

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACION EN CIENCIAS VETERINARIAS



“EFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO SOBRE EL DAÑO ACROSOMAL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN OVINO”

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA:

M.V.Z. EMILIO ROBLES HUITRON

DIRECTOR PRINCIPAL

DR. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA; MEXICO.

OCTUBRE DEL 2010

Efecto de Diferentes Tiempos de Enfriamiento Sobre el Daño Acrosomal en la Criopreservación del Semen Ovino. Tesis presentada por Emilio Robles Huitron como requisito parcial para obtener el Grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra
Director principal

Dr. Clemente Lemus Flores
Asesor

Dr. María Guadalupe Orozco Benítez
Asesor

Dr. Martín Francisco Montaña Gómez
Asesor

Mexicali, Baja California, México.

Octubre del 2010

Lugar y fecha

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
DEDICATORIA.....	III
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
Morfología del esperma.....	6
Producción.....	7
Volúmenes.....	7
Constituyentes del plasma seminal.....	7
Capacidad fecundante.....	9
Aspectos enzimáticos de la reacción acrosomal.....	11
Efecto del procesado del semen.....	12
Daños más comunes.....	13
<i>Estrés osmótico</i>	13
<i>Daño oxidativo</i>	14
Extensores.....	17
Crioprotectores no permeantes.....	19
Crioprotectores permeantes.....	20
LITERATURA CITADA.....	21

Experimento I:

Efecto de diferentes tiempos de enfriamiento sobre el daño acrosomal en la criopreservación del semen ovino

	Pág;
Titulo.....	26
Resumen.....	26
Summary.....	27
Introducción.....	30
Materiales y Métodos.....	31
Resultados.....	35
Discusión.....	36
Referencias.....	39

Índice de cuadros

Cuadro

Pág;

- | | | |
|---|--|----|
| 1 | Diferencias estadísticas para variables de viabilidad espermática al descongelado con diferentes tiempos de enfriamiento en la criopreservación. | 44 |
|---|--|----|

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A la Universidad Autónoma de Nayarit y a la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme realizar parte de mi trabajo de investigación en dicha institución.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por su apoyo económico durante la realización de mis estudios, muchas gracias.

Especialmente a mi director de tesis Dr. Víctor Manuel Gonzalez Vizcarra por todo el conocimiento, apoyo y paciencia brindada durante todo este tiempo muchas gracias y espero no sea la primera y última vez el poder trabajar con usted.

A mi tutor Dr. Clemente Lemus Flores por la guía, consejos y también mucha paciencia brindada en todos estos años que he tenido el honor de conocerlo, muchas gracias.

A mis tutores María Guadalupe Orozco Benítez por el apoyo brindado en mi trabajo de laboratorio así como todo el tiempo incondicional brindado, gracias. Al Dr. Martin Francisco Montaña Gómez así como al Dr. Enrique Silva Peña por el tiempo y apoyo prestado.

A la M. en C. Maritza Manrique Núñez por su apoyo en la coordinación de maestría y su amistad muchas gracias.

\

DEDICATORIA

A mis padres, Emilio Robles González y Dolores Huitron Ruiz, por todo el amor y apoyo incondicional brindado en todas mis metas.

A mis hermanos Horacio, Yesenia y Oswald.

A mi esposa e hijo.

A Dios gracias.

Efecto de diferentes tiempos de enfriamiento sobre el daño acrosomal en la criopreservación del semen ovino

RESUMEN: Este trabajo se realizó en los laboratorios de reproducción del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California así como en la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit, con el objetivo de evaluar el efecto de cinco tiempos de refrigeración en la calidad espermática durante la criopreservación del semen ovino. Los sementales empleados fueron dos de raza Kathadin, obteniéndose dos eyaculados por cada semental por extracción. Se utilizaron dos diluyentes, en una proporción 20-60-20% a base de Triladyl, agua bidestilada y yema de huevo, para el segundo diluyente se sustituyó el agua bidestilada por agua de coco. Se llenaron y se enfriaron diez pajillas de 0.25mL, por tratamiento para su congelación y almacenaje en un termo criogénico a -196°C hasta su descongelación, realizada en baño María a $37^{\circ}\text{C}/30$ segundos. Las variables evaluadas fueron porcentajes de motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma. Bajo un arreglo experimental factorial más un control (120minutos), se emplearon cinco tiempos de refrigeración (15, 30, 45, 60 y 75 minutos) y los dos tipos de diluyentes. Para las variables porcentaje de motilidad y espermatozoides vivos al descongelado se encontró diferencia significativa ($P < 0.001$), siendo los tratamientos T8 (60min) y T10 (75min) a base de agua bidestilada los que presentaron mayores porcentajes; en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma los tratamientos T4 (30min), T8 (60min) y T11 (120min) fueron similares y los de más alto porcentajes; los tratamientos a base de agua de coco presentaron muy bajos porcentajes. Se puede reducir el

tiempo de enfriamiento sin afectar la viabilidad del espermatozoide, el agua de coco no mostro resultados favorables para la conservación de la viabilidad de la célula espermática.

Palabras clave: diluyente, ovinos, tiempos de refrigeración.

Abstract: The study was done at reproduction laboratory of the Veterinary Science Research Institute of Autonomous University of Baja California and at Veterinary Medicine and Zootechnic academic unit of the Autonomous University of Nayarit, both in Mexico, with the aim of evaluating the effect of five times of refrigeration on spermatic quality during ovine semen cryopreservation. Two Kathadin rams were used to obtain two eyaculations from each one. Two extenders were used, in a proportion of 20-60-20% with Triladyl, distilled water and egg yolk, respectively. In the second extender, distilled water was replaced by Coco water. Ten pajillas of 0.25 mL per treatment were filled, frozen and stored in a cryogenic thermo at -196°C until they were defrosted in warm water at 37°C during 30 seconds. Variables evaluated were: motility, alive spermatozoa and alive spermatozoa with acrosoma percentages. In a factorial experimental design plus a control (120 minutos), five refrigeration times (15, 30, 45, 60 and 75 minutes) and two types of extenders were used. Motility and alive spermatozoa percentages at defrosting were higher ($P < 0.001$) with 60 and with 75 min of refrigeration times with distilled water. Alive spermatozoa with acrosoma percentage were similar and higher with 30 min, 60 min and 120 min refrigeration times; Coco water treatments had very low percentages. Refrigeration time can be reduced without affecting spermatozoon viability. Coco water did not show favorable results for conservation of spermatic cell viability.

Key words: refrigeration time, extenders, ovine.

INTRODUCCIÓN.

La criopreservación de semen y la utilización del semen congelado mediante inseminación artificial ha causado un gran impacto sobre la reproducción animal y humana. Innumerables crías de diferentes especies han nacido a partir del uso de semen congelado. Sin embargo constantemente se modifican los protocolos de congelación a fin de obtener mejores resultados en relación a la supervivencia espermática y fertilidad del semen al descongelado (Stornelli *et al.*, 2005).

Los resultados de la inseminación artificial con semen congelado resultan hasta ahora insatisfactorios en ovinos. La fertilidad obtenida con semen congelado es menor a la de semen fresco, debido principalmente a una baja viabilidad post-descongelamiento y a un trastorno en la proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000).

Esto se debe a los daños ocasionados en la membrana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación, donde se altera la función metabólica del espermatozoide, reduciendo así el número de células viables y ocasionando una capacitación espermática prematura (Sandoval *et al.*, 2007).

El problema real que presenta la criopreservación no es la habilidad de la célula espermática para mantenerse viable durante el almacenaje a -196°C , sino la combinación de efectos que en el proceso del congelado descongelado tienen una acción dañina sobre la fisiología y morfología espermática (Watson, 2000).

El daño celular que ocurre por la congelación y la descongelación se refleja en una disminución de la motilidad y daños ultraestructurales en la membrana (Johnson, 2000).

El espermatozoide ovino es aun más susceptible a estos daños por ser pobre en colesterol y tener una menor relación colesterol-fosfolípidos que otras especies, permitiendo que la capacitación espermática ocurra más rápido (Ruiz et al., 2007).

En base a lo anterior el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de cinco diferentes tiempos de refrigeración en la calidad espermática durante el proceso de criopreservacion de semen ovino.

REVISION DE LITERATURA.

Morfología del esperma

El espermatozoide o gameto masculino, es una célula especializada, que posee un solo juego del número corriente de cromosomas de la especie. Es una célula terminal, cuyo papel único o principal es el de transportar el genoma paterno hasta el óvulo. Para realizar su función el espermatozoide maduro está equipado con estructuras especializadas como son una membrana plasmática organizada en distintos dominios funcionales, la vaina mitocondrial , el flagelo, el acrosoma y la teca perinuclear que constituye un citoesqueleto único (Soares, 2007).

La célula espermática madura ha sido dividida en tres regiones, la cabeza que consiste de un núcleo condensado, la teca perinuclear y el acrosoma, el cuello que une a la cabeza con el flagelo, el flagelo que contiene el axonema, las mitocondrias y otros elementos estructurales responsables del movimiento de la célula (Soares, 2007).

Producción

La concentración espermática indica la riqueza en espermatozoides del semen, y su cantidad es muy importante tanto como para la fecundación natural como artificial. A sido calculada sobre un milímetro cubico de esperma y varia mucho según la especie animal siendo en el ovino 280,000 espermatozoides por milímetro cubico (Vatti, 1981).

Volúmenes

El volumen del eyaculado es muy diferente según la especie y los individuos y está determinado por las condiciones raciales, ambientales e individuales. Se mide generalmente en el recipiente graduado en que se colecta la muestra, siendo en promedio de 1 mililitro. El volumen eyaculado puede variar también por otros factores como la frecuencia de colección y la habilidad del operador (Diaz et al., 2005).

Constituyentes del plasma seminal

El plasma seminal está constituido por las secreciones de las glándulas bulbouretrales, la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y los conductos deferentes, siendo un vehículo isotónico, nutritivo y protector al

permanecer tamponado, tendiendo hacia un PH normalmente neutro (5.9 - 7.3). Contiene también agentes antimicrobianos como la seminalplasma e inmunoglobulinas, principalmente IgA y una gran variedad de hormonas como andrógenos, estrógenos, FSH, LH, gonadotropina coriónica, hormona del crecimiento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, destacando entre ellas las prostaglandinas (Diaz et al., 2005).

El plasma espermático sirve de vehículo para los espermatozoides, pero su importancia radica en que contiene sustancias como sales minerales (calcio, sodio, potasio, magnesio, fosforo), nitrógeno, fosfatasas, albuminas, proteínas, fructosa, ácido cítrico, que condicionan la actividad funcional de los espermatozoides, su maduración, su respiración y su movilidad (Soares, 2007).

Constituyentes del plasma seminal, Agua 75 %, Fructuosa 250 mg / 100 ml, Ácido cítrico 110-260, Sorbitol 26-170, Inositol 7- 14, Glicerilfosforilcolina 1100-2100, Sodio 178, Potasio 89, Calcio 6, Magnesio 6, Cloro 86, Prostaglandinas 740 µg / ml y Proteínas 5 g / 100 ml (Diaz et al., 2005).

Capacidad Fecundante

En condiciones fisiológicas los espermatozoides eyaculados de mamíferos no reúnen las condiciones adecuadas para fecundar el ovocito, debiendo experimentar una serie de cambios estructurales y fisiológicos antes de adquirir dicha capacidad. Este proceso ocurre “in vivo” en el tracto genital de la hembra, y se conoce con el nombre de “capacitación espermática” (Cardona y Cadavid, 2005).

Estas modificaciones habilitan la célula espermática para sufrir la reacción acrosómica (RA) mediante cambios a nivel de membrana que facilitan la penetración de las cubiertas del ovocito. Al iniciarse el proceso de capacitación, el espermatozoide adquiere una hipercinesis caracterizada por un batido de flagelo más vigoroso y una mayor amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (hiperactivación, HA) (Cardona y Cadavid, 2005; Soares, 2007).

La capacitación se realiza de manera secuencial sobre la población espermática. La adquisición del estado “capacitado” es más rápido “in vivo” que “in vitro”, siendo in vivo un tiempo de 2 horas y en in vitro 5 horas, posiblemente debido a las múltiples interacciones bioquímicas entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra (López et al., 2005; Cardona et al., 2006).

El lugar de deposición del semen durante la cubrición, característico de cada especie, condiciona el momento del inicio de la capacitación espermática así como el tiempo requerido para completarla. En especies de deposición vaginal (ovino, caprino, conejo) la capacitación comienza durante el contacto de los espermatozoides con el moco cervical. En estos animales, las criptas presentes en el tracto cervical suponen un reservorio de espermatozoides con capacidad fertilizante (López et al., 2005; Cardona et al., 2006).

Los espermatozoides de los mamíferos sufren algunos cambios estructurales y bioquímicos al recorrer el tubo genital de la hembra, que los habilitan para fertilizar al óvulo. Este proceso es la capacitación espermática (CE) y es indispensable para que ocurra la fertilización. La criopreservación del semen, según la raza en ovinos y edad del macho en bovinos, causa cambios en el espermatozoide, similares a los que ocurren en la CE, por lo que se le denomina criocapacitación (Rodríguez et al., 2008).

Algunos cambios celulares que ocurren con la CE son: aumento en la permeabilidad y decremento en la relación colesterol:fosfolípidos en la membrana, aumento del Ca^{+2} intracelular y alcalinización citoplasmática, activación de los canales de Ca^{+2} y de Na/K , generación de oxígeno reactivo, y fosforilación de la tirosina de las proteínas. Si estos cambios son inducidos prematuramente por la criopreservación, pueden reducir las tasas de

concepción si el semen se usa en la inseminación artificial. La habilidad del espermatozoide capacitado para adherirse a las células epiteliales del oviducto es menor que la del espermatozoide no capacitado, *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, menos espermatozoides funcionales estarían disponibles en el oviducto para fertilizar al óvulo (Moce y Graham, 2006; Rodríguez et al., 2008).

El acrosoma es una vesícula de secreción que se encuentra en la cabeza del espermatozoide y contiene numerosas enzimas hidrolíticas. Este organelo tiende a romperse en el proceso de refrigeración y calentamiento teniendo por consecuencia que el espermatozoide pierde su capacidad fecundante (Curtis et al., 1998; Manosalva et al., 2005).

Se ha observado en bovinos, humanos y ratones que los espermatozoides sometidos a algún proceso de preservación en el tiempo, como la refrigeración y el congelamiento, penetran en los ovocitos en un tiempo menor (Manosalva et al., 2005).

Aspectos enzimáticos de la reacción acrosomal

El acrosoma espermático, vesícula secretora procedente del aparato de Golgi, está formado por una envoltura acrosómica en cuyo interior existen una

gran variedad de enzimas hidrolíticas. Dichas enzimas, desempeñan un papel esencial durante la RA, siendo la liberación inicial de acrosina un estimulador de la RA y el responsable de la fijación del espermatozoide al ovocito (Cardona et al., 2006).

Efecto del procesado del semen

El proceso de criopreservación de semen en ovinos causa una disminución de la motilidad y viabilidad espermática, así como cambios relacionados a la capacitación espermática. Estas alteraciones producen una disminución de la capacidad fecundante del Semen criopreservado, por lo que al ser usado se obtienen bajas tasas de concepción (Watson, 2000).

Como se menciona la pobre supervivencia espermática, es uno de los principales problemas, por lo que el conocimiento de las características biofísicas de la membrana plasmática espermática es fundamental para proponer soluciones (Holt, 2000).

Los daños producidos en los espermatozoide durante el proceso de criopreservación podrían ser prevenidos parcialmente controlando la velocidad

de congelamiento, usando un dilutor adecuado y agregando agentes crioprotectores apropiados (Sandoval et al., 2007).

Daños más comunes

Es bien conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C induce un estrés letal en algunas células, el cual es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente. Este fenómeno es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie (Stornelli et al., 2005; Moce y Graham, 2006).

Estrés osmótico

Mazur estableció que cada tipo celular posee una velocidad óptima de congelación que garantiza su supervivencia luego de la criopreservación. Si la velocidad de congelación es demasiado rápida o demasiado lenta el estrés producido por el proceso de criopreservación aumenta. El estrés inducido por la formación de cristales de hielo está asociado a los cambios en la presión osmótica de la fracción no congelada. Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación los cristales de hielo se nuclean y el agua pura cristaliza formando hielo. Los solutos permanecen disueltos en la fracción de

agua líquida y por lo tanto la presión osmótica de la solución aumenta. La proporción de agua cristalizada como hielo y por lo tanto la presión osmótica de la solución restante depende de: la temperatura, la velocidad de descenso de la misma y el volumen de la fracción no congelada. En general se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una óptima sobrevivencia, implicando entonces que el enfriamiento celular debería ser rápido (Watson, 2000; Stornelli et al., 2005).

Daño oxidativo

Se ha demostrado que los procesos de criopreservación inducen a la formación de especies reactivas de oxígeno las cuales poseen efectos tóxicos sobre las células y comprometen su funcionalidad. Diferentes antioxidantes han sido usados como parte de variados diluyentes en distintas especies y se ha verificado el efecto benéfico de los mismos. Sin embargo no debe olvidarse que el daño oxidativo es solo uno de los diferentes factores de estrés al que es sometido el esperma durante el proceso de congelación (López et al., 2001; Membrillo et al., 2003).

Las alteraciones son parcialmente producidas por el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de criopreservación, causando daños oxidativos en las biomoléculas que

componen al espermatozoide, como peroxidación lipídica, oxidación de las proteínas y daños en el ADN (Lopez et al., 2001; Membrillo et al., 2003).

Este estrés funcional terminará a corto plazo con la muerte de los espermatozoides que la experimentan y, además, por la liberación del exceso de ROS, potenciará el fenómeno de peroxidación lipídica en los espermatozoides que todavía mantenían la funcionalidad, lo cual da lugar al “envejecimiento prematuro”, que provocará la muerte espermática en corto período de tiempo (Vasco et al., 2007).

El espermatozoide ovino es muy susceptible a la acción de las especies reactivas de oxígeno, ya que su membrana plasmática presenta una alta cantidad de fosfolípidos que contienen principalmente ácidos grasos insaturados, predominando el ácido docosahexaenoico que es un ácido graso de cadena larga de 22 carbonos y 6 dobles enlaces (Ruiz et al., 2007).

También es susceptible por ser pobre en colesterol y tener una menor relación colesterol-fosfolípidos que otras especies, permitiendo que la capacitación espermática ocurra más rápido que en otras especies (Ruiz et al., 2007).

Consecuentemente, los espermatozoides sólo serían viables un corto periodo de tiempo en el tracto reproductivo de la hembra y, por lo tanto, tendrían una menor oportunidad de poder fecundar los ovocitos (Sandoval et al., 2007).

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen. El primer cambio de volumen ocurre cuando la célula es colocada dentro de un diluyente, el cual contiene sustancias crioprotectoras como glicerol, y posteriormente cuando la solución es congelada. (Varela, 1999).

Más tarde ocurren cambios de volumen cuando la solución es descongelada. Estos cambios de volumen están asociados a cambios de la concentración de iones y electrólitos en las soluciones intra y extra celular. La forma en que ocurren estas modificaciones determinan la mayor o menor capacidad de la célula para soportar la injuria a la que se ve sometida (Varela, 1999).

Los cambios de volumen son solo uno de los factores de estrés a los que la célula se ve sometida durante el proceso de criopreservación. Otros factores

de estrés están representados por los cambios de temperatura, el estrés tóxico producido por la exposición a crioprotectores, la formación y disolución de hielo así como los cambios de osmolalidad en el ambiente extracelular (Stornelli et al., 2005).

Extensores

Existe una gran variedad de diluyentes y métodos empleados en la conservación del semen. Sin embargo, todos los medios empleados para este fin, prolongan la viabilidad de la célula espermática por un período limitado de tiempo (refrigeración) o indefinidamente (congelación), rentabilizando en cualquier caso el número de dosis obtenidas por eyaculado. Los diluyentes empleados en la conservación de células espermáticas deben cumplir una serie de condiciones (Varela, 1999).

Ser isotónico con el plasma seminal cuando es utilizado en refrigeración, e hiperosmótico en congelación; Poseer un pK próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación; Contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío, clasificadas en función de su capacidad de atravesar la membrana plasmática en: sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes; Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la

glucosa y fructosa las más utilizadas; Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual se utilizan antibióticos en su composición; Aumentar el volumen substancialmente con el fin de poder realizar múltiples inseminaciones (López, 1992).

El *pH* óptimo de los diluyentes empleados en la conservación espermática se mantiene en torno a la neutralidad, siendo necesaria la presencia de soluciones tampones para su mantenimiento. Los tampones deben tener un *pK* entre 6 y 8 (preferiblemente 7), máxima solubilidad en agua, han de atravesar selectivamente la membrana plasmática, reducir el efecto de la concentración de sales, tener propiedades quelantes, ser estables y resistir la degradación enzimática. Si bien las soluciones tampones más comúnmente empleadas son el citrato, fosfato y bicarbonato sódico, estudios más recientes muestran los compuestos zwitteriónicos ó anudo-orgánicos con mayor capacidad estabilizadora (López, 1992).

Los azúcares presentes en los diluyentes ejercen un efecto positivo sobre la viabilidad espermática debido a su aporte energético al espermatozoide (son capaces de metabolizar glucosa, fructosa, manosa y arabinosa ,esta última por vía oxidativa) y a su acción como crioprotectores, contribuyendo a mantener el equilibrio osmótico (López, 1992).

Otra particularidad de los medios para la conservación espermática es la presencia de crioprotectores. Dichas moléculas, de características bien definidas en cuanto a tamaño y permeabilidad, protegen las estructuras celulares frente a las bajas temperaturas, siendo beneficiosa su adición en refrigeraciones a bajas temperaturas 5°C, y necesaria en la congelación. Los crioprotectores pueden clasificarse atendiendo al grado de actividad de paso sobre la membrana plasmática en (López, 1992).

Crioprotectores no permeantés

Son aquellos que al ser incorporados en el medio de dilución recubren la membrana plasmática del espermatozoides protegiendo su estructura de la acción del frío. Estos no atraviesan la membrana espermática debido a su alto peso molecular o especificidad. Destacan por su utilización los azúcares (sacarosa, rafinosa, trehalosa y lactosa, las proteínas de la leche descremada y yema de huevo). La adición de trehalosa y sacarosa al dilutor ha obtenido buenos resultados en la criopreservación de semen ovino (Sandoval et al., 2007).

Crioprotectores permeantes

Son aquellos capaces de penetrar en la célula de forma uniforme evitando el estrés osmótico, produciendo deshidratación celular por la sustitución del agua intracelular, amortiguando el incremento de la concentración de solutos del medio extracelular e impidiendo la formación de cristales de hielo en el interior. Destaca por su utilización el glicerol, dimetil-sulfóxido (DMSO), propilen-glicol, etilen-glicol, metanol y etanol siendo el primero el que ha mostrado mejores resultados en estudios de criopreservación de semen ovino en relación a la motilidad progresiva post-descongelamiento (Sandoval et al., 2007).

La adición de antibióticos a los distintos diluyentes es opcional si bien, se recomienda su utilización como forma de control de la población de gérmenes presentes en el eyaculado. Los antibióticos más utilizados son la penicilina G-sódica y el sulfato dihidro-estreptomicina (Alba y Silveira, 2005).

LITERATURA CITADA

- Alba-Gomez, L. O. y E. A. Silveira-Prado. 2005. Perdurabilidad de la efectividad de la conbinacion penicilina-estreptomocina en la reducci3n de la carga bacteriana del semen de toro congelado en pastillas. Redvet. 6(10):1-7.
- Cardona, M. W. D., y A. P. Cadavid. 2005. Evaluacion de la reacci3n acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosac3ridos manosa y N-acetilglucosamina. Act. Urol. Esp. 29(7):676-684.
- Cardona-Maya, W. D., M. Olivera-Angel y A. P. Cadavid 2006. Evaluacion de la reacci3n acrosomal inducida por el ionoforo de calcio: una aproximaci3n m3s real de la capacidad fecundante del espermatozoide. Arch. Esp. Urol. 59(5):501-510.
- Curtis, G.G., R. Vishwanath., P. Colin., D. L. Garner and P. J. Casey. 1998. Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. Journal of Andrology.19(6):704-709.
- Diaz-Güemez, R. P., M. Figueroa-G3mez y P. Mejia-Gutierrez. 2005. Memorias de Congelacion de semen. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la Univercidad Nacional Autonoma de Mexico.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen estor-age of semen. Anim. Reprod. Sci. 62:3-22.

Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser P., Maxwell, W.M., (2000). Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci 62, 143-172.

Lopez, R. E., B. Stone., C. N. Martinez y R. P. Marrs. 2001. Impacto del acido ascórbico y su correlacion con la reacción acrosomal, movilidad espermática, acridina naranja y prueba de penetración en huevo de hámster. Anales Medicos, hospital ABC 46(2):76-82

Lopez-Brea J. G. 1992. Congelacion de semen en la especie ovina: características biologicas de las dosis descongeladas. Disertación doctoral. Universidad complutense de Madrid facultad de veterinaria.

Lopez-Godinez, J., M. Ramirez-Lopez., D. Morales-Gonzalez., M. G. Martinez-Cadena y J. Garcia-Soto. 2005. Participacion de una proteína Rho Cinasa En la reacción acrosomal del espermatozoide de erizo de mar. Memorias del XIV congreso de bioenergética y biomembranas. Sociedad mexicana de bioquímica A. C.

Manosalva, I., C. Cortes., V. V. Leiva, M. C. Valdivia, M. S. De los Reyes, C. R. Barros y R. M. Moreno. 2005. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. Rev. Inv. Vet. 16(2):114-128.

Membrillo-Ortega A. A. Cordova-Izquierdo, J. J. Hicks-Gomez, I. M. Olivares-Corichi, V. M. Martinez-Torres y J. J. Valencia-Mendez. 2003. Peroxidacion lipidica y antioxidantes en la preservación de semen. Interciencia. 28(12):699-704.

Moce, E. and J. K. Graham. 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.* 84:826-833

Rodríguez-Almeida F. A., C. O. Ávila-Cota., A. Anchondo-Garay., B. Sanchez-Ramirez y J. A. Jimenez-Castro.2008. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* 42:399-406.

Ruiz, G. L., A. A. Santiani, M. R. Sandoval, L. W. Huanca, C. A. Delgado, S. L. Coronado, y P. C. Alzamora. 2007. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev. Inv. Vet.* 18(2):99-106.

Sandoval, M. R. A. A. Santiani, L. G. Ruiz, V. V. Leyva, L. S. Coronado and A. C. Delgado. 2007. Ovine semen cryopreservation using three extenders and four combinations of permeant and non permeant agents. *Rev Inv Vet Perú.* 18(2):107-114.

Soares-Valente, S. I. 2007. Criopreservacion de semen ovino: Comparacion entre dos dilutores. Licenciatura em biología Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Portugal.

- Stornelli, M. C. C. M. Tittarelli, C. A. Savignone and M. A. Stornelli. 2005. Criopreservation effect on fertility. *Analecta Veterinaria*. 25(2):28-35.
- Varela-Bettencourt, M. E. 1999. Caracterização de Parâmetros Reprodutivos nas Raças Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. Universidade técnica de Lisboa faculdade de medicina veterinária. Dissertação de Mestrado em Produção Animal.
- Vasco M. D., M. M. Hernández, M. J. Vásquez, E. Martinez y J. Roca. 2007. Sustancias Oxígeno Reactivas (ROS) en Semen Congelado-Descongelado de Porcino. *Ciencia y Tecnología* 1:23-29.
- Vatti Giuseppe. 1981. Ginecologia y obstetricia veterinarias. Ed. Hispano americana. México D. F.
- Watson P. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod. Sci.* 60-61:481-492.

Artículo 1.

Titulo: Efecto de diferentes tiempos de enfriamiento sobre el daño acrosomal en la criopreservación del semen ovino.

Autores: Emilio Robles Huitron, Víctor Manuel González Vizcarra, Clemente Lemus Flores, María Guadalupe Orozco Benítez y Enrique Silva Peña.

Domicilio: Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias.

Universidad Autonoma de Baja California, Mexicali, Mexico.

Enviado a la Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 617-2418-3-SM.DOC. 2010-08-13. En revisión.

**Efecto de diferentes tiempos de enfriamiento sobre el daño acrosomal en
la criopreservación del semen ovino.**

**Emilio Robles Huitron¹, MVZ; Clemente Lemus Flores^{2*}, PhD; Víctor M
González Vizcarra¹, PhD; María Guadalupe Orozco Benitez², PhD; Enrique
Silva Peña³, PhD.**

*¹Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Investigación en
Ciencias Veterinarias.*

*²Universidad Autónoma de Nayarit. Posgrado en Ciencias Biológico
Agropecuarias.*

³Universidad de Colima. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

RESUMEN

Este trabajo se realizó en los laboratorios de reproducción del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California así como en la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit, con el objetivo de evaluar el efecto de cinco tiempos de refrigeración en la calidad espermática durante la criopreservación del semen ovino. Los sementales empleados fueron dos de raza Kathadin, obteniéndose dos eyaculados por cada semental por extracción. Se utilizaron dos diluyentes, en una proporción 20-60-20% a base de Triladyl, agua bidestilada y yema de huevo, para el segundo diluyente se sustituyó el agua bidestilada por agua de coco. Se llenaron y se enfriaron diez pajillas de 0.25mL, por tratamiento para su congelación y almacenaje en un termo

criogénico a -196°C hasta su descongelación, realizada en baño María a 37°C/30 segundos. Las variables evaluadas fueron porcentajes de motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma. Bajo un arreglo experimental factorial más un control (120 minutos), se emplearon cinco tiempos de refrigeración (15, 30, 45, 60 y 75 minutos) y los dos tipos de diluyentes. Para las variables porcentaje de motilidad y espermatozoides vivos al descongelado se encontró diferencia significativa ($P < 0.001$), siendo los tratamientos T8 (60min) y T10 (75min) a base de agua bidestilada los que presentaron mayores porcentajes; en el porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma los tratamientos T4 (30min), T8 (60min) y T11 (120min) fueron similares y los de más alto porcentajes; los tratamientos a base de agua de coco presentaron muy bajos porcentajes. Se puede reducir el tiempo de enfriamiento sin afectar la viabilidad del espermatozoide, el agua de coco no mostro resultados favorables para la conservación de la viabilidad de la célula espermática.

Palabras clave: *diluyente, ovinos, tiempos de refrigeración.*

*Autor para correspondencia: Dr. Clemente Lemus Flores. Universidad Autónoma de Nayarit. Ciudad de la cultura Amado Nervo, Tepic Nayarit México.
Correo electrónico: drclemus@yahoo.com

Summary

The study was done at reproduction laboratory of the Veterinary Science Research Institute of Autonomous University of Baja California and at Veterinary Medicine and Zootechnic academic unit of the Autonomous University of

Nayarit, both in Mexico, with the aim of evaluating the effect of five times of refrigeration on spermatic quality during ovine semen cryopreservation. Two Kathadin rams were used to obtain two ejaculations from each one. Two extenders were used, in a proportion of 20-60-20% with Triladyl, distilled water and egg yolk, respectively. In the second extender, distilled water was replaced by Coco water. Ten pajillas of 0.25 mL per treatment were filled, frozen and stored in a cryogenic thermo at -196°C until they were defrosted in warm water at 37°C during 30 seconds. Variables evaluated were: motility, alive spermatozoa and alive spermatozoa with acrosoma percentages. In a factorial experimental design plus a control (120 minutos), five refrigeration times (15, 30, 45, 60 and 75 minutes) and two types of extenders were used. Motility and alive spermatozoa percentages at defrosting were higher ($P < 0.001$) with 60 and with 75 min of refrigeration times with distilled water. Alive spermatozoa with acrosoma percentage were similar and higher with 30 min, 60 min and 120 min refrigeration times; Coco water treatments had very low percentages. Refrigeration time can be reduced without affecting spermatozoon viability. Coco water did not show favorable results for conservation of spermatic cell viability.

Key words: refrigeration time, extenders, ovine.

Resumo

Este trabalho foi realizado nos laboratórios da reprodução do instituto das investigações em ciências veterinárias da universidade de Baja California assim

como na unidade acadêmica de medicina veterinária e Zootechnics da universidade autônoma de Nayarit, com o alvo de avaliar o efeito de cinco vezes do refrigeration na qualidade do espermática durante a cryo-preservação do sémen ovine. Os empregados do garanhão eram dois da raça Kathadin, obtendo-se dois eyaculados por cada garanhão um pela extração. Dois prolongamentos foram usados, em uma proporção 20-60-20% com yolk de Triladyl, de água destilada e de ovo, porque o segundo prolongamento substituiu a água destilada pela água de Coco. Encheram-se e dez refrigeraram fora pajillas de 0.25mL, pelo tratamento para seus congelação e armazenamento em um thermus criogênico a -196°C até que seu degele, em vão Maria realizada aos segundos 37°C/30. As variáveis avaliadas eram porcentagem viva do motilidad, espermatozóides vivos e espermatozóides com acrosoma. Sob um ajuste experimental factorial mais um controle (120minutos), os tipos de prolongamentos foram usados cinco vezes do refrigeration (15, 30, 45, 60 e 75 minutos) e. Para a porcentagem das variáveis do motilidad e espermatozóides vivos ao degelado era a diferença significativa ($P < 0.001$), sendo os tratamentos T8 (60min) e T10 (75min) com água destilada aqueles que apresentado/indicou majores porcentagem; na porcentagem de espermatozóides vivos com acrosoma os tratamentos T4 (30min), T8 (60min) e T11 (120min) eram similares e aqueles de uma porcentagem mais elevada; os tratamentos com água dos Cocos apresentada/indicaram a porcentagem muito baixa. A época de refrigerar sem afetar a viabilidade do espermatozóide, a água dos Cocos pode ser não resultados favoráveis reduzidos do mostro para a conservação da viabilidade da pilha do espermática.

Palabras claves: *prolongamento, ovines, épocas do refrigeration.*

Introducción

La fertilidad obtenida con semen congelado de ovino es menor a la de semen fresco, debido principalmente a una baja viabilidad post-descongelamiento y a un trastorno en la proporción de espermatozoides sobrevivientes (Watson, 2000; Cabrera y Pantoja, 2008).

La reducción de la fertilidad asociada al semen congelado es atribuida en parte a la alteración de la estructura y función de la membrana durante el proceso de refrigeración, congelación y descongelación (Curtis et al., 1998; Johnson, 2000; Merino, 2003; Stornelli et al., 2005).

Algunos autores suponen que durante el enfriamiento del semen, la membrana plasmática sufre cambios en el estado físico de los lípidos que la componen, experimentando una transición entre la fase del estado líquido-semicristalino al estado de gel, este fenómeno hace que la membrana se vuelva rígida y pierda elasticidad (Varela, 1999; Manosalva et al., 2005; Gurrola et al., 2006; Vasco et al., 2007).

Es conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30 °C y 0 °C induce estrés letal en algunas células, esto proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente. Ya que un lento enfriamiento induce estrés

sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relacionaría con un cambio de fase lipídica y alteraría el estado funcional de la membrana (Stornelli et al., 2005; Moce y Graham., 2006; Barrietos et al., 2009).

Holt (1991) obtuvo evidencias de que el cambio de fase podría ser el responsable de las manifestaciones de crioinjurias observadas durante el calentamiento celular post descongelación. Estas evidencias fueron obtenidas a partir del estudio de la integridad de membrana de espermatozoides de carnero durante los procesos de enfriamiento (entre 5 y -20 °C) y posterior calentamiento hasta 30°C. En este experimento se observó que los mayores daños de membrana ocurrían durante el calentamiento luego de la descongelación (Membrillo et al., 2003; Brito et al., 2004; Stornelli et al., 2005).

El espermatozoide ovino es más susceptible a estos daños de estrés térmico por frío que el de otras especies, por ser pobre en colesterol, permitiendo que la capacitación espermática ocurra rápido y la correspondiente reducción en la fertilidad (Cardona et al., 2006; Ruiz et al., 2007; Cardozo et al., 2009).

En base a lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cinco diferentes tiempos de refrigeración en la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen ovino.

Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de reproducción del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad

Autónoma de Baja California en su primera fase que consiste en la colección, evaluación y criopreservación del semen; así como en el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia dependiente de la Universidad Autónoma de Nayarit en su segunda fase que consiste en la evaluación del semen al descongelado.

Animales

Se utilizaron dos sementales de raza Kathadin ubicados en la posta de ovinos dentro de las instalaciones del IICV, mismos que permanecen estabulados en corraletas individuales, alimentados con una dieta establecida a base de (Alfalfa) y agua a libre acceso, no se realizó ningún manejo especial para los sementales únicamente previo entrenamiento de los mismos para la monta y recolección con vagina artificial.

Colección del semen

La colección del semen se realizó en las horas más frescas de la mañana, por medio de una vagina artificial de acuerdo a lo descrito por Hernández y Carrillo (2005) y Mellisho y Gallegos (2006), con modificaciones que consisten en la utilización de condones de uso humano previamente lavados, esto con la finalidad de eliminar el espermicida que contienen, a su vez se montan a una perilla que su función es mantener abierta la entrada del condón, para facilitar la entrada del pene al mismo, recolectado el semen se procede a desmontar el condón y se deposita en un recipiente térmico de

boca ancha a 37°C; Se obtuvieron dos eyaculados por cada semental en cada sesión por extracción.

Inmediatamente después de obtener el eyaculado se procedió a su evaluación tanto macroscópica y microscópica, con el propósito de determinar la calidad del eyaculado para su posterior dilución y congelado.

Tratamientos

Para este trabajo se utilizaron dos diluyentes, a base de Triladyl (Minitube Ref. 13500/0250) en una proporción de un 20%, agua de coco 60% y 20% yema de huevo, para el segundo diluyente se utilizaron las mismas proporciones simplemente sustituyendo el agua de coco por agua bidestilada.

Las pajillas fueron extraídas del nitrógeno líquido e introducidas en un baño María a 37°C durante 30 segundos, se sacó la pajilla, se secó con servilletas de papel absorbente y se dejó estabilizar por dos minutos a temperatura ambiente para su posterior evaluación de acuerdo a Quintero (2003) y Sandoval et al (2007).

Para evaluar el efecto de los cinco diferentes tiempos de refrigeración en la calidad espermática durante el proceso de criopreservación del semen ovino, se evaluaron diez pajillas por tratamiento; para porcentaje de motilidad, de acuerdo a Martín-Rillo et al (1996), porcentaje de espermatozoides vivos y muertos empleando la tinción eosina-nigrosina de acuerdo a Barth y Oko (1989) y Hernández (1998) y porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma utilizando la triple tinción de acuerdo a Talbot y Chacón (1981).

Análisis estadístico

Bajo un arreglo experimental factorial más un control, se emplearon cinco tiempos de refrigeración del semen antes de congelar y dos tipos de diluyentes, considerando como control un tiempo de refrigeración a tiempo fijo de acuerdo al protocolo estándar de dos horas con un solo diluyente (Agua bidestilada). Los tratamientos quedaron de la forma siguiente: T1.- 15 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua de coco, T2.- 15 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua bidestilada, T3.- 30 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua de coco, T4.- 30 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua bidestilada, T5.- 45 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua de coco, T6.- 45 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua bidestilada, T7.- 60 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua de coco, T8.- 60 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua bidestilada, T9.- 75 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua de coco, T10.- 75 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua bidestilada, T11.- 120 minutos de refrigeración con diluyente a base de agua bidestilada. Se realizaron análisis de varianza y prueba de Tukey ($P < 0.05$) para obtener diferencias entre medias empleando el paquete estadístico SAS (2000).

Resultados

El análisis para el modelo presentó efecto significativo ($P < 0.001$), sobre las variables evaluadas para porcentaje de motilidad al descongelado, porcentaje de espermatozoides vivos y porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma considerando los efectos de tiempo de enfriamiento y diluyentes.

Todos los resultados se muestran en la tabla 1. Para la variable porcentaje de motilidad al descongelado de las pajillas se encontró diferencia significativa ($P < 0.001$), siendo similares los tratamientos T8 (60min) y T10 (75min) a base de agua bidestilada y los que obtuvieron el mayor porcentaje con un 47.85 y 44.28% respectivamente; todos los tratamientos con agua de coco presentaron menor porcentaje.

Para la variable porcentaje de espermatozoides vivos, se encontró diferencia estadística ($P < 0.001$), siendo similares los tratamientos T8 (60min) y T10 (75min) a base de agua bidestilada y los que presentaron el mayor porcentaje con un 43.85 y 42.57%. Los tratamientos a base de agua de coco en todos los tiempos de enfriamiento obtuvieron menor porcentaje.

Para la variable porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, se encontró diferencia estadística ($P < 0.001$), mostrándose similares los tratamientos a base de agua bidestilada T4 (30min), T8 (60min) y T11 (120min) y los que obtuvieron el mayor porcentaje con un 32.35, 29.14 y 28.25%. Todos los tratamientos donde se empleo agua de coco como diluyente los resultados fueron bajos.

Discusión

La calidad del espermatozoide disminuye luego de la eyaculación, la congelación de la célula espermática permite conservarla por largo tiempo, estas sufren un daño sobre la membrana plasmática principalmente ocasionando la muerte de la misma o un cambio muy parecido a la capacitación espermática y por tal motivo una muerte prematura (Cardona y Cadavid, 2005; Ruiz et al., 2007; Rodríguez et al., 2008).

Diversos estudios señalan que el enfriado demasiado rápido o demasiado lento produce un estrés en la célula y por tal motivo se reconoce que la duración de la exposición a estos eventos debería minimizarse para lograr una optima sobrevivencia (Stornelli et al., 2005). En el estudio hecho por Gurrola et al (2006), no encontraron diferencia significativa entre el enfriamiento de los espermatozoides de ovino a dos temperaturas previas a la congelación, siendo estas de 5 °C y -5 °C por tiempo de refrigeración de dos y tres horas respectivamente. Con respecto al porcentaje de motilidad progresiva Gurrola et al (2006), reportan que se presento mejor porcentaje (32.5%), al refrigerar por tres horas a -5 °C que el obtenido al refrigerar por dos horas a 5 °C (22.5%). Estos resultados son inferiores a los del presente trabajo, ya que se obtuvo un porcentaje de motilidad de 47.85 y 44.28%, a los tiempos de refrigeración de 60 y 75 minutos a 5 °C; tiempo menor a los que emplearon los investigadores citados. Nuestros resultados son similares a los reportados por Santiani et al (2007), que obtuvieron una motilidad al descongelado de 45.14%, al enfriar por 90 minutos a 5 °C. Brito et al (2004), obtuvieron una motilidad al descongelado

de 40.2 y 45.8%, utilizando tris-glucosa-yema de huevo y lactosa yema de huevo, refrigerando por dos horas a 5 °C respectivamente antes de la congelación. Angulo et al (1999), al refrigerar a 0 °C por dos horas, tiempo en la que el semen alcanzó la temperatura de 5 °C sin sufrir choque térmico, obtuvieron un porcentaje de motilidad de 49.5%. Además, al congelar el semen solo alrededor de 50% de los espermatozoides de carnero mantienen su viabilidad (Rodríguez et al., 2008), lo cual coincide con los valores de motilidad del presente estudio, que con el mismo tipo de diluyente pero con un menor tiempo de enfriamiento el porcentaje de motilidad no se ve afectado.

Para la variable porcentajes de espermatozoides vivos, Gurrola et al (2006), reportan para la temperatura de enfriamiento de 5 °C por dos horas un porcentaje de espermatozoides vivos de 30.88%, y a -5 °C por tres horas un porcentaje de 38.38%, siendo inferiores a los resultados obtenidos en el presente trabajo ya que los tiempos de refrigeración de 60min (T8) y 75min (T9), fueron los que presentaron el mayor porcentaje al descongelado con un, 43.85 y 42.57% respectivamente, por tal motivo se puede reducir el tiempo de refrigeración, sin afectar el porcentaje de espermatozoides vivos.

Para la variable porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma, García (2004), al enfriar a una velocidad aproximada de 1 °C/3min, desde los 35 °C hasta los 5 °C durante un tiempo de 90min antes de la congelación obtuvo una media de 34.03%; similar a lo obtenido en este trabajo siendo los tiempos de refrigeración de 30min (T4), 60min (T8) y 120min (T11) iguales estadísticamente y los que obtuvieron el mayor porcentaje, con un 32.35, 29.14

y 28.25% respectivamente. Esto nos refleja que por tiempos de refrigeración muy prolongados, el daño de la membrana acrosómica es mayor, y es posible reducir el tiempo de refrigeración de manera significativa sin ocasionar daño alguno en los espermatozoides criopreservados.

Referencias

- Angulo MRB, Hernández AO, Berruecos JMV, Feldman DS, y Valencia JM. Motilidad y Fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet Mex* 1999; 30(3):265-268.
- Barrientos MM, Juárez MLM, Trujillo MEO, y Montiel FP. Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. *Zoot Trop* 2009; 27(1):17-24.
- Barth AD and Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. Iowa United State of America 1989; 8-16.
- Brito FI, Valencia MJ, Balcázar SA, Angulo MR y Mejía VO. Congelación de semen de carnero en pellets con los diluyentes tris-glucosa yema de huevo o lactosa yema de huevo. Universidad de Colima, México. *Avances en investigación agropecuaria*, Junio, 2004. vol.8, numero 002
- Cabrera VP y Pantoja CA. Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovino en pajillas de 0.5. ml. *Rev Inv Vet* 2008; 19(2):152-159.
- Cardona MWD y Cadavid AP. Evaluacion de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Act Urol Esp* 2005; 29(7):676-684.
- Cardona MWD, Olivera AM y Cadavid AP. Evaluacion de la reacción acrosomal inducida por el ionoforo de calcio: una aproximación más real de la

capacidad fecundante del espermatozoide. Arch Esp Urol 2006; 59(5):501-510.

Cardozo JA, Grasa P, Muiño MTB y Cebrián JAP. Adición de proteína del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. Ciencia y Tecnología Agropecuaria 2009; 10(1):51-59.

Curtis GG, Vishwanath R, Colin P, Garner DL and Casey PJ. Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. Journal of Andrology 1998; 19(6):704-709.

García RFE. Efecto de la selección espermática sobre la calidad de semen de carnero congelado. Tesis de licenciatura en medicina veterinaria. Universidad católica de Temuco. Facultad de acuicultura y ciencias veterinarias. Temuco, Chile. 2004.

Gurrola LM, Juárez ML, Gutiérrez PO, y Angulo MR. Efecto de la temperatura sobre la funcionalidad de la membrana plasmática y el estado de capacitación del espermatozoide ovino utilizando 5°C y -5°C durante el periodo de equilibrio. Memorias de conferencias en pequeños rumiantes 2006; 18May2009. URL: http://ammueb.net/xxx%20CNB/memorias%202006/pequeños_rumiantes/conferencias/fpeq_15.doc.

Hernández BJA. Procesamiento de semen porcino. Técnicas de congelamiento en reproducción. FAUANL. Marín N.L. (1998).

Hernández BJA y Carrillo DFB. Manual de Reproducción en Ovinos. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit. 2005.

Holt WV and Nort RD. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. J Reprod Fert 1991; 91: 451-461.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P y Maxwell WM. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci 2000; 62, 143-172.

Manosalva I, Cortes C, Leiva VV, Valdivia MC, De los Reyes MS, Barros CR y Moreno RM. Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. Rev Inv Vet 2005; 16(2):114-128.

Martín Rillo S, Martínez E, García AC, De Alba C. Boar semen evaluation in practise. Reprod Dom Anim 1996; 31: 519-526.

Mellisho SE y Gallegos A. Manual de laboratorio de reproducción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. 2006.

Membrillo OA, Cordova IA, Hicks JJ, Olivares IM, Martínez VM y Valencia JJ. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Interciencia. 2003; 28(12):699-704.

Merino RA. Estudios preliminares en capacitación in vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados. Tesis licenciatura en medicina veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. 2003.

Moce E and Graham JK. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J Anim Sci* 2006; 84:826-833.

Quintero MA. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Dicertacion doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 2003.

Rodríguez FA, Ávila CO, Anchondo GA, Sanchez RB y Jimenez JA. Capacitación espermática inducida por la conservación de semen de carnero diluido, refrigerado o congelado. *Agrociencia* 2008; 42:399-406.

Ruiz GL, Santiani AA, Sandoval MR, Huanca LW, Delgado CA, Coronado SL y Alzamora PC. Efecto de dos antioxidantes (tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Rev Inv Vet* 2007; 18(2):99-106.

Sandoval MR, Santiani AA, Ruiz LG, Leyva VV, Coronado LS and Delgado AC. Ovine semen cryopreservation using three extenders and four combinations of permeant and non permeant agents. *Rev Inv Vet Perú* 2007; 18(2):107-114.

Santiani A, Sandoval R, Evangelista S, Urviola M, Catacora N, Coronado L, Delgado A. Incremento de la tasa de no retorno de celo en ovejas utilizando un antioxidante análogo de superóxido dismutasa (Tempo) durante la criopreservación de semen. APPA-ALPA-Cusco, Perú, 2007. Sitio argentino de Producción Animal. URL: www.produccion-animal.com.ar/produccion.../19-Santiani.pdf

SAS. 2000. SAS/STAT User's Guide (Release 9). SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA and Stornelli MA. Criopreservation effect on fertility. *Analecta Veterinaria* 2005; 25(2):28-35.

Talbot P and Chacon R.A. triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J Exp Zoo* 1981; 215:201-208.

Varela ME. Caracterização de Parâmetros Reprodutivos nas Raças Ovinas Merina Branca, Merina Preta e Campaniça. Dissertação de Mestrado em Produção Animal. Faculdade de medicina veterinária. Universidade técnica de Lisboa. 1999.

Vasco MD, Hernández MM, Vásquez MJ, Martinez E y Roca J. Sustancias Oxígeno Reactivas (ROS) en Semen Congelado-Descongelado de Porcino. *Ciencia y Tecnología* 2007; 1:23-29.

Watson P. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod. Sci* 2000; 60-61:481-492.

Tabla 1. Diferencias estadísticas para variables de viabilidad espermática al descongelado con diferentes tiempos de enfriamiento en la criopreservación.

Tratamiento Tiempo/Diluyente	Motilidad	Vivos	VCA
T1: 15min/AC	15.71 g	13.57 f	14.50 f
T2: 15min/Abd	30.00 de	22.71 d	25.78 bc
T3: 30min/AC	15.00 g	14.00 f	19.64 def
T4: 30min/Abd	37.85 bc	35.85 c	32.35 a
T5: 45min/AC	23.57 ef	17.14 ef	19.00 ef
T6: 45min/Abd	40.71 b	38.00 bc	24.71 bcde
T7: 60min/AC	23.57 ef	19.85 de	16.85 f
T8: 60min/Abd	47.85 a	43.85 a	29.14 ab
T9: 75min/AC	19.28 fg	14.85 ef	20.21 cdef
T10: 75min/Abd	44.28 ab	42.57 ab	25.28 bcd
T11: 120min/Abd	32.50 cd	34.42 c	28.25 ab
ee	1.22	1.26	0.55

Medias con la misma literal por columna no son significativamente diferentes (Tukey $p < 0.05$). ee= error estándar. AC= agua de coco. Abd= agua bidestilada. VCA= vivos con acrosoma.