

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**Instituto de Ciencias Agrícolas**

**Instituto en Investigaciones en Ciencias Veterinarias**



**Producción de embriones ovinos y transferencia por  
minilaparotomía próxima al oviducto**

**T E S I S**

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA**

**EMILIO ROBLES HUITRON**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. VICTOR MANUEL GONZALEZ VIZCARRA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS**

**DR. CLEMENTE LEMUS FLORES**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

JUNIO DE 2018

La presente tesis “**Producción de embriones ovinos y transferencia por minilaparotomía próxima al oviducto**” realizada por el **C. Emilio Robles Huitrón**, dirigido por el **Dr. Víctor Manuel González Vizcarra**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

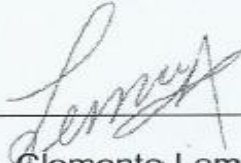
## **Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Comité Particular



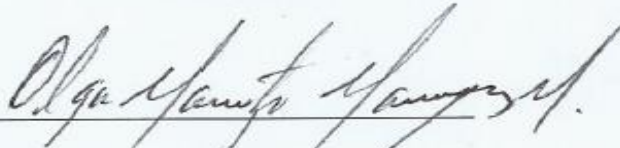
Dr. Víctor Manuel González Vizcarra

Director de Tesis



Dr. Clemente Lemus Flores

Secretario




Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez

Sinodal



Dr. Rafael Villa Angulo

Sinodal



Dr. Martín Francisco Montano Gómez

Sinodal

## Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISION DE LITERATURA.....	7
Antecedentes de la transferencia de embriones.....	8
Generalidades de la transferencia de embriones.....	9
Literatura citada.....	10
PRODUCCIÓN DE EMBRIONES OVINOS Y TRANSFERENCIA POR MINILAPAROTOMIA PRÓXIMA AL OVIDUCTO.....	13
Resumen.....	13
Summary .....	14
Introducción .....	15
Materiales y métodos.....	16
Resultados y discusión.....	18
Referencias.....	21
EFFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO ANTES DE LA CONGELACIÓN SOBRE EL DAÑO ACROSOMAL EN LA CRIOPRESERVACION DEL SEMEN OVINO.....	27
Resumen.....	27
Abstrac.....	28
Introducción.....	29
Materiales y métodos .....	30
Resultados .....	33

Discusión .....	34
Conclusiones .....	36
Literatura citada .....	37

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por permitirme realizar una meta más en mi vida.

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo brindado para poder llevar a cabo mi investigación.

Quiero agradecer a la universidad Autónoma de Baja California, a los Instituto de Ciencias Agrícolas e Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias a todo su personal administrativo y docente, por brindarme la oportunidad de poder realizar mis estudios de Maestría y Doctorado.

Quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Víctor M. González Vizcarra por todo el apoyo brindado en estas etapas tan importantes de mi vida, por toda la paciencia, tiempo y dedicación brindados hacia mi persona. Muchas gracias.

Quiero hacer un reconocimiento especial al Dr. Clemente Lemus Flores por el apoyo, guía y tutela brindada en todas mis etapas como profesionista, gracias por el tiempo y paciencia que ha tenido hacia mi persona, espero contar siempre con su amistad y nuevamente muchas GRACIAS.

Quiero agradecer a la Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez por todo el apoyo incondicional brindado en estos años, por sus consejos y guía, Muchas gracias.

A mis compañeros de estudios y amigos Víctor, Armando, Jesús, Julio, Alejandro y otros que en el anonimato tienen mi reconocimiento quiero decirles muchas gracias porque en los momentos que los necesité ahí estuvieron siempre.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mi familia a mis padres, Emilio Robles González y Ma. Dolores Huitrón Ruiz por brindarme la oportunidad de estudiar y realizar mis sueños. A mis hermanos Horacio, Yesenia y Oswald gracias. A mi pareja Cinthia, gracias por todo.

## RESUMEN

La transferencia de embriones permite incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la gran reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de reproducción y centro de explotación ovina del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California. El objetivo es evaluar la técnica de transferencia de embriones *in vivo* por mini laparotomía, para la producción de embriones de ovino a partir de hembras donadoras súper ovuladas. Las hembras receptoras y donadoras de embriones fueron sincronizadas utilizando esponjas intravaginales comerciales conteniendo 40 mg de acetato de flurogestona y las donadoras fueron sometidas a dosis decreciente de hormona folículo estimulante porcino (FSHp), se realizó laparotomía para la transferencia de embriones a las receptoras. Los tratamientos consistieron en dos diferentes tiempos de retiro de las esponjas: T1 8 días, T2 10 días; dos diferentes dosis de (FSHp) 220mg y 280mg. Después de realizar el lavado uterino por laparotomía se colectó el fluido empleando en el lavado una sonda Foley y cajas de Petri para la recolección del líquido y posterior observación al estereoscopio, se discriminaron los embriones calidad 1 y 2 de los ovocitos no fertilizados y los blastocitos en eclosión. El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la producción de embriones de acuerdo con el tiempo de retiro de la esponja de sincronización y al mismo tiempo la dosis de (FSHp); así como la calidad de los embriones para su posterior transferencia.

**Palabras clave:** Sincronización, Superovulación, Transferencia, Ovinos.

## **SUMMARY**

The transfer of embryos allows to increase the reproductive potential of the females of high genetic value through a greater use of the large reserve of oocytes that are found in the ovary. The present work was carried out in the breeding laboratory and ovine exploitation center of the Veterinary Sciences Research Institute of the Autonomous University of Baja California. The objective is to develop the technique of embryo transfer in vivo by mini laparotomy, for the production of ovine embryos from super ovulated donor females. The females receiving and donating embryos were synchronized using commercial intravaginal sponges containing 40 mg. of flurogestone acetate and the donors were submitted to decreasing dose of (FSHp), laparotomy was performed for the transfer of embryos to the recipients, using the following treatments, two different times of removal of the sponges: T1 8 days, T2 10 days; Two different doses of (FSHp) 220mg and 280mg. After performing the uterine lavage by laparotomy, the fluid was collected using a foley probe and Petri dishes for the collection of the liquid and subsequent observation to the stereoscope, quality 1 and 2 embryos from unfertilized oocytes and blasts are discriminated. The objective of this trial was to standardize the production of embryos according to the withdrawal time of the synchronization sponge and at the same time the dose of (FSHp); as well as the quality of the embryos for their subsequent transfer.

**Keywords:** Synchronization, Superovulation, Transfer, Sheep.

## INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción pecuaria en países tropicales han incorporado exitosamente a los ovinos de pelo, se estima que comprenden aproximadamente el 10 % de la población de ovejas del mundo originalmente se localizaron principalmente en regiones tropicales de África, Sur América y el Caribe (González et al., 2007).

Uno de los países más importantes con intensiva producción de ovejas en Latino América es México, donde, existen diferentes razas de ovejas, incluyendo ovejas de pelo tales como el Pelibuey, Blackbelly, Katahdin, Saint Croix, Dorper y razas de lana como el Dorset, Hampshire, Rambouillet, Romanov, Suffolk, Charollais, East Friesian y Texel (AMCO, 2005).

Sin embargo, de entre todas destaca la raza Pelibuey, que compone del 90 al 95% del total de ovejas de pelo de la población en México (González et al., 2007). De ahí que actualmente existe interés por su multiplicación mediante programas de mejoramiento genético, mismo que incorpora técnicas de reproducción asistida. De entre ellas, se cuenta con la conservación por enfriamiento a 5°C, conservación por congelamiento en nitrógeno líquido, así como la vitrificación (Jiménez y Vicente, 2004).

No cabe duda de que actualmente la TE es el método más seguro en el aspecto sanitario, para realizar la importación de los diferentes biotipos de alta producción (Barrio et al., 2003). El incremento del comercio internacional de material genético mediante la TE demuestra la importancia que tiene esta técnica como reaseguro sanitario frente a las enfermedades exóticas y como herramienta del mejoramiento para la producción animal (Gibbons y Cueto, 2010).

También es posible la obtención de una mayor descendencia en animales de gran valor genético, la predicción de la fertilidad de los machos, el aprovechamiento de las hembras en diferentes estadios reproductivos, animales muertos o con problemas de fertilidad, así como también la posibilidad de utilización en los programas de recuperación de especies en peligro de extinción (Rodríguez, 2001).

La recolección de cigotos y embriones a partir de hembras vivas, súperovuladas, es útil y posible, pero estos suelen hallarse en diferentes estadios de desarrollo y los costos de su práctica son elevados (Tarín, 2005). El uso de ovarios recogidos en el matadero como fuente de ovocitos para la PIV es útil para el desarrollo y permite la realización de las nuevas tecnologías antes mencionadas (Urdaneta, 2005).

En la actualidad, la crioconservación de embriones de mamíferos ha llegado a ser un procedimiento rutinario en biología, ganadería y medicina, pudiendo lograrse por procedimientos de congelación estándar y por vitrificación. La principal diferencia que tiene la vitrificación con el método estándar es que en este último la concentración de crioprotectores es menor y el descenso de temperatura se realiza de manera controlada mediante equipos programables (Ruiz y Correa, 2007).

A pesar de los beneficios prácticos, ventajas económicas y buenos resultados que se han obtenido experimentalmente, la vitrificación no se ha utilizado masivamente debido a la falta de estandarización de los protocolos (Celestino y Gatica, 2002).

En esta propuesta, se plantea el desarrollo de la producción de embriones ovinos y transferencia por mini laparotomía próxima al oviducto ya que, en técnicas tradicionales de cría ovina, el número de descendientes producidos por hembra y por año es de una o dos crías, por lo tanto, durante su vida reproductiva se logran obtener entre 6 a 8 crías y la hembra se mandan a rastro desaprovechándose así todo el potencial de esta hembra de alto valor genético (Herrera et al., 2008).

## REVISION DE LITERATURA

La transferencia de embriones (TE) permite incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la gran reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario. La TE posibilita acortar el intervalo generacional y en consecuencia incrementar el avance genético (Larocca et al., 1998).

A su vez, la inseminación artificial y la TE en conjunto son excelentes herramientas para el mejoramiento genético de hatos que se encuentren aislados. Las tecnologías de reproducción asistida como lo es la transferencia de embriones (TE), han aumentado significativamente, ya que posibilita utilizar eficientemente a las donantes y receptoras (González., et al 2007).

Uno de los principales factores que limitan la eficiencia de la producción de embriones in vitro (PEIV), es la maduración in vitro (MIV), ya que aún después de la selección cuidadosa de una población homogénea de complejos cúmulo-ovocito (COCS), solo poco más de la tercera parte alcanzan la maduración citoplásmica completa y poseen la capacidad de producir blastocitos viables para su transferencia, lo que ocasiona que ésta técnica de reproducción asistida sea menos eficiente, comparada con la producción de embriones in vivo (Robledo et al., 2009).

Probablemente debido a la incapacidad del medio de cultivo utilizado durante la MIV para reproducir las complejas señales y comunicación entre los ovocitos y las células somáticas circundantes, que ocurren de manera natural dentro del folículo ovulatorio y cuerno uterino (Romar et al., 2001), afectando la tasa de fertilización *in vitro* y su desarrollo embrionario (Cancino, 2005 y Ordoñez, 2005).

### **Antecedentes de la transferencia de embriones**

Unas de las técnicas de reproducción artificial que permiten el mejoramiento genético de un hato, una alta producción, así como la creación de bancos genéticos, es sin duda la técnica de ovulación múltiple y la transferencia de embriones, en esta

técnica los embriones generados por hembras donadoras, son transferidos antes de la implantación a hembras receptoras en donde se desarrollara el embrión hasta termino (Robledo et al., 2009).

Los programas de súper ovulación y transferencia de embriones (MOET) han sido utilizados ampliamente en bovinos, pero en ovinos y caprinos se empieza a ensayar el empleo de este programa y empieza a ser objetivo de investigación posterior a los estudios de inseminación artificial, (Warwick y Berry, 1934) realizan trabajos hechos en ovinos y en 1949 publican el primer artículo con excelentes resultados (González et al., 2007).

En los trabajos iniciales la técnica consistía en la sincronización y súper ovulación de los animales donantes utilizando progesterona y PMSG (gonadotrofina sérica de yegua preñada) posteriormente las hembras donantes eran inseminadas artificialmente o por monta directa, después de siete días se colectaban los embriones por medio de laparotomía y se transferían a hembras receptoras o eran congelados (Gibbons y Cueto, 2010). Acorde con Cognie (1999) la FSH porcina se empezó a utilizar en 1980 y años después la FSH ovina,

La propuesta de uso de transferencia de embriones y la súper ovulación en los programas de mejoramiento genético fue planteada en los años 1979 y 1983 concibiéndola para emplearlo en hembras bovinas productoras de leche. A partir de entonces se han hecho modificaciones de acuerdo con las especies. La técnica hace posible aumentar la prolificidad, contribuyendo a mejorar el valor genético (Pliego, 2005).

### **Generalidades de la transferencia de embriones**

La elección de las hembras donantes se realizará teniendo en cuenta su valor genético y en base a los criterios apropiados de mejoramiento de las aptitudes productivas para cada raza. Las condiciones generales de un buen estado reproductivo, sanitario y nutricional son imprescindibles, tanto para las hembras donantes como para

las receptoras. Las hembras deben al menos haber tenido una cría, y se debe considerar un mínimo de 2 meses post parto antes de comenzar los tratamientos hormonales. Acortar estos tiempos puede significar una baja en la producción de embriones (Gibbons y Cueto, 1995).

La necesidad de utilizar hembras jóvenes como donantes puede llevar a una baja eficiencia reproductiva. En el supuesto caso de tratar una hembra nulípara, el peso mínimo deberá ser del 75% del peso adulto de la raza y haber presentado estros anteriormente (Herrera et al., 2008).

Lo indicado son las hembras adultas, que puedan llevar a cabo la gestación sin comprometer su crecimiento y contribuir al desarrollo de la cría por medio de una buena lactancia. La TE requiere de una serie de manipulaciones de las donantes y receptoras. En el caso de recurrir a instalaciones extrañas, es preferible que los animales tengan un período de adaptación previo, de uno a dos meses, antes de comenzar los tratamientos (Robledo et al., 2009).

Se debe considerar los aspectos sanitarios, nutricionales y reproductivos de los machos y la calidad seminal ya sea que se utilicen en servicio natural o mediante la inseminación artificial con semen fresco, refrigerado o congelado (Herrera et al., 2008).

## LITERATURA CITADA

Abecia, J. A., F. Forcada, and O. Zuñiga. 2002. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. *Veterinary research communications*. 26:151-158.

Asociación Mexicana de Criadores de Ovinos (AMCO, <http://www.asmexcriadoresdeovinos.org>).

Barrio, M. A., I. Peña, L. A. Quíntela, J. J. Becerra, y P. G. Herradon. 2003. Efecto de la composición y renovación parcial del medio de cultivo sobre el desarrollo de los embriones bovinos producidos *in vitro*. *Arch. Zootec.* Vol 52 pp. 441-451.

Cancino, A. G. R. 2005. Producción de embriones ovinos *in vitro*. Memorias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Celestino, M. y R. Gatica. 2002. Vitrificación como técnica de crioconservación en embriones bovinos. *Arch. Med. Vet.* XXXIV, No. 2.

Gibbons, A. E. y M. I. Cueto. 2010. Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. INTAEEA Bariloche, Centro regional Patagonia Norte.

González, P. E., I. D. S. Erosa, A. L. Aguiar, R. E. A. Piña, J. S. López, L. F. S. Navarrete y J. P. R. Ugalde. 2007. Vitrificación de embriones en ovinos de pelo. Memorias. V Congreso de especialistas en pequeños rumiantes. Mendoza Argentina.

Herrera, C. J., R. L. Ake, J. C. Ku-vera, G. L. Williams y J. A. F. Quintal. 2008. Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados. *Tec. Pec. Mex.* 46:107-117.

Jiménez, M. F. and J. Vicente. 2004. Ability of frozen-thawed ram spermatozoa to bind to vitrified homologous oocytes. Spanish Journal of Agricultural Research. 2:73-77.

Larocca, C., D. Fila, S. Kmaid, A. Fernández, I. Largo y G. Roses. 1998. Viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro* congelados-descongelados en dos medios de cultivo con beta mercaptoetanol. Arch. Zootec. 47:3-10.

Ordoñez, L. A. E. 2005. Producción de embriones ovinos de raza de pelo y lana por medio de fertilización *in vitro*. Memorias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Robledo, V. J. M., J. C. Herrera, M. J. Cajero, M. C. M. Navarro, y A. V. García. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. Tropical and Subtropical Agroecosystem. 10:95-99.

Rodríguez, A. J. M. Métodos de investigación pecuaria. Ed. TRILLAS. México, D. F. 1991.

Rodríguez, G. E. 2001. Producción *in vitro* de embriones caprinos: sistema de maduración citoplasmática de ovocitos de hembras pre-púberes. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.

Romar, A. R. 2001. Efecto de las células oviductales y del cumulusoophorus sobre diferentes parámetros biológicos relacionados con la fecundación *in vitro* en la especie porcina. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria Universidad de Murcia.

Ruiz, J. y J. Correa. 2007. Desarrollo partenogenético *in vitro* con ovocitos vitrificados Bovinos. APPA-ALPA-Cusco, Perú.

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

Tarín, J. J. 2005. Función del glutatión reducido durante la maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo pre-implantatorio de embriones *in vitro* en mamíferos. Revista Iberoamericana de Fertilidad. Vol. 22. No.6.

Urdaneta, V. A. E. 2005. Utilización de compuestos tiol en la producción *in vitro* en hembras a partir de ovocitos de cabras pre púberes. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.



**CLemus** <drclemus@yahoo.com.mx>

para mí ▾

Saludos  
Dr Clemente Lemus Flores  
Profesor investigador  
Universidad Autónoma de Nayarit

Inicio del mensaje reenviado:

**De:** "Dr. Francisco Rodríguez Félix" <[biotecnia@ciencias.uson.mx](mailto:biotecnia@ciencias.uson.mx)>

**Fecha:** 1 de febrero de 2018, 20:42:06 GMT-7

**Para:** [drclemus@yahoo.com.mx](mailto:drclemus@yahoo.com.mx)

**Asunto:** [BIOTECNIA] Acuse de recibo de envío

CLEMENTE LEMUS FLORES:

Gracias por enviar el manuscrito, "PRODUCCIÓN DE EMBRIONES OVINOS Y TRANSFERENCIA POR MINILAPAROTOMÍA PROXIMA AL OVIDUCTO" a Biotecnia. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial:

URL del manuscrito:

<https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/author/submission/539>

\*\*\*

**PRODUCCIÓN DE EMBRIONES OVINOS Y TRANSFERENCIA POR  
MINILAPAROTOMÍA PROXIMA AL OVIDUCTO  
PRODUCTION OF SHEEP EMBRYOS AND TRANSFER BY MINILAPAROTOMY  
NEXT TO THE OVIDUCT**

MC, Emilio Robles Huitron<sup>1</sup>; Dr; Víctor M. González Vizcarra<sup>1\*</sup>; Dr; Clemente Lemus Flores<sup>3</sup>; Dra; Olga Maritza Manríquez Nuñez<sup>1</sup>, Dr; Rafael Villa Angulo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Investigación en Ciencias Veterinarias.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Ingeniería

<sup>3</sup>Universidad Autónoma de Nayarit. Posgrado en Ciencias Biológico-Agropecuarias.

\*Autor para correspondencia: Dr. Víctor Manuel González Vizcarra. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California. Carretera a San Felipe Km. 3.5. Correo electrónico: vvizcarra@uabc.edu.mx

**RESUMEN**

La transferencia de embriones permite incrementar el potencial reproductivo de las hembras de alto valor genético mediante un mayor aprovechamiento de la gran reserva de ovocitos que se encuentran en el ovario. El presente trabajo se realizó en el laboratorio de reproducción y centro de explotación ovina del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California. El objetivo fue evaluar la técnica de transferencia de embriones *in vivo* por mini laparotomía, para la producción de embriones de ovino a partir de hembras donadoras súper ovuladas. Las hembras receptoras y donadoras de embriones fueron sincronizadas utilizando esponjas intravaginales comerciales conteniendo 40 mg de acetato de flurogestona y las donadoras fueron sometidas a dosis decreciente de (FSHp), se realizó laparotomía para la transferencia de embriones a las receptoras. Los tratamientos consistieron en dos diferentes tiempos de retiro de las esponjas: T1 8 días, T2 10 días; dos diferentes dosis de (FSHp) 220mg y 280mg. Después de realizar el

lavado uterino por laparotomía se colectó el fluido empleando en el lavado una sonda Foley y cajas de Petri para la recolección del líquido y posterior observación al estereoscopio, se discriminan los embriones calidad 1 y 2 de los ovocitos no fertilizados y los blastocitos en eclosión. El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la producción de embriones de acuerdo con el tiempo de retiro de la esponja de sincronización y al mismo tiempo la dosis de (FSHp); así como la calidad de los embriones para su posterior transferencia.

**Palabras clave:** Sincronización, Superovulación, Transferencia, Ovinos.

## **SUMMARY**

The transfer of embryos allows to increase the reproductive potential of the females of high genetic value through a greater use of the large reserve of oocytes that are found in the ovary. The present work was carried out in the breeding laboratory and ovine exploitation center of the Veterinary Sciences Research Institute of the Autonomous University of Baja California. The objective is to develop the technique of embryo transfer in vivo by mini laparotomy, for the production of ovine embryos from super ovulated donor females. The females receiving and donating embryos were synchronized using commercial intravaginal sponges containing 40 mg. of flurogestone acetate and the donors were submitted to decreasing dose of (FSHp), laparotomy was performed for the transfer of embryos to the recipients, using the following treatments, two different times of removal of the sponges: T1 8 days, T2 10 days; Two different doses of (FSHp) 220mg and 280mg. After performing the uterine lavage by laparotomy, the fluid was collected using a foley probe and Petri dishes for the collection of the liquid and subsequent observation to the stereoscope, quality 1 and 2 embryos from unfertilized oocytes and blasts are discriminated. The objective of this trial was to standardize the production of embryos according to the withdrawal time of the synchronization sponge and at the same time the dose of (FSHp); as well as the quality of the embryos for their subsequent transfer.

Keywords: Synchronization, Superovulation, Transfer, Sheep.

## INTRODUCCIÓN

La tasa de ovulación es un carácter muy constante en los mamíferos y estrechamente relacionado con la especie por factores genéticos. Así, las especies ovina y caprina muestran una tasa de ovulación muy reducida; aunque debe señalarse la existencia de variaciones entre razas, con oscilaciones entre 1 y 4 cuerpos lúteos en cada ciclo. El número de ovulaciones durante el ciclo sexual, inmediatamente después de la luteólisis, está relacionado con el número de folículos que se desarrollan hasta alcanzar el estadio pre ovulatorio. A su vez, la dinámica de crecimiento de estos folículos está condicionada por un equilibrio entre mecanismos de estimulación y de inhibición del crecimiento folicular, separar actuar tanto a nivel sistémico como intra ovárico. Los factores sistémicos son aquellos pertenecientes al eje hipotálamo-hipófisis-ovario; destacan las gonadotropinas hipofisarias (FSH y LH), con acción estimulante, y el estradiol y la inhibina, con acción inhibidora (Sebastián et al., 2002; Gibbons y Cueto., 2010).

Los tratamientos hormonales para lograr una ovulación múltiple y la TE permiten utilizar intensivamente a las hembras genéticamente superiores (Cordova et al., 2008; Camacho et al., 2008; Bruno et al., 2015). El uso de FSH para inducir superovulación se asocia con una menor variabilidad de la tasa ovulatoria y con una menor cantidad de folículos anovulatorios sin alterar de manera significativa la esteroidogénesis las fuentes comerciales de FSH disponibles en el mercado son extractos de hipófisis de diferentes especies, principalmente la ovina y la porcina. Así, las preparaciones comerciales contienen cantidades altas de FSH y variables de LH dependiendo del producto, siendo al parecer más purificado (menos contenido de LH) los extractos de FSH ovina. Una mayor purificación supone un aumento de la respuesta ovulatoria; tradicionalmente, se ha considerado que un protocolo de dosis constantes era más adecuado para preparados con un menor contenido de LH. Sin embargo, recientemente González-Bulnes et al. (2004) han mostrado unos mejores resultados de tasa de ovulación y de embriones viables con protocolos decrecientes de FSH ovina en relación con los constantes, señalando que los primeros pueden estar más próximos a

los cambios de la secreción hipofisaria de FSH que tienen lugar en la fase folicular del ciclo sexual natural. En conjunto y para razas de reducido potencial ovulatorio, se puede esperar una tasa de ovulación entre 9 y 14 cuerpos lúteos tras la aplicación de los citados protocolos (Fuerst et al., 2009;Forcada et al., 2011;Jackson et al., 2014).

Uno de los principales factores que limitan la eficiencia de la producción de embriones *in vitro* (PEIV), es la maduración *in vitro* (MIV), ya que aún después de la selección cuidadosa de una población homogénea de complejos cúmulo-ovocito (COCS), solo poco más de la tercera parte alcanzan la maduración citoplásmica completa y poseen la capacidad de producir blastocitos viables para su transferencia, lo que ocasiona que ésta técnica de reproducción asistida sea menos eficiente, comparada con la producción de embriones *in vivo* (Cansino, 2005;González et al., 2007;Robledo et al., 2009).

Probablemente debido a la incapacidad del medio de cultivo utilizado durante la MIV para reproducir las complejas señales y comunicación entre los ovocitos y las células somáticas circundantes, que ocurren de manera natural dentro del folículo ovulatorio y cuerno uterino, afectando la tasa de fertilización *in vitro* y su desarrollo embrionario. (Bartlewsky et al., 2008;Bruno et al., 2014)

El objetivo es el desarrollo de la técnica de transferencia de embriones por minilaparotomía y la dosis de FSHp decreciente con mejor resultado, para la producción de embriones de ovino.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Reproducción Ovina del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali B.C. México. El clima es de tipo desértico, donde el mes más frío es enero, con una temperatura mínima promedio de  $-1.66\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $13\text{ }^{\circ}\text{C}$  de temperatura media siendo julio el mes más cálido con una temperatura máxima, mínima y promedio de  $45$ ,  $20$  y  $33^{\circ}\text{C}$  respectivamente. La temperatura media anual es de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  (INEGI, 2010).

### **Animales**

Se emplearon 8 hembras donadoras de la raza Dorper-Katahdin y 24 hembras receptoras de las mismas proporciones de cruzamiento, así como el empleo de dos sementales de la raza Dorper-Katahdin para la monta de las hembras donadoras. Todos los procedimientos experimentales se hicieron bajo los lineamientos de las normas oficiales mexicanas NOM-051-ZOO-1995 (trato humanitario de animales), NOM-062-ZOO-1999 (manejo de animales en laboratorio), NOM-033-ZOO-1995 (sacrificio humanitario de animales domésticos) y NOM-012-ZOO-1993 (regulación de productos químicos, farmacéuticos y biológicos para uso en animales).

### **Técnica quirúrgica**

Estas intervenciones se llevaron a cabo bajo tranquilización y anestesia local. Es indispensable que los animales no reciban alimento ni agua en las 24 horas previas a la operación. Se utilizó un tranquilizante intramuscular ( $0.04\text{mg/ kg}$ , Xilazina), aplicando un anestésico local en el área quirúrgica ( $5\text{ cc}$ , Lidocaína 2%).

La hembra se ubicó en un plano inclinado en una camilla (cabeza hacia abajo). Se rasuró y desinfectó el campo operatorio. Se realizó una laparotomía media de  $5$  a  $7\text{ cm}$ , y a  $3\text{ cm}$  por delante de la ubre. Antes de comenzar con la recuperación embrionaria se realizó la determinación de la respuesta ovulatoria (recuento del número de cuerpos lúteos), mediante exteriorización de los ovarios. En base al número de estructuras colectadas se determinó el porcentaje de recuperación embrionaria.

La recuperación embrionaria consistió en la colocación de una sonda de Foley del número 12, aproximadamente a un par de cms de la bifurcación de los cuernos uterinos. Posteriormente se realizó una punción para su posicionamiento, para la inyección de 20 cc del medio de colección (Modified HTF Medium, Irvine Scientific) a 38 °C. Acto seguido se realizó una punción con un catéter del número 14. De esta manera se produjo una corriente de arrastre que fluyó en todo el cuerno uterino, recuperando el medio de colecta en cajas de Petri estériles atemperadas a 37.5 °C; se procede de igual manera con el otro cuerno uterino.

Se recomienda que el tiempo transcurrido entre la recuperación de los embriones y su siembra sea inmediato y no supere las 2 horas en el medio de conservación embrionario. El sitio habitual de siembra de los embriones es el cuerno ipsilateral del ovario con cuerpo lúteo. Se procedió a realizar una punción en la cara dorsal del cuerno uterino y en su tercio superior mediante una jeringa con unas series de adaptaciones para poder montar pajillas de tipo francés de 0.25 ml donde previamente se montó el embrión para su posterior depósito en la luz uterina.

### **Tratamientos**

Se emplearon dos tiempos de retiro de esponjas para las hembras donadoras siendo T1 8 días de retiro y T2 10 días de retiro, así como dos niveles de (FSHp) a dosis de 220mg totales y 280mg totales. Quedando de la siguiente manera:

T1 8 días 2 hembras 220mg y 2 hembras 280mg

T2 10 días 2 hembras 220mg y 2 hembras 280mg

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para los tratamientos el efecto cuerno uterino izquierdo o derecho no se encontró diferencia estadística  $P > 0.05$  teniendo una media de 3.25 y 3.87 respectivamente con una desviación estándar de 3.1 y 2.7 bajo un estadístico de prueba de  $u$  de Mann-Whitney y  $W$  de Wilcoxon. Figura 1. En un estudio realizado por Harasymowycz et al. (2014) reportaron una diferencia en la cantidad de cuerpos lúteos contabilizados en ambos lotes, resultando estadísticamente significativo a favor del tratamiento de superovulación a dosis decrecientes ( $P \leq 0,05$ ). Estos resultados podrían deberse al hecho de que en el protocolo de dosis decrecientes la administración de la FSH se asemeja más al patrón de secreción hipofisaria de esta hormona, no siendo así influenciado por la posición anatómica del cuerno uterino.

Para el efecto dosis de FSH por cuerno se observó diferencia estadística  $P < 0.05$ , encontrándose una media de 2.0 y 5.1 para la dosis 220mg y 280mg respectivamente con una desviación estándar de 1.7 y 2.9 en el orden mencionado para el efecto dosis de FSH por cuerpos lúteos totales por hembra se observó diferencia estadística  $P < 0.05$  encontrándose una media de 4.0 y una desviación estándar de 2.1 para la dosis total de 220mg. Para la dosis total de 280mg se observó una media de 10.25 con una desviación estándar de 4.7, siendo estos resultados muy similares a los publicados por Palacios en 2012, al estar trabajando en un estudio de superovulación en ovejas de raza Pelibuey aplicando FSHp. Este autor administró a un grupo una dosis total 280mg en forma decreciente (60mg, 40mg, 20mg, 20mg), reportando en promedio  $17,6 \pm 3,5$  cuerpos lúteos por animal, mientras que el otro grupo recibió una dosis total de 220 mg en dosis decrecientes (40mg, 30mg, 20mg, 20mg), obteniendo como resultado un promedio de  $1,8 \pm 1,3$  cuerpos lúteos. Se dedujo que para el éxito de los programas de reproducción artificial existe una correlación estrecha entre los factores como adaptación, nutrición, pureza de la raza, así como la dosis de hormonas utilizadas. Observándose una mejor respuesta ( $P \leq 0,01$ ) en animales sometidos a un tratamiento de 280mg de FSHp que en aquellos que recibieron un estímulo superovulatorio de 220mg (Harasymowycz et al., 2014).

Para el efecto tiempo de retiro de esponjas por embriones recuperados se observó diferencia estadística  $P < 0.05$ , encontrándose una media de 3.5 y una desviación estándar de 1.2 para el tiempo de retiro de esponjas por 8 días. Al mismo tiempo, para 10 días se reportó una media de 0.75 y una desviación estándar de 0.9.

Para el efecto dosis FSH combinado en el tiempo con embriones recuperados se observó diferencia estadística  $P < 0.10$  con una media de 4.5, 1.5 y una desviación estándar de 0.7 y 0.7 en respuesta a la dosis de 280mg por 8 días de retiro de la esponja y 280mg por 10 días. Muy similar a lo reportado por Bruno-Galarraga et al. (2014), en ovejas Merino superovuladas con FSHp obtuvieron  $9.7 \pm 2.8$  cuerpos lúteos y  $4.6 \pm 1.3$  embriones transferibles. Por su parte, Aké-López et al. (2003), observaron  $8.28 \pm 7.28$  cuerpos lúteos y  $6.28 \pm 4.79$  embriones transferibles y Herrera et al. (2008) en ovejas Pelibuey reportaron que el número de cuerpos lúteos y de embriones colectados fue de  $10.73 \pm 1.42$  y de  $3.09 \pm 1.36$ , respectivamente.

## **CONCLUSIONES**

El porcentaje de borregas que respondieron a los protocolos hormonales evaluados en el presente trabajo es moderado, con valores para el número de cuerpos lúteos y de embriones transferibles menores a los informados en la literatura, reflejando una variación considerable entre individuos y razas.

## REFERENCIAS

- Abecia, J. A., F. Forcada, and O. Zunig. 2002. The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos *in vitro*. *Veterinary research communications*. 26:151-158.
- Aké-López, J. R., A. M. Heredia, G. M. Alfaro, C. F. Centurión, y R. O. Rojas. 2003. Efecto de la hormona en la respuesta superovulatoria y de la sincronía del estro en el porcentaje de gestación de oveja Pelibuey. *Vet. Méx.* 34:225-233.
- Bartlewski, P. M., B. D. Alexander, and W. A. King. 2008. Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrous ewes. *Small Ruminant Research*. 75:210-216.
- Bruno-Galarraga, M. M., M. Cueto, A. E. Gibbons, F. Pereyra-Bonnet, R. Catalano, and A. Gonzalez-Bulnes. 2014. Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Research*. 120:84-89.
- Bruno-Galarraga, M., M. Cueto, A. Gibbons, F. Pereyra-Bonnet, M. Subiabre, and A. González-Bulnes. 2015. Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology*. 84:784-790.
- Camacho, J. H., R. A. López, J. C. Ku-Vera, G. L. Williams, and J. A. Q. Franco. 2008. Respuesta ovulatoria, estado de desarrollo y calidad de embriones de ovejas Pelibuey superovuladas suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados. *Técnica pecuaria en México*. 46:107-117.
- Cancino, A. G. R. 2005. Producción de embriones ovinos *in vitro*. *Memorias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco*.

Cognie, Y., G. Baril, N. Poulin, and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59:171-188.

Córdova-Izquierdo, A., M. S. Córdova-Jiménez, C. A. Córdova-Jiménez, y J. E. Guerra-Liera. 2008. Procedimientos para aumentar el potencial reproductivo en ovejas y cabras. *Rev. Vet.* 19:67-79.

Forcada, F., M. A. Amer-Meziane, J. A. Abecia, M. C. Maurel, J. A. Cebrián-Pérez, T. Muiño-Blanco, and A. Casao. 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology*. 75:769-776.

Fuerst, K. J., P. M. Bartlewski, and W. A. King. 2009. Relationship between circulating concentrations of ovarian steroids and the superovulatory responses in anestrous ewes following a multiple-dose pFSH regimen. *Small Ruminant Research*. 82:144-148.

Gatti, M., and R. Ungerfeld. 2012. Intravaginal sponges to synchronize estrus decrease sexual attractiveness in ewes. *Theriogenology*. 78:1796-1799.

Gibbons, A. E. y M. I. Cueto. 2010. Manual de transferencia de embriones en ovinos y caprinos. INTAEEA Bariloche, Centro regional Patagonia Norte.

González, P. E., I. D. S. Erosa, A. L. Aguiar, R. E. A. Piña, J. S. López, L. F. S. Navarrete y J. P. R. Ugalde. 2007. Vitricación de embriones en ovinos de pelo. V Congreso de especialistas en pequeños rumiantes. Mendoza Argentina.

Gonzalez-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, R. M. Garcia-Garcia, C. J. H. Souza, Lopez-A. Sebastian, and A. S. McNeilly. 2004. Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. *Theriogenology*. 61:977-985.

Harasymowycz, J., M. Benítez, C. Morales, A. Paul, y F. Checo. 2014. Respuesta ovárica a tratamientos superovulatorios con dosis constantes y decrecientes de fshp evaluada por laparoscopia en ovejas cruza texel. *Conp. Cienc.Vet.* 4:19-23.

Jackson, C. G., T. L. Neville, V. R. G. Mercadante, K. M. Waters, G. C. Lamb, C. R. Dahlen, and R. R. Redden. 2014. Efficacy of various five-day estrous synchronization protocols in sheep. *Small Ruminant Research.* 120:100-107.

Karaca, F., M. B. Ataman, and K. Cayan. 2009. Synchronization of estrus with short-and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestagen treatment in ewes. *Small ruminant research* 81:185-188.

López Sebastián, A., J. Santiago Moreno, A. G. De Bulnes, y M. García López. 1993. Aspectos característicos de la fisiología de la oveja. *Revista Científica.* 3:002).

Mayorga, I., L. Mara, D. Sanna, C. Stelletta, M. Morgante, S. Casu, and M. Dattena. 2011. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology* 75:1661-1668.

Melican, D., and W. Gavin. 2008. Repeat superovulation, non-surgical embryo recovery, and surgical embryo transfer in transgenic dairy goats. *Theriogenology.* 69:197-203.

Norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1993, Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. [Consultado 11 de noviembre 2013] 1993. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4867004&fecha=17/01/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4867004&fecha=17/01/1995)

Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. [Consultado 21 de julio 2014] 1995. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5376424&fecha=18/12/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5376424&fecha=18/12/2014)

Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales. [Consultado 5 de octubre 2015] 1995. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4870842&fecha=23/03/1998](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4870842&fecha=23/03/1998)

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [Consultado 10 de septiembre 2013] 1999. Disponible en:

<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>

Ordoñez, L. A. E. 2005. Producción de embriones ovinos de raza de pelo y lana por medio de fertilización *in vitro*. Memorias. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Pliego Palacios G. 2005. Respuesta ovárica a un estímulo super ovulatorio con diferentes niveles de FSH en ovinos Pelibuey. [Monografía en Internet]. Veracruz: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2005 [acceso 26 de noviembre de 2012]. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/12345678/177/1/GuadalupePliegoPalacios.pdf>

Robledo, V. J. M., J. C. Herrera, M. J. Cajero, M. C. M. Navarro, y A. V. García. 2009. Evaluación de dos medios de maduración *in vitro* para la producción de embriones ovinos. Tropical and Subtropical Agroecosystem. 10:95-99.

Salehi, R., H. Kohram, A. Towhidi, H. K. Moakhar, and m. Honarvar. 2010. Follicular development and ovulation rate following different superovulatory treatments in Challewes. Small Ruminant Research. 93:213-217.

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

Sebastián, A. L., A. G. de Bulnes, J. S. Moreno, M. J. C. Alonso, y R. G. García. (2002). Patrones y mecanismos de control del desarrollo folicular durante la administración de

protocolos superovulatorios en pequeños rumiantes (Revisión). Investigación Agraria. Producción y Sanidad Animales. 17:37-48.

Swelum, A. A. A., A. N. Alowaimer, and M. A. Abouheif. 2015. Use of fluorogestone acetate sponges or controlled internal drug release for estrus synchronization in ewes: Effects of hormonal profiles and reproductive performance. Theriogenology 84:498-503.

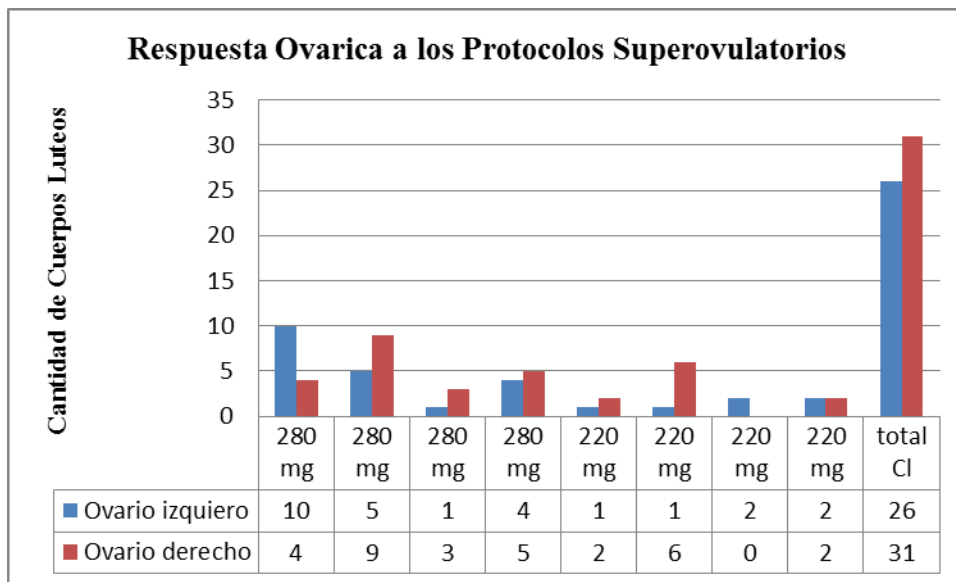


Figura 1. Respuesta Ovárica a los Protocolos Superovulatorios

Figure 1. Ovarian Response to Superovulator Protocols



**CLemus** <drclemus@yahoo.com.mx>

para mí ▾

Saludos

Dr Clemente Lemus Flores

Profesor investigador

Universidad Autónoma de Nayarit

Inicio del mensaje reenviado:

**De:** "Dr. Francisco Rodríguez Félix" <[biotecnia@ciencias.uson.mx](mailto:biotecnia@ciencias.uson.mx)>

**Fecha:** 30 de enero de 2018, 16:48:54 GMT-7

**Para:** [drclemus@yahoo.com.mx](mailto:drclemus@yahoo.com.mx)

**Asunto:** [BIOTECNIA] Acuse de recibo de envío

CLEMENTE LEMUS FLORES:

Gracias por enviar el manuscrito, "EFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO ANTES DE LA CONGELACIÓN SOBRE EL DAÑO ACROSOMAL EN LA CRIOPRESERVACIÓN DEL SEMEN OVINO" a Biotecnia. Con nuestro sistema de gestión de revistas en línea, podrá iniciar sesión en el sitio web de la revista y hacer un seguimiento de su progreso a través del proceso editorial:

URL del manuscrito:

<https://biotecnia.unison.mx/index.php/biotecnia/author/submission/535>

---

**EFFECTO DE DIFERENTES TIEMPOS DE ENFRIAMIENTO ANTES DE LA  
CONGELACIÓN SOBRE EL DAÑO ACROSOMAL EN LA CRIOPRESERVACIÓN  
DEL SEMEN OVINO**

**EFFECT OF DIFFERENT COOLING TIMES BEFORE FREEZING OVER THE  
ACROSOMAL ON CRYOPRESERVATION DAMAGE OF SHEEP SEMEN LAMBS**

<sup>1</sup>Emilio Robles-Huitron,<sup>1</sup>Víctor Manuel González-Vizcarra\*, <sup>2</sup>Clemente Lemus- Flores,  
<sup>2</sup>María Guadalupe Orozco-Benitez, <sup>1</sup>Olga Maritza Manriquez Nuñezy <sup>3</sup>Miguel Mellado-  
Bosque.

<sup>1</sup> (VMGV) Universidad Autónoma de Baja California Instituto de Investigación en  
Ciencias Veterinarias, Fraccionamiento Campestre s/n km 3.5 carretera Mexicali-San  
Felipe, Mexicali Baja california.

<sup>2</sup>(CLF, MGOB) Universidad Autónoma de Nayarit. Posgrado en Ciencias Biológico-  
Agropecuarias, Ciudad de la cultura Amado Nervo, Tepic Nayarit México.

<sup>3</sup>(MME) Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Saltillo Coahuila.

\*Autor para correspondencia: Dr. Víctor Manuel González Vizcarra. Instituto de  
Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja  
California. Carretera a San Felipe Km. 3.5. Correo electrónico: vvizcarra@uabc.edu.mx

**RESUMEN**

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de cinco tiempos de refrigeración antes de la inmersión de las pajillas al nitrógeno líquido en la calidad espermática del semen de borrego Kathadin. Se utilizaron dos sementales de los cuales se obtuvieron dos eyaculados. 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. Diez pajillas de 0.25 mL se llenaron y se enfriaron por tratamiento para su congelación y almacenaje en un termo criogénico a -196 °C hasta su descongelación, realizada en agua a 37 °C/30 segundos. Las

variables evaluadas fueron porcentajes de motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma íntegro. Bajo un arreglo experimental factorial. Se emplearon cinco tiempos de refrigeración (15, 30, 45, 60 y 75 minutos). Se presentó una tendencia cuadrática con la motilidad más alta (45 % para agua de coco y 22 % para agua bidestilada) a los 60 minutos de refrigeración. Se presentó el menor porcentaje de células vivas con los tiempos más cortos de refrigeración. La mayor sobrevivencia de células espermáticas se presentó con 60 minutos de refrigeración, previo a la congelación de los espermatozoides. El uso del agua de coco en el diluyente de semen aumentó ( $P<0.05$ ) considerablemente el porcentaje de células espermáticas vivas después de la congelación en comparación con el uso de agua bidestilada. Igualmente, con el agua de coco se obtuvo un porcentaje más alto de células vivas con acrosoma intacto (33 %) que con el agua bidestilada (18 %) con 30 minutos de refrigeración previo a la criopreservación. Se concluyó que con 60 minutos de refrigeración y el uso de agua de coco se obtuvo la mejor respuesta de los espermatozoides de morueco a la congelación.

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

### **ABSTRACT**

The aim of this experiment was to evaluate the effect of five times of refrigeration previous to immersion of straws into de liquid nitrogen on spermatic quality of ovine semen. 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 coconut water. Ten 0.25 mL straws per treatment were filled, frozen and stored in a cryogenic thermo at  $-196^{\circ}\text{C}$  until they were defrosted in warm water at  $37^{\circ}\text{C}$  during 30 seconds. Variables evaluated were: motility, alive spermatozoa and alive spermatozoa with acrosoma percentages. In a factorial experimental design, five refrigeration times (15, 30, 45, 60 and 75 minutes) and two types of extenders were used. Motility was higher ( $P<0.05$ ; 43 and 22 %) for coconut water

compared to bidestilled water at 60 minutes of refrigeration. Percentages of live spermatozoa also benefitted with the addition of coconut water (45 vs 18 %) at 60 minutes of refrigeration. We conclude that coconut water confers a greater cryoprotective capacity to the base extender (Triladyl), when it substituted bidestilled water. This action is reflected in better motile activity, alive cell sperm and alive cell sperm with good quality acrosome. Additionally, better semen was obtained with 60 minutes of refrigeration prior of exposing semen to liquid nitrogen.

Key words: refrigeration time, extenders, ovine.

## INTRODUCCIÓN

La fertilidad obtenida en ovejas inseminadas con semen congelado es menor a la de semen fresco, debido principalmente a una baja viabilidad post-descongelamiento y a un deterioro en los 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 (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 (Manosalva et al. 2005, Gurrola et al. 2006, Vasco et al. 2007).

Es conocido que el enfriamiento rápido del semen entre 30 y 0 °C induce estrés letal en algunas células espermáticas, y esto es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente, ya que un enfriamiento lento induce estrés sobre la membrana del espermatozoide. Este hecho se relacionaría con un cambio de fase

lipídica y altera 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 morueco durante los procesos de enfriamiento (entre 5 y -20 °C) y posterior calentamiento hasta 30 °C. En ese experimento se observó que los mayores daños de la membrana ocurrían durante el calentamiento luego de la descongelación (Membrillo et al. 2003, Brito et al. 2004, Stornelli et al. 2005).

Los espermatozoides de moruecos son más susceptibles a estos daños de estrés térmico por frío que el de otros animales de la granja, por ser pobre en colesterol, permitiendo que la capacitación espermática ocurra rápido, lo cual reduce la fertilidad (Cardona et al. 2006, Ruiz et al., 2007, Cardozo et al. 2009).

Con base en lo anterior, el objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de cinco diferentes tiempos de refrigeración en la calidad espermática durante el proceso de criopreservación de semen de moruecos Kathadin.

## **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, México, y el Laboratorio de Biotecnología Animal de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit.

## **Animales**

Se utilizaron dos sementales Kathadin que permanecían estabulados en corraletas individuales, alimentados con alfalfa y agua a libre acceso, no se realizó ningún manejo especial para los sementales, únicamente recibieron entrenamiento para la colección de semen con vagina artificial. Todos los procedimientos experimentales se hicieron bajo los lineamientos de las normas oficiales mexicanas NOM-051-ZOO-1995 (trato humanitario de animales), NOM-062-ZOO-1999 (manejo de animales en laboratorio), NOM-033-ZOO-1995 (sacrificio humanitario de animales domésticos) y NOM-012-ZOO-1993 (regulación de productos químicos, farmacéuticos y biológicos para uso en animales).

## **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, con la finalidad de eliminar el espermicida que contienen, éstos se montaban a una perilla para mantener abierta la entrada del condón, y así facilitar la entrada del pene al mismo. Para la colección del semen se utilizaron ovejas que no estaban en celo, a las cuales se les insertó en la vagina el condón, sujetado éste a los labios vulvares con cinta adhesiva. Los moruecos eran entonces puestos en contacto con estas ovejas, y después de la monta, el condón era retirado de la vagina, y el semen se transfería el semen a recipiente térmico de boca ancha a 37 °C. Se obtuvieron dos eyaculados por cada semental en cada sesión de extracción. Inmediatamente después de obtener el eyaculado se procedió a la evaluación de éste, tanto macroscópica como microscópica, con el propósito de determinar la calidad del eyaculado para su posterior dilución y congelación. El semen se envasó en pajillas de 0.25 ml (IMV<sup>®</sup> Technologies, L'Aigle, Cedex, Francia), a una concentración de

120 millones de espermatozoides por pajilla, secándose con papel absorbente y sellándose con alcohol polivinílico.

### **Tratamientos**

Para este experimento se utilizaron dos diluyentes, a base de Triladyl (Minitube Ref. 13500/0250) en una proporción de 20 %, 60 % de agua de coco y 20 % de yema de huevo; para el segundo diluyente se utilizaron los mismos ingredientes sustituyendo el agua de coco por agua bidestilada.

Después de congeladas las pajillas, éstas fueron extraídas del nitrógeno líquido e introducidas en un termo con agua a 37 °C durante 30 segundos. Las pajillas se secaron con papel absorbente y se dejó estabilizar por dos minutos a temperatura ambiente para su posterior evaluación de acuerdo con Quintero (2003) y Sandoval et al (2007).

Para evaluar el efecto de los cinco diferentes tiempos de refrigeración previo a la inmersión de las pajillas en el nitrógeno líquido, en la calidad espermática durante el proceso de criopreservación del semen de morueco, se evaluaron diez pajillas por tratamiento. La motilidad, expresada en porcentaje, se determinó a través de la observación del movimiento individual de los espermatozoides en portaobjetos, con un microscopio de contraste de fases con aumentos de a 20 y 40X, sobre una platina a 37 °C (Martin-Rillo et al. 1996). Para el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos se empleó la tinción eosina-nigrosina de acuerdo a Barth y Oko (1989) y Hernández (1998). El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma se determinó utilizando la triple tinción de acuerdo a Talbot y Chacón (1981), con base en el conteo de 100 células espermáticas.

### **Análisis estadístico**

Para la evaluación de la respuesta de la motilidad, porcentaje de células espermáticas vivas y espermatozoides vivos con su acrosoma íntegro se llevó a cabo un análisis de varianza, con arreglo factorial 2x5, con error de muestreo,

siendo los factores que evaluar dos diluyentes de semen (agua de coco y agua bidestilada), en 5 tiempos de refrigeración. Las unidades experimentales fueron las pajillas. Se consideró como control un tiempo de refrigeración a tiempo fijo de acuerdo con el protocolo estándar de dos horas con un solo diluyente (agua bidestilada). Se probó el efecto del diluyente y tiempo de refrigeración antes de congelar, así como la interacción de estos efectos principales, utilizando el procedimiento PROC MIXED de SAS. La comparación de medias se llevó a cabo con la prueba de Tukey. Se consideraron diferencias significativas aquellas donde el valor de P fue menor a 0.05. Se realizó un análisis de correlación y regresión para determinar la asociación entre las características seminales y el tiempo de refrigeración antes de la congelación del semen.

## **RESULTADOS**

En la Fig. 1 se presenta la asociación entre el tiempo de refrigeración del semen de morueco, previo a la inmersión en nitrógeno líquido, sobre la motilidad de las células espermáticas. Se presentó una tendencia cuadrática con la motilidad más alta a los 60 minutos de refrigeración. Sin embargo, la motilidad a los tiempos de 45, 60 y 75 minutos no difirió entre los tiempos más prolongados de refrigeración. Por otro lado, la motilidad de los espermatozoides fue más alta ( $P < 0.05$ ) cuando se utilizó el agua de coco, en comparación con el agua bidestilada. No se detectó una interacción tiempo de refrigeración x diluyente de semen.

En la Fig. 2 se muestra la asociación entre el tiempo de refrigeración del semen de morueco, previo a la inmersión en nitrógeno líquido, sobre el porcentaje de espermatozoides vivos. Nuevamente se observó una tendencia cuadrática, presentándose el menor porcentaje de células vivas con los tiempos más cortos de refrigeración. La mayor sobrevivencia de células espermáticas se presentó con 60 minutos de refrigeración, previo a la congelación de los espermatozoides. El uso del agua de coco en el diluyente de semen aumentó ( $P < 0.05$ ) considerablemente el porcentaje de células espermáticas vivas después de la

congelación en comparación con el uso de agua bidestilada en el diluyente del semen. No se detectó una interacción tiempo de refrigeración x diluyente de semen para esta variable.

En la Fig. 3 se muestra la asociación entre el tiempo de refrigeración del semen de morueco, previo a la inmersión en nitrógeno líquido, sobre el porcentaje de espermatozoides vivos con su acrosoma íntegro. Las tendencias para esta variable según el tiempo de refrigeración variaron en forma distinta para el diluyente con el agua de coco y el que contenía el agua bidestilada. Para el primer diluyente se observó una tendencia cúbica, para el segundo una tendencia cuadrática. El mayor porcentaje de espermatozoides vivos con su cromosoma intacto se presentó cuando el semen se refrigeró durante 30 minutos. A los 45 y 75 minutos de refrigeración no se detectó diferencia entre los diluyentes con agua de coco o agua destilada; por otro lado, se presentó una mayor de células espermáticas vivas y con acrosoma funcional después de la descongelación del semen a los 15, 30 y 60 minutos de refrigeración.

## **DISCUSIÓN**

En el presente estudio la motilidad de los espermatozoides después de la congelación fue afectada por el tiempo de refrigeración antes de la inmersión de las pajillas al nitrógeno líquido. La reducción en porcentaje de células espermáticas móviles con una reducida refrigeración en el presente estudio también se ha observado en otros reportes (Paulenz et al. 2003, Kasimanickam et al. 2007, Bucak and Tekin 2007). Este fenómeno se atribuye a cambios en la cinética de las enzimas de los espermatozoides derivada de la reducción de temperatura Holt (2000). Asimismo, el uso del agua de coco en lugar del agua bidestilada tuvo un efecto benéfico en la motilidad del espermatozoide después de la congelación. El beneficio del agua de coco pudo deberse a una mejor capacidad de amortiguación, de regulación osmótica y menor toxicidad en comparación con

el agua destilada. Ferreira-Nunes y de Mello Salgueiro (1999) también observaron una mejor respuesta del semen de ovino y caprino cuando estos fueron diluidos con agua de coco, en comparación con otros diluyentes.

Los valores de motilidad de los espermatozoides reportados en el presente estudio son inferiores a los reportados por Anel et al. (2003) y Forouzanfar et al. (2010), donde se alcanzaron valores entre 50 y 75%. En el presente estudio la motilidad espermática varió entre 22 y 45% después de la congelación y con una hora de refrigeración previo al proceso de criopreservación. Estos datos son cercanos a los encontrados por Gutiérrez et al. (2006), con un diluyente a base de agua de coco. Sugieren una motilidad de al menos 50% para una exitosa inseminación artificial en ovinos.

El análisis de estos datos sugiere que el aumento del tiempo de refrigeración hasta 60 minutos, previo a la exposición de las pajillas al nitrógeno líquido, proporciona porcentajes de espermatozoides vivos más altos que los proporcionados por tiempo de refrigeración restringido. La tasa de enfriamiento del semen diluido a temperaturas arriba de los 0 °C tiene una marcada influencia en la tasa de sobrevivencia de los espermatozoides después de la congelación y descongelación (Salamon and Maxwell 2000). Estos datos también muestran el efecto benéfico de la utilización del agua de coco en la sobrevivencia de los espermatozoides después de la congelación/descongelación.

El agua de coco en el diluyente del semen demostró ser benéfica para la sobrevivencia de espermatozoides con su cromosoma íntegro. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con estas características después de la congelación/descongelación resultó muy bajo (alrededor de 20 %). Estos valores son muy parecidos a los reportados por Hernández et al. (2012) para esta variable. Serafini et al. (1986) señala que, independientemente del método y diluyente utilizado en semen de moruecos, la integridad de los espermatozoides se reduce marcadamente. A pesar de este daño a los espermatozoides, aquellos

que conservan su motilidad e integridad de su acrosoma son fértiles, pudiendo alcanzar una tasa de fertilización de 85 a 93% cuando se practica la inseminación intrauterina o tubal (Maxwell et al. 1993). Esto puede deberse simplemente a la proximidad de los gametos, ya que se evita los problemas del transporte de los espermatozoides, lo cual es un problema con el semen de ovino congelado (Salamon and Maxwell 1995). Alternativamente, el proceso de congelación/descongelación de semen de morueco puede promover la maduración de las membranas de los espermatozoides incrementando el número de espermatozoides con la reacción del acrosoma en comparación con los espermatozoides no congelados (Watson 2000).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados del presente experimento demuestran que la sustitución del agua de coco por agua bidestilada ofrece una mejor protección en los espermatozoides de morueco durante el proceso de criopreservación con un diluyente a base de Triladyl. Además, estos datos muestran que, con los diluyentes de semen utilizados en el presente estudio, se requiere de una refrigeración, previo a la inmersión de las pajillas al nitrógeno líquido, de 45 a 60 minutos, para una mejor criopreservación del semen de morueco. Finalmente, a pesar de que, la motilidad, sobrevivencia e integridad de los acrosomas de los espermatozoides fueron severamente afectados por el proceso de criopreservación, se tiene un número suficiente de espermatozoides viables para ser utilizados en la reproducción asistida de ovejas.

## LITERATURA CITADA

Anel, L, P de Paz, M. Álvarez, C. A. Chamorro, J. C. Boixo, A. Manso, M. González, M. Kaabi, and E. Anel. 2003. Field and *in vitro* assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*. 60:1293–1308.

Angulo, M. R. B., A. O. Hernández, J. M. V. Berruecos, D. S. Feldman, y J. M. Valencia. 1999. Motilidad y Fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Vet Mex*. 30:265-268.

Barrientos, M. M., M. L. M. Juárez, M. E. O. Trujillo, y F. P. Montiel. 2009. Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. *Zoot Trop*. 27:17-24.

Barth, A. D. and R. J. Oko. 1989. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press. Iowa United State of America. 8-16.

Brito, F. I., M. J. Valencia, S. A. Balcázar, M. R. Angulo y V. O. Mejía. 2004. 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. Vol. 8, número 002.

Bucak, M. N., and N. Tekin. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rum Res*. 73:103–108.

Cabrera, V. P., y C. A. Pantoja. 2008. 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*. 19:152-159.

Cardona, M. W. D., y A. P. Cadavid. 2005. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Act Urol Esp.* 29:676-684.

Cardona, M. W. D., A. M. Olivera y A. P. Cadavid. 2006. Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionoforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Arch Esp Urol.* 59:501-510.

Cardozo, J. A., P. Grasa, M. T. B. Muiño y J. A. P. Cebrián. 2009. Adición de proteína del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 10:51-59.

Curtis, G. G., R. Vishwanath, P. Colin, D. L. Garner, and P. J. Casey. 1998. Effects of Cryopreservation on Bull Sperm Head Morphometry. *Jornal of Andrology;* 19:704-709.

Ferreira-Nunes, J., y C. Clemente de Mello Salgueiro. 1999. Utilización de agua de coco como diluyente de semen de ovino y caprino. *Rev. Cient. Prod. Anim.* 1:17-26.

Forouzanfar, M., M. Sharafi, S. M. Hosseini, S. Ostadhosseini, S. M. Hajian, L. Hosseini, P. Abedi, N. Nili, H. R. Rahmani, and M. H. Nasr-Esfahani. 2010. *In vitro* comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology.* 73:480-487.

García, R. F. E. 2004. 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.

Gurrola, L. M., M. L. Juárez, P. O. Gutiérrez, y M. R. Angulo. 2009. 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;* URL:

[http://ammueb.net/xxx%20CNB/memorias%202006/pequeños\\_rumiantes/conferencias/peq\\_15.doc](http://ammueb.net/xxx%20CNB/memorias%202006/pequeños_rumiantes/conferencias/peq_15.doc).

Gutiérrez, A. J., R. W. Cosme, C. J. A. Jiménez, G. J. A. Ramírez. 2006. Agua de coco, suero fetal bovino, aloe vero y sus combinaciones para criopreservar semen ovino. Arch. Zootec. 55:101-104.

Hernández, B. J. A (1998) Procesamiento de semen porcino. Técnicas de congelamiento en reproducción. FAUANL. Marín N.L.

Hernández, B. J. A y D. F. B. Carrillo. 2005. Manual de Reproducción en Ovinos. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nayarit.

Hernández, P. J. E., R. F. Fernández, S. J. L. Rodríguez, R. E. Juárez, M. Y. G. Soto, and R. A. D. García. 2012. Effect of cryopreservation of sheep semen related to its viability and acrosomal status. Rev. Salud Anim. 34:78-83.

Holt, W. V and R. D. Nort. 1991. Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. J Reprod Fert. 91:451-461.

Holt, W. V. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology. 53:47–58.

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

Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, K. D. Pelzer, J. J. Dascanio. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4 °C. Anim Reprod Sci. 101: 60-73.

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.* 16:114-128.

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

Maxwell, W. M. C., G. Evans, S. L. Rhodes, M. A. Hillard, B. M. Bindon. 1993. Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviductal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:57-63.

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

Membrillo, O. A., I. A. Cordova, J. J. Hicks, I. M. Olivares, V. M. Martínez y J. J. Valencia. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia.* 28:699-704.

Merino, R. A. 2003. 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.

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

Norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1993, Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. [Consultado 11 de noviembre 2013] 1993. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4867004&fecha=17/01/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4867004&fecha=17/01/1995)

Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. [Consultado 21 de julio 2014] 1995. Disponible en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5376424&fecha=18/12/2014](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5376424&fecha=18/12/2014)

Norma Oficial Mexicana NOM-051-ZOO-1995, Trato humanitario en la movilización de animales. [Consultado 5 de octubre 2015] 1995. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4870842&fecha=23/03/1998](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4870842&fecha=23/03/1998)

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [Consultado 10 de septiembre 2013] 1999. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>

Paulenz, H., L. Söderquist, R. Pérez-Pé, and K. A. Berg. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57:823–836.

Quintero, M. A. 2003. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Disertación Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Rodríguez, F. A., C. O. Ávila, G. A. Anchondo, R. B. Sanchez y J. A. Jimenez. 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*. 18:99-106.

Salamon, S., and W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 38:1-36.

Salamon, S., and W. M. Maxwell. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 77-111.

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.* 18:107-114.

Santiani, A., R. Sandoval, S. Evangelista, M. Urviola, N. Catacora, L. Coronado, y A. Delgado. 2007. 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. Sitio argentino de Producción Animal. URL: [www.produccion-animal.com.ar/produccion.../19-Santiani.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion.../19-Santiani.pdf)

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

Serafini, P. C., D. Hauser, D. Moyer, and R. P. Marrs. 1986. Cryopreservation of human spermatozoa: correlations of ultrastructural sperm head configuration with sperm motility and ability to penetrate zona-free hamster ova. *Fertil. Steril.* 46:691-695.

Stornelli, M. C., C. M. Tittarelli, C. A. Savignone and M. A. Stornelli. 2005. Criopreservation effect on fertility. *Analecta Veterinaria.* 25:28-35.

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

Vasco, M. D., M. M. Hernández, M. J. Vásquez, E. Martínez y J. Roca. 2007. Sustancias Oxígeno Reactivas (ROS) en Semen Congelado-Descongelado de Porcino. Ciencia y Tecnología. 1:23-29.

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

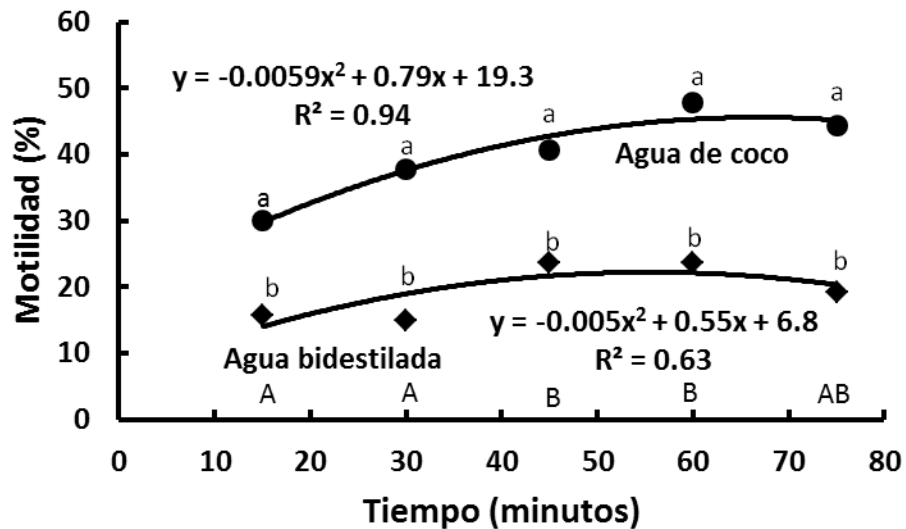


Figura 1. Asociación entre el tiempo de enfriamiento del semen de morueco, previo a la inmersión en nitrógeno líquido, sobre la motilidad de las células espermáticas. Las curvas comparan el semen diluido con agua de coco o agua bidestilada. Las letras minúsculas comparan las medias entre tiempos de refrigeración. Las letras mayúsculas comparan los tiempos de enfriamiento. Para ambos casos letras distintas indican diferencias ( $P < 0.05$ ).

Figure 1. Association between the time of cooling of lambs semen, prior to immersion in liquid nitrogen, on the motility of the sperm cells. Curves compared semen diluted with coconut water or doubly distilled water. Lowercase letters compared the averages between cooling times. Letters compare cooling times. In both cases different letters indicate differences ( $P < 0.05$ ).

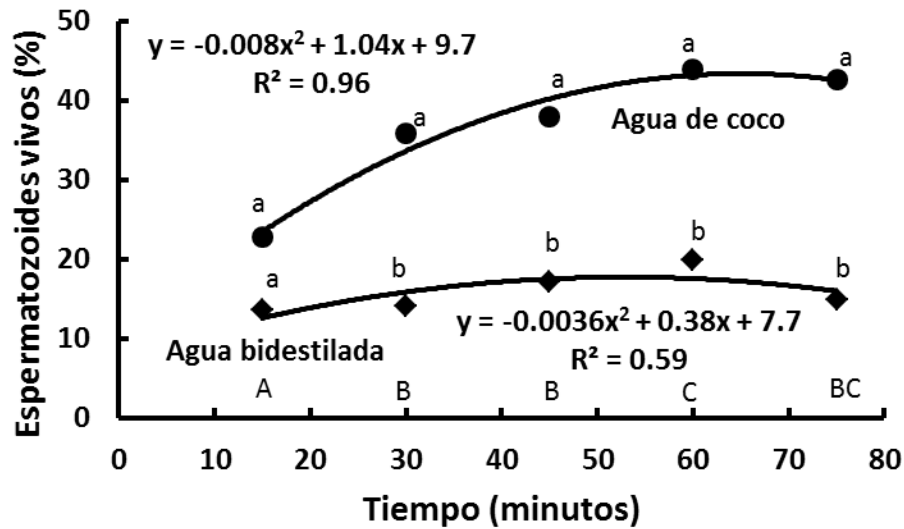


Figura 2. Asociación entre el tiempo de refrigeración del semen de morueco, previo a la inmersión en nitrógeno líquido, sobre el porcentaje de células espermáticas vivas después de la descongelación. Las curvas comparan el semen diluido con agua de coco o agua bidestilada. Las letras minúsculas comparan las medias entre tiempos de refrigeración. Las letras mayúsculas comparan los tiempos de refrigeración. Para ambos casos letras distintas indican diferencias ( $P < 0.05$ ).

Figure 2. Association between the time of cooling of the semen lambs, prior to immersion in liquid nitrogen, on the percentage of live sperm cells after defrosting. Curves compared semen diluted with coconut water or doubly distilled water. Lowercase letters compared the averages between cooling times. Letters compare cooling times. In both cases, different letters indicate differences ( $P < 0.05$ ).

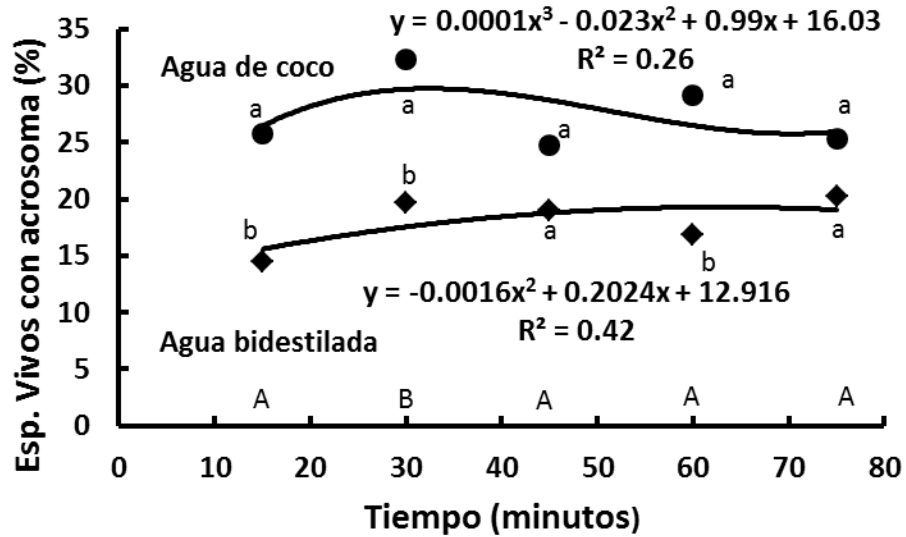


Figura 3. Asociación entre el tiempo de enfriamiento del semen de morueco, previo a la inmersión en nitrógeno líquido, sobre el porcentaje de células espermáticas vivas y con su acrosoma íntegro después de la descongelación. Las curvas comparan el semen diluido con agua de coco o agua bidestilada. Las letras minúsculas comparan las medias entre tiempos de enfriamiento. Las letras mayúsculas comparan los tiempos de enfriamiento. Para ambos casos letras distintas indican diferencias ( $P < 0.05$ ).

Figure 3. Association between the time of cooling of the semen lambs, prior to immersion in liquid nitrogen, on the percentage of live sperm cells and with its intact acrosome after defrosting. Curves compared semen diluted with coconut water or doubly distilled water. Lowercase letters compared the averages between cooling times. Letters compare cooling times. In both cases, different letters indicate differences ( $P < 0.05$ ).