseminación intrauterina está recomendada para el uso de semen fresco y congelado; mientras que el semen fresco es usado preferentemente cuando se utilizan los métodos de inseminación por vía vaginal y cervical (Maxwell & Hewitt, 1986). La inseminación por vía vaginal consiste en depositar el semen en la parte craneal de la vagina. En la mayoría de los casos solo se requiere el uso del aplicador de semen (Evans, 1988).

La inseminación por vía cervical es ampliamente utilizada en ovejas. Este método de inseminación consiste en usar un espejo, para visualizar y colocar el semen en la entrada del cérvix (Vallejo et al., 2019). Sin embargo, tienen como principales limitantes la dependencia de la existencia de una muestra de semen fresca, y es prácticamente imposible atravesar el cérvix de la oveja. Esto debido a la naturaleza tortuosa del mismo (Alvarez et al., 2019). Además, se observa una gran inconsistencia en los porcentajes de gestaciones de ovejas inseminadas, siendo

factores de variación el inseminador, cantidad de semen utilizado, raza y edad de la oveja (Purdy et al., 2020). El tiempo requerido para llevar a cabo la inseminación cervical en ovejas puede ser de menos de 10 s. Se ha observado que entre más rápido se lleve a cabo la inseminación, mejores son los porcentajes de pariciones (Alvarez et al., 2019).

La inseminación por vía laparoscópica requiere de capacitación y material especializado. Es el método que permite hacer un uso más eficiente del semen, ya que se deposita por completo en los cuernos uterinos. Su principal ventaja es que pasa la barrera natural que ofrece el cérvix (Ivanka et al., 2011). El uso de la inseminación por laparoscopia está comúnmente asociado a la implementación de programas de sincronización del celo. Algunos de los factores asociados con la aplicación de la técnica, que pudieran mermar los porcentajes de gestaciones, son un mal manejo del animal, del equipo (Sathe, 2018) y la colocación inadecuada del semen dentro del tracto reproductivo de la oveja (Briolini et al., 2003)

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de agentes gelificantes en producción animal se ha enfocado en mejorar los parámetros más importantes en la conservación de la calidad de las células espermáticas almacenadas en refrigeración (El-Sherbieny et al., 2012; Faustini et al., 2008; Salvador et al., 2006). La ventaja de la incorporación de gelificantes al medio de dilución de la muestra de semen, es que minimizan el efecto negativo que el almacenamiento tiene sobre las características de calidad y fertilidad del semen (Gheller et al., 2018; Kumar et al., 2019; O'Hara et al., 2010).

Los efectos positivos en la calidad y fertilidad de muestras seminales conservadas en conjunto con agentes gelificantes se debe a que disminuye la capacidad de movimiento del espermatozoide, su actividad metabólica, la producción de sustancia de desecho; y mejoran el estado antioxidante y bactericida del diluyente (Kumar et al., 2019; López-Gatius et al., 2005; Perteghella et al., 2017; Yániz et al., 2005).

La diversidad de gelificantes a nivel comercial es basta (Saha & Bhattacharya, 2010). Los más estudiados para la conservación de semen han sido alginato y la grenetina (Kumar et al., 2019; López-Gatius et al., 2005; Perteghella et al., 2017; Yániz et al., 2005), pero existe otros como agar, el cual es de fácil adquisición, y no ha sido probado sobre la calidad de muestras de carnero conservadas en refrigeración.

4. OBJETIVO

Medir el efecto de la adición de agentes gelificantes (gernetina y agar) a muestras de semen de carnero conservadas en refrigeración y temperatura ambiente sobre el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, motiles, vivos y con buena integridad de membrana.

5. HIPOTESIS

Las muestras de semen de carnero conservadas en refrigeración y temperatura ambiente, con agentes gelificantes (gernetina y agar), tienen mejores porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva, motiles, vivos y con buena integridad de membrana, que las muestras de semen conservadas sin agentes gelificantes.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Localización del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Producción de Ovinos del Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) de la Universidad Autónoma de Baja California. Se utilizaron carneros para la obtención de muestras seminales, las cuales fueron utilizadas para la inseminación artificial de ovejas. En todo momento del experimento, los animales fueron tratados de acuerdo a los lineamientos de bienestar animal establecidos por el “Canadian Council on Animal Care” (CCAC, 2009).

Este trabajo de investigación contempló tres fases. En la primera fesa se evaluó el efecto de la adición de agentes gelificantes sobre características de calidad de muestras seminales de carneros almacenadas en refrigeración por 144 h. En la segunda fase se evaluó el efecto de la adición de agentes gelificantes sobre características de calidad de muestras seminales de carneros, almacenadas a temperatura ambiente por 4 h. En la tercera fase se evaluó el porcentaje de gestaciones de ovejas inseminadas con muestras de semen conservadas con agentes gelificantes.

Fase 1

6.2 Unidades y diseño experimental

Se utilizó una muestra de semen heteroespermatica, obtenida de dos carneros adultos (Dorper x Pelibuey x Katahdin) mediante vagina artificial. Inmediatamente después de la colecta se determinó, mediante microscopia (Velab-B4, Microscopio binocular), la motilidad masal y concentración espermática siguiendo metodologías previamente descritas (Gore et al., 2020; Nalley & Arifiantini, 2013), la muestra fue utilizada solo si presentaba motilidad masal ≥ 3 .

La muestra heteroespermática fue diluida con un medio comercial (Tryladyl, Minitube) para obtener una concentración espermática de $40 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$, de la cual se obtuvieron 200 μL para ser incorporados a uno de tres tratamientos:

Control: 1800 μL de dilutor (sin agentes gelificantes).

Gelificante grado bacteriológico: 6 mg de grenetina (grenetina grado bacteriológico FAGA LAB) + 2 mg μL de agar (agar bacteriológico, MCD LAB) + 400 μL de dilutor.

Gelificantes grado alimenticio: 6 mg de grenetina + 2 mg de agar + 400 μL dilutor.

Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones, cada una con un volumen total de 2000 μL . Además, el experimento se replicó seis veces en días consecutivos.

6.3 Manejo de la muestra

Una vez formados los tratamientos, las muestras de cada tratamiento se mantuvieron en refrigeración (4 °C) por 1 h, para permitir la gelificación. Posteriormente se realizó la primera lectura (hora 0), para lo cual se colocaron en baño María durante tres minutos. Después, se tomaron dos submuestras de cada repetición correspondiente a cada tratamiento, para realizar la medición de las variables de respuesta. Una vez que se tomaban las submuestras, la muestra original era regresada a refrigeración hasta la próxima medición (144 h).

6.4 Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron el número de espermatozoides vivos, con buena integridad de membrana, motiles y con motilidad progresiva. Las mediciones se realizaron siguiendo metodologías previamente establecidas (Gore et al., 2020; Nalley & Arifiantini, 2013). Brevemente, espermatozoides vivos y muertos, en un portaobjetos previamente atemperado fue colocada una muestra de la submuestra (10 μL) y con la técnica de tinción de eosina nigrosina, a través de un microscopio a 100x, fueron registradas las células espermáticas vivas (no teñidas) y las muertas

(teñidas púrpura). Integridad de membrana, para la medición de esta variable fue añadida una cantidad de la submuestra a una solución hipos-mótica, en donde se dejó en reposo por tres minutos, luego de ello fue observada en el microscopio (100x) y fueron registradas las células espermáticas que mostraban enrollamiento en el flagelo (buena integridad de membrana) y las que no lo presentaban (mala integridad de membrana). Células motiles, la submuestra fue observada bajo microscopio, se registró el número de células espermáticas con cualquier tipo de movimiento (motiles) y las estáticas (no motiles). Motilidad progresiva, en la submuestra se observó el número de espermatozoides que presentaban movimiento progresivo (motilidad progresiva) y los que presentaban cualquier otro tipo de movimiento (no progresivo). En cada medición se contabilizarón 50 células espermáticas.

Fase 2

6.5 Unidades y diseño experimental

Las unidades experimentales y tratamientos fueron los mismos que se utilizaron en la Fase 1 del experimento. El experimento fue repetido en seis ocasiones.

6.6 Manejo de la muestra

Una vez formados los tratamientos, las muestras de cada tratamiento se mantuvieron en refrigeración (4 °C) por 1 h, para permitir la gelificación. Posteriormente se realizó la primera lectura (hora 0), para lo cual se colocaron en baño María durante tres minutos. Después, se tomó una submuestra de cada repetición correspondiente a cada tratamiento, para realizar la medición de las variables de respuesta. Una vez que se tomó la submuestra, la muestra original fue mantenida a temperatura ambiente (20-25 °C) hasta la última medición (4 h)

6.7 Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron el número de espermatozoides vivos, con buena integridad de membrana y motiles. Las mediciones se realizaron siguiendo metodologías previamente establecidas (Gore et al., 2020; Nalley & Arifiantini, 2013).

Fase 3

6.8 Unidades y diseño experimental

Las unidades experimentales fueron 34 ovejas multíparas (Dorper x Pelibuey x Katahdin). Estas fueron asignadas a uno de dos tratamientos: Control y Gelificante. Las ovejas del grupo Control (n=17) fueron inseminadas con una muestra de semen conservada en refrigeración (4 °C) y sin gelificantes. Las ovejas del grupo Gelificante (n=17) fueron inseminadas con una muestra de semen conservada en refrigeración y con gelificantes grado alimenticio (grenetina y agar).

6.9 Preparación y manejo de las muestras de semen

Se utilizó una muestra de semen heteroespermática, obtenida de dos carneros adultos (Dorper x Pelibuey x Katahdin) mediante vagina artificial. Inmediatamente después de la colecta se determinó, mediante microscopia (Velab-B4, Microscopio binocular), la motilidad masal y concentración espermática siguiendo metodologías previamente descritas (Gore et al., 2020; Nalley & Arifiantini, 2013), sólo se utilizaron muestras con motilidad masal ≥ 3 . Se prepararon, por separado, 34 dosis de 1 mL de semen ($300 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$). Las dosis de semen del grupo Control fueron preparadas únicamente con diluyente comercial (Tryladyl, Minitube). Las dosis de semen del grupo Gelificantes fueron preparadas con el mismo diluyente y suplementadas con 6 mg de grenetina (grenetina grado alimenticio) y 2 mg de agar (agar grado alimenticio). Las dosis de semen fueron preparadas cuando se registró la primera oveja en celo, y permanecieron en refrigeración hasta por 144 h.

6.10 Sincronización del celo e inseminación artificial

El celo de las ovejas fue sincronizado mediante dos inyecciones, aplicadas a un intervalo de nueve días, con 2.5 mg de Dinotrost (Lutalyse, Zoetis). El celo de las ovejas se detectó con la ayuda de carneros con mandil, a intervalos de 6 h, después de la segunda inyección con dinoprost. La oveja era declarada en celo cuando aceptaba la monta del macho. La inseminación artificial se llevó a cabo por vía pericervical a las 12 h después de detectado el celo.

6.11 Variable de respuesta

La variable de respuesta fue el porcentaje de gestaciones. El diagnóstico de gestaciones se llevó a cabo a los 40 días posteriores a la inseminación por medio de ecografía transrectal (Handscan V8, Sunway Medical, equipado con un transductor lineal de 7.5 Mhz).

6.12 Análisis estadístico

Los datos recopilados del experimento se registraron en Excel y se ordenaron en una base de datos con formato para su importación al programa R. Los datos de las variables motilidad progresiva, espermatozoides motiles, espermatozoides vivos e integridad de membrana se analizaron con el programa R, versión 4.1.2. El modelo que se utilizó fue un modelo logístico para modelar el caso de éxitos para cada variable con la opción de R del modelo lineal mixto generalizado. El modelo consideró el tratamiento como efecto fijo y la réplica del experimento como efecto aleatorio. Para cada variable se consideró el efecto inicial como covariable. Las pruebas de medias de mínimos cuadrados entre tratamientos se realizaron en la escala logarítmica de razón de probabilidades con Tukey ($p > 0.01$). El modelo estadístico final fue el siguiente:

$$\ln \left(\frac{p_{ijk}}{1-p_{ijk}} \right) = \beta_0 + T_{ij} + \text{Réplica } k + \varepsilon_{ij}$$

donde:

$\ln \left(\frac{p_{ijk}}{1-p_{ijk}} \right)$ = logaritmo natural de las variables respuesta: motilidad progresiva, espermatozoides motiles, espermatozoides vivos e integridad de membrana en el i-ésimo tratamiento (1, 2 y 3) de la j-ésima repetición (1,2,3, 4 y 5) de la K-ésima réplica (1,2,3,4, 5 y 6),

β_0 = el efecto fijo de una constante,

T_i = el efecto fijo del i-ésimo del agente gelificante, i=testigo, agente grado bacteriológico y agente grado alimenticio),

Replica k = el efecto aleatorio de la réplica, $K=1, 2, 3, 4, 5$ y 6 ,

ε_{ij} = el efecto del error.

El porcentaje de gestaciones fue comparado mediante una prueba de Chi cuadrado.

7. RESULTADOS

La conservación de semen en refrigeración con agentes gelificantes fue superior en todas las variables de respuesta ($p<0.01$) en comparación con el tratamiento testigo (sin agentes gelificantes) (Cuadro 1). Además, entre el tipo de agente gelificante, grado bacteriológico o grado alimenticio, no se encontró diferencia en las variables evaluadas ($p>0.05$).

Cuadro 1. Influencia del tipo de agente gelificante en la conservación de semen de carnero, refrigerado durante seis días en variables de viabilidad espermática.

Tratamiento	Motilidad progresiva ($\bar{X} \pm EE$) ¹	Espermatozoides motiles ($\bar{X} \pm EE$) ¹	Espermatozoides vivos ($\bar{X} \pm EE$) ¹	Integridad de membrana ($\bar{X} \pm EE$) ¹
Control	0.326 $\pm$ 0.021 ^a	0.497 $\pm$ 0.035 ^a	0.536 $\pm$ 0.024 ^a	0.541 $\pm$ 0.015 ^a
Gelificante bacteriológico	0.419 $\pm$ 0.023 ^b	0.543 $\pm$ 0.035 ^b	0.604 $\pm$ 0.023 ^b	0.581 $\pm$ 0.015 ^b
Gelificante Alimenticio	0.416 $\pm$ 0.023 ^b	0.547 $\pm$ 0.035 ^b	0.597 $\pm$ 0.023 ^b	0.596 $\pm$ 0.015 ^b

¹EE= error estandar, medias de mínimos cuadrados por columna con diferente letra son diferentes ($p<0.01$).

La conservación de semen con agente gelificante de grado bacteriológico, expuesta a temperatura ambiente, fue superior al resto de tratamientos en la variable de espermatozoides motiles ($p<0.05$); mientras que, para la variable de integridad de membrana, la conservación de semen con agente gelificante de grado alimenticio fue superior al resto tratamientos ($p<0.05$). No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos evaluados para la variable de espermatozoides vivos (Cuadro 2). No se encontró dependencia ($p>0.05$) entre el porcentaje de gestaciones y el uso de gelificantes (4/17 y 7/17 ovejas gestantes para los grupos Control y Gelificante)

Cuadro 2. Influencia del tipo de agente gelificante en la conservación de semen de carnero después de ser expuesto a temperatura ambiente por cuatro horas.

Tratamiento	Espermatozoide s motiles ($\bar{X} \pm EE$) ¹	Espermatozoides vivos ($\bar{X} \pm EE$) ¹	Integridad de membrana ($\bar{X} \pm EE$) ¹
Control	0.544 $\pm$ 0.093 ^b	0.600 $\pm$ 0.026 ^a	0.264 $\pm$ 0.021 ^b
Gelificante bacteriológico	0.582 $\pm$ 0.092 ^a	0.610 $\pm$ 0.026 ^a	0.279 $\pm$ 0.022 ^b
Gelificante Alimenticio	0.528 $\pm$ 0.094 ^b	0.607 $\pm$ 0.026 ^a	0.295 $\pm$ 0.023 ^a

¹EE= error estandar, medias de mínimos cuadrados por columna con diferente letra son diferentes ($p < 0.05$).

8. DISCUSION

La conservación de semen, y el mantenimiento de su calidad y fertilidad, es fundamental para el éxito de otras tecnologías reproductivas, tales como la inseminación artificial. Los métodos de conservación suelen clasificarse en refrigeración y congelación. El primero es más barato, y permite conservar la muestra de semen por un periodo de tiempo limitado; mientras que el segundo es más caro, pero la vida media del espermatozoide en conservación es indefinida (Salamon & Maxwell, 2000). En algunas ocasiones es más conveniente el uso de semen diluido/fresco que el congelado, sobre todo porque se sabe que los porcentajes de gestaciones son superiores cuando se utiliza el primero (65 vs 83%) (Wolynetz et al., 1979). Sin embargo, se debe de considerar que la fertilidad del semen comienza a disminuir después de las 24 h de conservación (Maxwell & Salomon, 1993). Algunos investigadores incluso recomiendan no refrigerar el semen si se planea utilizar dentro de las primeras 24 h después de la colecta, ya que el descenso de temperatura causa daños estructurales al espermatozoide (Rosi, 2012).

El proceso de conservación de semen en refrigeración ocasiona una reducción continua de los valores para las variables relacionadas con la calidad y fertilidad del semen de carnero (López-Sáez et al., 2000). La severidad en la disminución de los valores dependerá del tipo de diluyente utilizado y la temperatura de conservación (Lily et al., 2001; Beriau et al., 2016; Maksimović et al., 2018). Los investigadores han tratado de minimizar el efecto negativo del periodo de almacenamiento en refrigeración, sobre variables de calidad espermática, mediante la suplementación del diluyente con diversas sustancias, tales como antioxidante (Maxwell & Salomon, 1993). Otros han explorado el uso de gelificantes, tales como la grenetina. Los gelificantes se adicionan a un medio líquido para espesar su consistencia, y cambiar su estado físico, pasando de líquido a semisólido cuando son expuestos a bajas temperaturas. (Loaiza-Alanis, 2008). Este cambio en consistencia es de gran relevancia. Por ejemplo, resultados de una investigación en gallos indica que las

muestras seminales con mayor viscosidad conservan de mejor manera la vitalidad de la célula espermática (Barragán et al., 2022). De manera similar, el cambio de consistencia del diluyente de semen, por la adición de gelificantes, limita el movimiento del espermatozoide, lo cual se traduce en una menor acumulación de productos tóxicos, una mejor balance antioxidante del diluyente, lo cual permite incrementar la vida media del espermatozoides (Bandeira et al., 2018; Gheller et al., 2018; Kumar et al., 2019).

En el presente trabajo de investigación, la incorporación de agentes gelificantes (grenetina y agar) permitió obtener valores más altos que el grupo control, para las variables de calidad espermática evaluadas, sin importar la fuente del gelificante utilizada. Este efecto fue observado en las muestras conservadas en refrigeración y las mantenidas a temperatura ambiente. Es importante mencionar que la suplementación con agar, hasta donde se tiene conocimiento, no ha sido estudiada en la calidad de muestras seminales de carnero. Además, conviene declarar que no se incluyó en los tratamientos uno con únicamente agar, ya que las concentraciones utilizadas no permiten la gelificación de la muestra, y concentraciones más elevadas son perjudiciales para el espermatozoide.

En concordancia con nuestro resultados, se reportó que la suplementación al diluyente con 1.5% de grenetina mejoró la motilidad espermática después de 72 h de almacenamiento a 5 °C (51.9 vs 31.1% para el grupo suplementado con gelificante y el control) (Gheller et al., 2018). Sin embargo, no se reportaron diferencias significativas en el porcentaje de gestaciones en ovejas inseminadas con muestras de semen suplementadas con 1.5% de grenetina y conservadas por 48 a 72 h (Bandeira et al., 2018). De manera similar, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de gestaciones en cabras (47 vs 41%) inseminadas con semen suplementado con 1.5% de grenetina, a pesar de observarse mejoras en la motilidad espermática por efecto de la adición del gelificante (67 vs 59% para el grupo suplementado con gelificante y el control) (Salvador et al., 2006). En cerdas, la suplementación del semen con 1.5% de grenetina tampoco mejoró la tasa

de parición, ni el tamaño de camada (Corcini et al., 2011). Mientras que en conejos, la suplementación con 1.4% de grenetina, mantuvo la fertilidad de las muestras seminales hasta por cinco días, cuando estas fueron almacenadas a 15 °C (Yániz et al., 2005).

La ausencia de diferencias significativas en el porcentaje de gestaciones por efecto de la adición de gelificantes a las muestras de semen, en este estudio y en los expuestos en el párrafo anterior, son contradictorios con la mejora en algunos de los parámetros de calidad espermática. Más aun cuando se ha reportado que la tasa de fertilización *in vitro* es mayor cuando se utilizan muestras de semen de carnero conservadas por 24 h a 15 °C con 1.5% de grenetina (Yániz et al., 2005). En nuestro estudio, solo se observó una diferencia numérica en el número de ovejas gestantes, a favor del grupo de ovejas inseminadas con dosis de semen conservadas con gelificantes. Es probable que, si se hubiera incrementado el tamaño de muestra, se hubieran encontrado diferencias significativas para esta variable. Por otra parte, es probable que otros estudios hayan fallado en encontrar diferencias significativas en la fertilidad de las hembras, inseminadas con dosis de semen almacenadas con agentes gelificantes, debido a que las variables mejoradas pudieran no ser determinantes para el establecimiento de una gestación.

Otros agentes gelificantes, tales como el alginato, han mostrado ser benéficos en la aminoración del efecto negativo de la conservación en muestras seminales de toro, búfalo (Kumar et al., 2019) y cerdos (Huang et al., 2005). Existe un gran cantidad de gelificantes disponibles en el mercado (Saha & Bhattacharya, 2010), pero es necesario evaluar su efectividad para preservar las características deseables en una muestra de semen conservada en refrigeración. El efecto benéfico de la grenetina sobre la calidad del semen está ampliamente demostrado. Sin embargo, esta es la primera ocasión en la que se reporta su efecto en combinación con agar. Un hallazgo significativo del presente trabajo de investigación es que se pueden utilizar fuentes de gelificante grado alimenticio, sin afectar la calidad de la muestra

de semen. Esto es relevante, ya que generalmente estas fuentes son de fácil acceso y más baratas que los gelificantes con grado bacteriológico.

9. CONCLUSIÓN

La suplementación de las muestras de semen de carnero con grenetina y agar, grado alimenticio o bacteriológico, mejora los porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva, motiles, vivos y con buena integridad de membrana durante su conservación en refrigeración o a temperatura ambiente.

10. LITERATURA CITADA

- Alipal, J., Mohd Pu'ad, N. A. S., Lee, T. C., Nayan, N. H. M., Sahari, N., Basri, H., Idris, M. I., & Abdullah, H. Z. (2019). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., & El Amiri, B. (2018). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 192(November 2017), 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>
- Alvarez, M., Anel-Lopez, L., Boixo, J. C., Chamorro, C., Neila-Montero, M., Montes-Garrido, R., de Paz, P., & Anel, L. (2019). Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. *Reproduction in Domestic Animals*, 54(S4), 32–40. <https://doi.org/10.1111/rda.13523>
- Asaduzzaman, M., Saha, A., Akter, S., Jha, P., Alam, M., & Bari, F. (2021). Assessment of Semen Quality of Two Ram Breeds at Pre-freeze Stage of Cryopreservation. *International Journal of Livestock Research*, 0, 1. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20201026053211>
- Ávalos-Rodríguez, A., González-Santos, J. G. Vargas-Ibarra, A. K. & Herrera-Barragán, J. A. (2018). Recolección y Manipulacion seminal. *Universidad Autónoma Metropolitana*. https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronico/recoleccion_manipulacion.pdf
- Baird, D. T., & Scaramuzzi, R. J. (1975). Prostaglandin F(2 α) and luteal regression in the ewe: comparison with 16 aryloxyprostaglandin (I.C.I. 80,996). *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique*, 15(2), 161–174. <https://doi.org/10.1051/rnd:19750203>
- Bandeira, A. M. P., Matos, J. E., Maria, A. N., Carneiro, P. C. F., Purdy, P. H., & Azevedo, H. C. (2018). The effects of gelatin supplementation prior to cooling on ram semen quality and fertility. *Animal Reproduction*, 15(1), 23–28. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2017-0021>

- Bartlewski, P. M., Baby, T. E., & Giffin, J. L. (2011). Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.024>
- Barragán, J. A. H., Huitrón, J. M., Pérez-Rivero, J. J., Sánchez, A. G., Rodríguez, A. Á., Torres, A. M. R., & Flores, R. C. (2022). Effect of viscosity on the medium for rooster (*Gallus gallus*) sperm cryopreservation. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 13(1), 175–186. <https://doi.org/10.22319/RMCP.V13I1.5917>
- Benítez-González, E. (2018). Evaluación comparativa de dos métodos de recuperación espermática de epidídimos bovinos post-mortem. *Abanico Veterinario*, 8(1). <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.6>
- Beriau, J. I., Emiliano Ricardo Calvo, & Maria Ines Perez. (2016). Efecto de la temperatura ambiente en el empaquetado de pajuelas sobre la calidad de semen ovino.
- Bertha, R., Mejorada, A., Ortiz Hernández, A., Manuel, J., Villalobos, B., Feldman Steel, D., & Valencia Méndez, J. (1999). Motilidad y fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. In *Vet. Méx* (Vol. 30, Issue 3).
- Briolini, M., Colonia Benítez,), Argentina, C., & Stahringer, R. C. (2003). *Factores que Afectan los Resultados de un Programa de Inseminación Artificial*.
- Buchelly Imbachí, F., Zalazar, L., Pastore, J. I., Greco, M. B., Iniesta-Cuerda, M., Garde, J. J., Soler, A. J., Ballarin, V., & Cesari, A. (2018). Objective evaluation of ram and buck sperm motility by using a novel sperm tracker software. *Reproduction*, 156(1), 11–21. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0755>
- Cameron R.D.A. (1977). The Effect of Method of Stimulation on Response to Electroejaculation. *Australian Veterinary Journal*, 53, 380–383.
- Corcini, C. D., Moreira, F., Pigozzo, R., Varela, A. S., Torres, N. U., & Lucia, T. (2011). Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. *Livestock Science*, 138(1–3), 289–292.

<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.11.019>

- Cueto, M., Gibbons, A., Macarena Bruno-Galarraga, M., & Fernández, J. (2016). Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Segunda edición. https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf
- Driancourt, M. A., Gibson, W. R., & Cahill, L. P. (1985). Follicular dynamics throughout the oestrous cycle in sheep. A review. *Reproduction Nutrition Developpement*, 25(1 A), 1–15. <https://doi.org/10.1051/rnd:19850101>
- Edgar, D. G., Inkster, I. J., & MacDiarmid, H. J. (1956). An Improved Method for the Collection and Evaluation of Ram Semen. *New Zealand Veterinary Journal*, 4(1), 20–24. <https://doi.org/10.1080/00480169.1956.11978542>
- El-Sherbieny, M. A., Kalaba, Z. M., El-Siefy, E. M. E., & Ayat, R. A. (2012). Freezing and fertilizing capacity of frozen rabbit semen extended with gelatin addition. In *Asian Journal of Animal Sciences* (Vol. 6, Issue 6, pp. 291–299). <https://doi.org/10.3923/ajas.2012.291.299>
- Evans, G. (1988). Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. In *Aust. J. Bioi. Sci* (Vol. 41).
- Fabre-Nys, C., Chanvallon, A., Dupont, J., Lardic, L., Lomet, D., Martinet, S., & Scaramuzzi, R. J. (2016). The “ram effect”: A “non-classical” mechanism for inducing LH surges in sheep. *PLoS ONE*, 11(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158530>
- Fabre-Nys, C., Kendrick, K. M., & Scaramuzzi, R. J. (2015). The “ram effect”: New insights into neural modulation of the gonadotropic axis by male odors and socio-sexual interactions. *Frontiers in Neuroscience*, 9(APR), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00111>
- Faustini, M., Riccardi, A., Villani, S., Russo, V., Torre, M. L., Conte, U., & Vigo, D. (2008). A single insemination intervention in the sow with barium alginate-encapsulated boar semen. *Veterinary Research Communications*, 32(SUPPL. 1), 147–149. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9115-1>
- Flores, V. A., Rosales, R. V., & Trujillo, A. O. (2005). Training of rams for semen collection by artificial vagina, using as stimulus inanimate objects.

Veterinaria México, 36(1), 105–111.

Flores Celeste, & Vilanova Lourdes. (2015). Metabolismo espermático. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*.

<http://www.ucla.edu.ve/dveterin/departamentos/CienciasBasicas/gcv/2530int2530er2530no/articulos/documasp/~32t1nyu8.pdf>

Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *Journal of Animal Science*, 80(E-suppl_2), 1–10. https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80e-suppl_21a

Gheller, S. M.M., Corcini, C. D., Santos, F. C. C., Tavares, G. C., Costa, V. G. G., Curcio, B. R., Nogueira, C. E. W., & Varela Junior, A. S. (2019). The effects of xanthan gum on equine sperm quality during cooling storage. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 71(1), 28–34. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10117>

Gheller, Stela Mari Meneghello, Corcini, C. D., Pradieé, J., Rizzoto, G., Lucia, T., Moreira, F., & Varela Junior, A. S. (2018). Gelatin protects ram semen stored for 72 h at 5 °C. *Small Ruminant Research*, 158, 54–56. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.09.011>

Gibbons, A. E., Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*, 16(4), 803–809. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>

Gil, L., Solorzano, M., Pinto, D & Gonzales, N. (2008). Efecto de la adición de gelificantes en un diluyente comercial porcino. <https://www.avparagon.com/docs/anavepor2008/COMUNICACIONES/COM%2011%20GIL.pdf>

Gore, D. L. M., Muasya, T. K., Okeno, T. O., & Mburu, J. N. (2020). Comparative reproductive performance of Saanen and Toggenburg bucks raised under tropical environment. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2653–2658. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02297-4>

Hernández-Carrillo, E., Sánchez-Pineda, H., Tórtora-Pérez, J., Cigarroa Vázquez, F. A., Reyes-García, M., Peralta-Lailson, M., & Hernández-Marín, J. A.

- (2022). Effect of selenium on semen quality and fertility of rams. *Agro Productividad*, 33–39. <https://doi.org/10.32854/agrop.v15i5.2140>
- Huang, S. Y., Tu, C. F., Liu, S. H., & Kuo, Y. H. (2005). Motility and fertility of alginate encapsulated boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 87(1–2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.005>
- Hurtado, A., Selgas, R., & Serrano Aroca, Á. (2020). El alginato y sus inmensas aplicaciones industriales. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation.*, 12, 137–149. https://doi.org/10.46583/nereis_2020.12.573
- Ivanka, B., Candappa, R. & Bartlewski, P. M. (2011). A review of Advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep. Institute of Computer Science, University of Guelph. <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TORSJ-3-162>
- Jiménez-Rabadán, P., Soler, A. J., Ramón, M., García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Fernández-Santos, M. R., Montoro, V., Pérez-Guzmán, M. D., & Garde, J. J. (2016). Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, 167, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.013>
- Kumar, N., Choudhary, S., Raheja, N., Grewal, S., & Sharma, N. (2018). A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), 239–245. <https://www.researchgate.net/publication/325170393>
- Kumar, P., Pawaria, S., Dalal, J., Ravesh, S., Bharadwaj, S., Jerome, A., Kumar, D., Jan, M. H., & Yadav, P. S. (2019). Sodium alginate potentiates antioxidants, cryoprotection and antibacterial activities of egg yolk extender during semen cryopreservation in buffalo. *Animal Reproduction Science*, 209(March), 106166. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106166>
- Liliana, Y., Rodríguez, S., Calvo, J. E. S., & Calvo, S. (2015). Comparación de técnicas de colecta seminal colecta de semen de epidídimo, colecta tradicional y criopreservación, en relación a la calidad espermática, en caninos.

https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria//ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/90

- Lily, P. T., Camacho, J., Huanca, W., & Falcón, N. (2001). Conservación de semen caprino en los dilutores citrato-yema y leche-descremada yema. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/veterinaria/v12_n1/conser_semen.htm
- Loaiza-Alanis, C. (2008). Análisis fisiológico del efecto de tres marcas de agar y Gelrite en la germinación y desarrollo in vitro de plántulas de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería Área Académica de Biología Licenciatura en Biología. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/298/Analisis%20fisiologico%20del%20efecto%20de%20tres%20marcas%20de%20agar.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- López-Gatius, F., Sances, G., Sancho, M., Yániz, J., Santolaria, P., Gutiérrez, R., Núñez, M., Núñez, J., & Soler, C. (2005). Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, 64(2), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.015>
- López-Sáez, A., Ortiz, N., Gallego, L., & Garde, J. J. (2000). Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Archives of Andrology*, 44(2), 155–164. <https://doi.org/10.1080/014850100262335>
- Lozano-gonzález, J. F., Uribe-velásquez, L. F., & Osorio, J. H. (2012). Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 6(2), 134–147.
- Maksimović, N., Milovanović, A., Barna, T., Caro Petrović, V., Pantelić, V., Lazarević, M., & Stojanov, I. (2018). Short-term liquid storage of ram semen in various extenders. *South African Journal of Animal Science*, 48(4), 717–723. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i4.13>
- Malejane, C., Greyling, J., & Raito, M. (2014). Seasonal variation in semen quality of Dorper rams using different collection techniques. *South African Journal of Animal Science*, 44(1), 26. <https://doi.org/10.4314/sajas.v44i1.4>

- Mattner, P. E., & Voglmayr, J. K. (1962). A comparison of ram semen collected by the artificial vagina and by electro-ejaculation. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 2(4), 78–81. <https://doi.org/10.1071/EA9620078>
- Maxwell, W. M. C., & Salomon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 613–638. <https://doi.org/10.1071/RD9930613>
- Maxwell, W. M., & Hewitt, L. J. (1986). A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 106(1), 191–193. <https://doi.org/10.1017/S0021859600061906>
- Menchaca, A., Pinczak, A., & Queirolo, D. (2006). Storage of ram semen at 5 ° C : effects of preservation period and timed artificial insemination on pregnancy rate in ewes. *Animal Reproduction*, 2(3), 195–198.
- Moore, R. W. (1985). A comparison of electro-ejaculation with the artificial vagina for ram semen collection. *New Zealand Veterinary Journal*, 33(3), 22–23. <https://doi.org/10.1080/00480169.1985.35140>
- Murphy, E. M., O' Meara, C., Eivers, B., Lonergan, P., & Fair, S. (2018). Optimizing storage temperature of liquid bovine semen diluted in INRA96. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5549–5558. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14205>
- Nagy, S., Sinkovics, G., & Kovács, A. (2002). Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 283–286. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00189-0)
- Nalley, W. M. M., & Arifiantini, R. I. (2013). The hypo-osmotic swelling test in fresh garut ram spermatozoa. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*, 38(4), 212–216. <https://doi.org/10.14710/jitaa.38.4.212-216>
- Nebel, R. L., Vishwanath, R., McMillan, W. H., & Saackea, R. G. (1993). Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 701–712. <https://doi.org/10.1071/RD9930701>
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2010). Effect of storage duration, storage temperature,

- and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>
- Omontese, B. O., Rekwot, P. I., Ate, I. U., Ayo, J. O., Kawu, M. U., Rwuaan, J. S., Nwannenna, A. I., Mustapha, R. A., & Bello, A. A. (2016). An update on oestrus synchronisation of goats in Nigeria. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(2), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.01.002>
- Parkinson, T. J., & Morrell, J. M. (2018). Artificial insemination. In *Veterinary Reproduction & Obstetrics* (pp. 746–777). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-7233-8.00043-4>
- Páez-Barón, E. M., & Corredor-Camargo, E. S. (2014). Evaluación de la aptitud reproductiva del toro. *Ciencia Y Agricultura*, 11(2), 49. <https://doi.org/10.19053/01228420.3837>
- Perteghella, S., Gaviraghi, A., Cenadelli, S., Bornaghi, V., Galli, A., Crivelli, B., Vigani, B., Vigo, D., Chlapanidas, T., Faustini, M., & Torre, M. L. (2017). Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein Friesian (*Bos taurus*) spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Veterinary Science*, 18(1), 81–88. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.1.81>
- Pezzanite, L., Bridges, D. A., Neary, D. M., & Hutchens, T. (2010). Breeding Soundness Examination of Rams and Bucks. *Purdue Extension*, 2, 1–4. <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/as/as-599-w.pdf>
- Prieto, M., García-Martínez, G., Lateulade, I. & Villa, M. (2011). *Sincronización de celos en ovinos con doble dosis de prostaglandina*.
- Purdy, P. H., Spiller, S. F., McGuire, E., McGuire, K., Koepke, K., Lake, S., & Blackburn, H. D. (2020). Critical factors for non-surgical artificial insemination in sheep. *Small Ruminant Research*, 191(March), 106179. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106179>
- Quintero Moreno, A., Manuel Mayorga-Torres, J., & Cardona Maya, W. (2017). El Análisis Seminal Como Herramienta Para Predecir El Potencial Reproductivo En Toros Semen Analysis As a Tool To Predict the Reproductive Potential in Bulls. *Journal of Veterinaty Andrology*, 2(1), 30–

- Quirke, J. F., Hanrahan, J. P., & Gosling, J. P. (1981). Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61(2), 265–272. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0610265>
- Rizkallah, N., Chambers, C. G., de Graaf, S. P., & Rickard, J. P. (2022). Factors Affecting the Survival of Ram Spermatozoa during Liquid Storage and Options for Improvement. *Animals*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ani12030244>
- Rodríguez-Almeida, F. A., Ávila Cota, C. O., Garay, A. A., Sánchez-Ramírez, B., & Castro, J. A. J. (2008). *Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado*. www.specialtymedia.com
- Rosa, H. J. D., & Bryant, M. J. (2002). The “ram effect” as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Ruminant Research*, 45(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00107-4)
- Rosi, A. (2012). “Efecto de la refrigeración y la adición de trehalosa en los parámetros de viabilidad microscópicos de semen bovino.”
- Rubio-Guillén, J. L., Quintero-Moreno, A. A., & González Villalobos, D. M. (2009). Efecto de la criopreservación sobre la integridad de la membrana plasmática y acrosomal de espermatozoides de toros. *Vol. XIX*.
- Sadeghi, S., Del Gallego, R., García-Colomer, B., Gómez, E. A., Yániz, J. L., Gosálvez, J., López-Fernández, C., & Silvestre, M. A. (2020). Effect of Sperm Concentration and Storage Temperature on Goat Spermatozoa during Liquid Storage. *Biology*, 9(9), 300. <https://doi.org/10.3390/biology9090300>
- Saha, A., Asaduzzaman, M., & Bari, F. Y. (2022). Cryopreservation Techniques for Ram Sperm. In *Veterinary Medicine International* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/7378379>
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling

- agents in food: A critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0162-6>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salvador, I., Yániz, J., Viudes-de-Castro, M. P., Gómez, E. A., & Silvestre, M. A. (2006). Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. *Theriogenology*, 66(4), 974–981. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.042>
- Sathe, S. R. (2018). Laparoscopic artificial insemination technique in small ruminants-A procedure review. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00266>
- Skliarov, P., Pérez, C., Petrusha, V., Fedorenko, S., & Bilyi, D. (2021). Induction and synchronization of oestrus in sheep and goats. *Journal of Central European Agriculture*, 22(1), 39–53. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/22.1.2939>
- Somanjaya, R., Fuah, A. M., Rahayu, S., Setiadi, M. A., & Abdullah, L. (2021). PMSG in ewes: A Practical and Efficient Step for Superovulation. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 748(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/748/1/012010>
- Torre, M. L., Maggi, L., Vigo, D., Galli, A., Bornaghi, V., Maffeo, G., & Conte, U. (2000). Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads. *Biomaterials*, 21(14), 1493–1498. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00035-1)
- Tsakmakidis, I. A. (2010). Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern techniques. *Small Ruminant Research*, 92(1–3), 126–130. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.04.017>
- Ungerfeld, R., Dago, A. L., Rubianes, E., & Forsberg, M. (2004). Response of anestrous ewes to the ram effect after follicular wave synchronization with a single dose of estradiol-17 ? *Reproduction Nutrition Development*, 44(1), 89–98. <https://doi.org/10.1051/rnd:2004010>

- Ur, F., Zhao, C., Ali, M., Subhan, M., & Wang, X. (2013). Semen Extenders and Artificial Insemination in Ruminants. *Veterinaria*, 1(1), 1–8.
- Vallejo, D. A., Londoño, J. D., Yepes, Y. A., Tamayo, V., Mejia, A. F., & Maldonado, J. G. (2019). Pregnancy rates in hair sheep after Ovsynch synchronization and a combined intracervical fixed-time artificial insemination and 10-day mating period. *Veterinary World*, 12(11), 1779–1783. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1779-1783>
- Vilanova, X. M., De Briyne, N., Beaver, B., & Turner, P. V. (2019). Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. *Animals*, 9(12), 1–10. <https://doi.org/10.3390/ani9121053>
- Wagenmaker, E. R., Breen, K. M., Oakley, A. E., Tilbrook, A. J., & Karsch, F. J. (2010). The estrous cycle of the ewe is resistant to disruption by repeated, acute psychosocial stress. *Biology of Reproduction*, 82(6), 1206–1215. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078774>
- Walt, L. A. V. A. N. D. E. R. (1978). Ultrastructure of luteolysis induction by prostaglandin f 2 -alpha in the non-pregnant ewe. *Journal of South African Veterinary Association*, 49(2), 121–123.
- Whisnant, C. S., Washburn, S. P., & Farin, P. W. (2000). Current concepts in synchronization of estrus and ovulation of dairy cows. *Journal of Animal Science*, 77(E-Suppl), 1. <https://doi.org/10.2527/jas2000.00218812007700es0042x>
- Wolynetz, M. S., Peters, H. F., S, M., & A, H. F. (1979). *the Insemination of Confined Sheep*. 691, 685–691.
- Yániz, J., Martí, J. I., Silvestre, M. A., Folch, J., Santolaria, P., Alabart, J. L., & López-Gatius, F. (2005). Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 64(8), 1844–1851. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.012>
- Yu, X. J., Wang, J., & Bai, Y. Y. (2018). Estrous synchronization in ewes: The use of progestogens and prostaglandins. *Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences*, 68(4), 219–230. <https://doi.org/10.1080/09064702.2019.1674373>

