

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**“CALIDAD DE MUESTRAS SEMINALES DE CARNEROS  
CONSERVADAS CON AGENTES GELIFICANTES Y EN  
REFRIGERACIÓN”**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**Yarely Guadalupe Arroyo Carrillo.**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Juan González Maldonado**

La presente tesis “**CALIDAD DE MUESTRAS SEMINALES DE CARNEROS CONSERVADAS CON AGENTES GELIFICANTES Y EN REFRIGERACIÓN**” fue realizada por Yarely Guadalupe Arroyo Carrillo y dirigida por el Dr. Juan González Maldonado, ha sido evaluada y aprobada por el Consejo Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**DIRECTOR:**

\_\_\_\_\_

Dr. Juan González Maldonado

**SINODAL:**

\_\_\_\_\_

Dr. Saúl Hernández Aquino

**SINODAL:**

\_\_\_\_\_

Dr. Rodrigo Flores Garivay

Diciembre de 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento especial para el Dr. Juan González Maldonado por brindarme su apoyo para poder realizar esta tesis de investigación, por compartirme su experiencia durante todo este tiempo y por brindarme las herramientas para poder lograr terminar este trabajo tan importante, y sobre todo por poner a prueba mis conocimientos y enseñarme que puedo lograr grandes cosas.

A la Universidad Autónoma de Baja California, así como al Instituto de Ciencias Agrícolas que me brindaron apoyo incondicional para poder lograr mis metas, y que me hicieron sentir siempre en casa, brindándome las herramientas y las instalaciones para poder llevar a cabo cada proyecto.

A los maestros, que durante toda mi carrera me ayudaron como pilar para poder tener los conocimientos que el día de hoy tengo, y que sin duda pondré a prueba en un futuro y que sobre todo me apoyaron en cada momento para seguir adelante con mis estudios.

## DEDICATORIA

Esta tesis de investigación va dedicada con todo mi corazón especialmente a mis padres; José Luis Arroyo Nava y Laura carrillo Quiroz, que gracias a ellos he podido lograr todo lo que soy hoy en día, que me enseñaron valores y respeto, así como a ser una persona de bien, también por siempre estar para mí dándome su apoyo en todo momento, por darme todo su amor y sobre todo por su esfuerzo todos estos años para que yo lograra el día de hoy estas metas, Son lo mejor que tengo.

A mi esposo y mejor amigo Daniel Contreras por estar para mí desde el principio dándome ánimo para salir adelante, por creer en mí y en mi talento para hacer las cosas, por decirme que puedo lograr esto y más y sobre todo por ser parte de mi vida y darme tanto, por acompañarme en cada momento y por querer también ser parte de mi futuro, te amo.

A mis suegros y familiares que han estado apoyándome y preocupándose por mi desde el primer momento, por ser un pilar, por ayudarme a seguir logrando todos mis objetivos y siempre estar en cada obstáculo, gracias.

A dios por darme la fuerza y la voluntad para seguir adelante, por no dejarme sola y acompañarme en cada paso de mi vida, por darme la dicha de seguir de pie todos los días, por la salud y vida que me da y sobre todo por darme una gran familia.

A mi abuela hasta el cielo con todo mi corazón, te extraño todos los días.

# ÍNDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>I. ÍNDICE DE CUADROS .....</b>	<b>vii</b>
<b>II. ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>III. LISTA DE SÍMBOLOS / NOMENCLATURA.....</b>	<b>ix</b>
<b>IV. RESUMEN.....</b>	<b>x</b>
<b>V. ABSTRAC.....</b>	<b>xi</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
2.1 Importancia del macho en los sistemas de producción animal .....	2
2.2 Aspectos reproductivos del carnero .....	4
2.3 Espermatogénesis en el carnero.....	6
2.4 Métodos de extracción de semen.....	8
2.5 Análisis de muestras seminales .....	9
2.6 Métodos de conservación de semen.....	11
2.7 Diluyentes de semen.....	12
2.8 Efectos del proceso de conservación del semen sobre la calidad espermática .....	14
2.9 Uso de gelificantes en la conservación de semen.....	15
<b>3 JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>4 OBJETIVO.....</b>	<b>20</b>
<b>5 HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
6.1 Ubicación .....	21
6.2 Animales y diseño experimental.....	21
6.3 Manejo de la muestra.....	23
6.4 Variables de respuesta .....	23

6.5	Análisis estadístico.....	24
<b>7</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>34</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>35</b>

## I. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1. Lista de tratamientos a evaluar .....</b>	<b>22</b>
<b>Cuadro 2. Efecto (Medias±Error estandar) de la adición de agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)) en indicadores de calidad se muestras seminales de carneros conservadas en refrigeración (4 °C) por 144 h. ....</b>	<b>29</b>

## II. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1. Probabilidad de encontrar espermatozoides vivos en muestras de semen conservadas por 144 h con y sin (control) agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)).....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 2. Probabilidad de encontrar espermatozoides con buena integridad de membran en muestras de semen conservadas por 144 h con y sin (control) agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)).....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 3. Probabilidad de encontrar espermatozoides con motilidad progresiva en muestras de semen conservadas por 144 h con y sin (control) agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)).....</b>	<b>28</b>



### III. LISTA DE SÍMBOLOS / NOMENCLATURA

Símbolo/nomenclatura	Significado
IA	Inseminación artificial
EE	Electroeyaculador
°C	Grado Celsius
mL	Mililitros
cm	Centímetro
μL	Microlitro
mm	Milímetro
pH	Potencial hidrógeno
MP	Membrana plasmática
mg	Miligramo

#### IV. RESUMEN

El objetivo del trabajo fue medir el efecto de la suplementación del diluyente de semen con grenetina, alginato y agar sobre el porcentaje de espermatozoides vivos, motiles, con motilidad progresiva y buena integridad de membrana en muestras seminales de carnero almacenadas en refrigeración por 144 h. La unidad experimental fue una muestra de semen asignada a uno de 28 tratamientos: Control (no se suplemento con agentes gelificantes), G5 (5 mg de grenetina), G6 (6 mg de grenetina), G7 (7 mg de grenetina), GAG505 (5 mg de grenetina y 0.5 mg de agar), GAG510 (5 mg de grenetina y 1.0 mg de agar), GAG515 (5 mg de grenetina y 1.5 mg de agar), GAG520 (5 mg de grenetina y 2.0 mg de agar), GAG605 (6 mg de grenetina y 0.5 mg de agar), GAG610 (6 mg de grenetina y 1.0 mg de agar), GAG615 (6 mg de grenetina y 1.5 mg de agar), GAG620 (6 mg de grenetina y 2.0 mg de agar), GAG705 (7 mg de grenetina y 0.5 mg de agar), GAG710 (7 mg de grenetina y 1.0 mg de agar), GAG715 (7 mg de grenetina y 1.5 mg de agar), GAG720 (7 mg de grenetina y 2.0 mg de agar), GAL505 (5 mg de grenetina y 0.5 mg de alginato), GAL510 (5 mg de grenetina y 1.0 mg de alginato), GAL515 (5 mg de grenetina y 1.5 mg de alginato), GAL520 (5 mg de grenetina y 2.0 mg de alginato), GAL605 (6 mg de grenetina y 0.5 mg de alginato), GAL610 (6 mg de grenetina y 1.0 mg de alginato), GAL615 (6 mg de grenetina y 1.5 mg de alginato), GAL620 (6 mg de grenetina y 2.0 mg de alginato), GAL705 (7 mg de grenetina y 0.5 mg de alginato), GAL710 (7 mg de grenetina y 1.0 mg de alginato), GAL715 (7 mg de grenetina y 1.5 mg de alginato), GAL720 (7 mg de grenetina y 2.0 mg de alginato). Las variables de respuesta (porcentaje de espermatozoides vivos, motiles, con motilidad progresiva y buena integridad de membrana) se midieron a las 0, 72 y 144 h de almacenamiento. La adición de grenetina, agar y alginato no mejoró ninguna de las medias de las variables de respuesta estudiadas. En conclusión, la adición de grenetina, algina y agar no mejora las medias de porcentaje de espermatozoides vivos, motiles, con motilidad progresiva y buena integridad de membrana en muestras seminales de carnero almacenadas en refrigeración por 144 h.

**Palabras clave:** calidad espermática, conservación, gelificante, solido.

## V. ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the supplementation effect of gelatin, alginate and agar in semen extender on percentage of live spermatozoa, motile, and with progressive motility and good membrane integrity in ram semen samples storage for 144 h. The experimental unit was a ram semen sample assigned to one of 28 treatments: Control (noy supplemented with gelling agents), G5 (5 mg of gelatin), G6 (6 mg of gelatin), G7 (7 mg of gelatin), GAG505 (5 mg of gelatin and 0.5 mg of agar), GAG510 (5 mg of gelatin and 1.0 mg of agar), GAG515 (5 mg of gelatin and 1.5 mg of agar), GAG520 (5 mg of gelatin and 2.0 mg of agar), GAG605 (6 mg of gelatin and 0.5 mg of agar), GAG610 (6 mg of gelatin and 1.0 mg of agar), GAG615 (6 mg of gelatin and 1.5 mg of agar), GAG620 (6 mg of gelatin and 2.0 mg of agar), GAG705 (7 mg of gelatin and 0.5 mg of agar), GAG710 (7 mg of gelatin and 1.0 mg of agar), GAG715 (7 mg of gelatin and 1.5 mg of agar), GAG720 (7 mg of gelatin and 2.0 mg of agar), GAL505(5 mg of gelatin and 0.5 mg of alginate), GAL510 (5 mg of gelatin and 1.0 mg of alginate), GAL51(5 mg of gelatin and 1.5 mg of alginate), GAL520 (5 mg of gelatin and 2.0 mg of alginate), GAL605 (6 mg of gelatin and 0.5 mg of alginate), GAL610 (6 mg of gelatin and 1.0 mg of alginate), GAL615 (6 mg of gelatin and 1.5 mg of alginate), GAL620 (6 mg of gelatin and 2.0 mg of alginate), GAL705 (7 mg of gelatin and 0.5 mg of alginate), GAL710 (7 mg of gelatin and 1.0 mg of alginate), GAL715 (7 mg of gelatin and 1.5 mg of alginate), GAL720 (7 mg of gelatin and 2.0 mg of alginate). The response variables (percentage of live spermatozoa, motile, and with progressive motility and good membrane integrity) were measured at 0, 72 and 144 h after storage. The supplementation of diluted ram semen samples with gelatin, alginate and agar did not improve any of the response variables evaluated in the present study. In conclusion, the supplementation with gelatin, alginate and agar did not improve the percentage of live spermatozoa, motile, and with progressive motility and good membrane integrity in ram semen samples storage for 144 h.

**Key words:** conservation, gelling, solid, sperm quality.

## 1 INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial es una de las biotecnologías reproductivas que más se ha difundido en las unidades de producción animal (Gibbons et al., 2019). Su aplicación permite el uso de material de elevado valor genético (semen), proveniente de cualquier parte del mundo (Foote, 2002). Sin embargo, su efectividad en ovinos es determinada por un gran número de factores, tales como la metodología en sí misma, la anatomía del tracto reproductivo de la oveja, la raza de la oveja, la calidad y el volumen de semen utilizado (Macías et al., 2020; Purdy et al., 2020).

La calidad del semen utilizado en la inseminación artificial es determinante para la obtención de buenos porcentajes de gestación. El semen puede ser utilizado en fresco, frío, refrigerado o congelado. En general, es bien sabido que el uso de los primeros tres tipos de semen ofrece porcentajes de gestaciones más elevados que con el semen congelado. Esto se debe a que el proceso de congelación causa daños estructurales al espermatozoide, los cuales comprometen su capacidad de desplazamiento y de fecundar al ovocito (Allai et al., 2018). Sin embargo, el uso de los otros tipos de semen se ve limitado por la decadencia en la fertilidad del semen a medida que avanza el tiempo de conservación, ya que su vida es limitada (O'Hara et al., 2010).

La incorporación de diferentes diluyentes, tasas de dilución y temperaturas de conservación han sido utilizados con el objetivo de alargar la vida media y mantener la calidad del semen almacenado en líquido (fresco, frío o en refrigeración) (López-Sáez et al., 2000; Maxwell & Salomon, 1993). Los gelificantes son sustancias que inducen la formación de gel o el cambio del estado líquido a uno semisólido del medio en el que se encuentran disueltos (Saha & Bhattacharya, 2010), tales como gretina, agar y alginato. La adición de gelificantes como la gretina ha mostrado efectos benéficos en muestras de semen de carnero conservadas en líquido (Bandeira et al., 2018), pero desconocemos la existencia de información científica en la que se evaluó la calidad de muestras seminales de carnero en respuesta a la suplementación del diluyente con alginato o agar. Por tanto, es necesario realizar

trabajos de investigación que evalúen el efecto de la adición de alginato, agar o sus combinaciones con grenetina sobre la calidad de semen de carnero almacenado en forma líquida.

## **2 REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Importancia del macho en los sistemas de producción animal**

El macho es de gran importancia en los sistemas de producción animal. Esto se debe a que aporta el 50% del material genético de las crías. Además, la generación de crías dentro de la unidad de producción se hace imposible sin la presencia del macho o su material genético. Una de las formas más rápidas de realizar el mejoramiento genético de los animales en una unidad de producción es mediante la compra de machos mejoradores, para aumentar la productividad de las crías, al mejorar en ellas su potencial para la producción de carne, leche y lana (Cueto et al., 2016), ya que el macho tiene el potencial de procrear con un gran número de hembras, y con ello afectar el progreso genético del rebaño/hato (Maquivar et al., 2021).

El impacto que tiene el macho en la producción animal obliga a que los productores sean cautelosos durante su compra, ya que se debe de adquirir uno que cumpla con las características de la raza deseada, que presente características deseables en su descendencia y que tenga buena capacidad de adaptación (Fourie, 2015). Además, se debe de examinar su potencial reproductivo, mediante el análisis de muestras seminales; ya que en un estudio se demostró que hasta un 60% de los sementales evaluados presentaron alguna alteración en su cuerpo, y 17% no eran aptos para la reproducción (Mozo et al., 2015).

Es importante mencionar que el estudio del comportamiento y fisiología del macho permitió el desarrollo de tecnologías reproductivas de uso cotidiano en los sistemas de producción animal. Por ejemplo, el desarrollo de los métodos de extracción y conservación de semen (Salamon - Maxwell, 2000) permitió llevar a cabo la inseminación artificial. Esta fue quizás la primera biotecnología reproductiva de aplicación masiva en todos los sistemas de producción animal, ya que permite una rápida y masiva difusión de características deseables de un macho con elevado valor genético (Gibbons et al., 2019). Actualmente, algunos sistemas de producción se desarrollan sin requerir la presencia de sementales, ya que migraron por completo a la inseminación artificial, tales como los sistemas especializados de bovino lechero. Sin embargo, en los de producción de carne, doble propósito, ovinos y caprinos es común observar la presencia de sementales en las unidades de producción.

Algunas de las funciones que realizan los sementales en las unidades de producción, aparte de las montas, son la estimulación sexual de las hembras para inducir ciclicidad, la detección del celo y el inicio de la actividad reproductiva en hembras pre-puberes (Orihuela-Trujillo, 2014). La inducción de la ciclicidad y la sincronización del celo suelen llevarse a cabo utilizando sustancias hormonales de aplicación exógena (Lozano-gonzález et al., 2012). Sin embargo, esto puede llevarse a cabo también mediante la utilización del efecto macho (Ramón-Ugalde & Sanginés-García, 2002). El cual consiste en la introducción repentina del macho a un corral de hembras, lo que ocasiona un incremento en la secreción de gonadotropinas, producción de estradiol y la aparición de celos (Rosa & Bryant, 2002).

En los programas de manejo reproductivo, sobre todo en los sistemas de producción de ovinos, la detección de hembras en celo solo es posible con la ayuda de machos (Mozo et al., 2015), ya que el comportamiento de ninfomanía no forma parte de las conductas sexuales normales de la oveja (Hulet et al., 1962). El registro del

momento en que la hembra presenta celo nos permite hacer la correcta programación de la monta o inseminación artificial.

La inducción de la ciclicidad o la aparición del primer celo marca el inicio de la actividad reproductiva de la oveja. La aparición temprana de la pubertad es una característica deseable en las hembras, ya que implica que más rápido se puede reproducir, generar crías e ingresos a la unidad de producción. Se sabe que el inicio de la pubertad puede ser acelerado en ovejas pre-puberes mediante la estimulación temprana con carneros (Kenyon et al., 2012).

Los sementales son de gran relevancia en las unidades de producción y tienen la capacidad de impactar más rápidamente la genética de la unidad de producción que las hembras. Por tanto, los machos, al igual que las hembras, deben de ser alimentados, cuidados y manejados apropiadamente durante todo el año, para maximizar su desempeño reproductivo (Cruz-Espinoza et al., 2021).

## **2.2 Aspectos reproductivos del carnero**

La función reproductiva del carnero es la de producir espermatozoides para fecundar el ovocito de una hembra. La producción de espermatozoides capaces de lograr una gestación en la hembra se logra después de la pubertad. Los corderos pueden llegar a esta fase entre los cinco y siete meses de edad, o cuando logren el 50% de su peso vivo adulto (De et al., 2014). En general se acepta que los machos han alcanzado la pubertad cuando producen 50 millones de células espermáticas con al menos el 10% de motilidad (Mukasa-Mugerwa & Ezaz, 1992), mientras que otros autores incluyen otras características para determinar el momento de inicio de la pubertad, tales como el interés por la hembra en celo, la producción sostenida de testosterona, y la presencia de espermatozoides fértiles (Chacón et al., 2018).

Los ovinos se caracterizan por presentar una reproducción estacional. Es decir, durante una época determinada del año detienen su actividad reproductiva. Los ovinos suelen presentar estacionalidad reproductiva durante la época del año con días/fotoperiodos largos. El efecto de la estacionalidad sobre la actividad reproductiva tiende a ser más evidente en las razas de lana y los animales que se encuentran en las regiones templadas (Gündoğan et al., 2003). La hormona responsable de controlar la estacionalidad de los ovinos es la melatonina. Esta hormona es producida por la glándula pineal y su producción se incrementa durante las horas de oscuridad del día (Earl et al., 1990). Los carneros suelen presentar variaciones a lo largo del año en las concentraciones de testosteronas, características testiculares y del semen, obteniéndose los valores más altos durante la época reproductiva (Aibazov et al., 2022). Estas variaciones están estrechamente relacionadas con el largo de exposición del organismo animal a melatonina, mientras mayor sea la exposición a melatonina, mejor será el desempeño reproductivo del carnero (Pool et al., 2020).

El tamaño testicular en el carnero es de gran importancia, ya que se sabe que existe una relación positiva entre este y la capacidad de producción de espermatozoides. El tamaño de los testículos en los carneros adultos suele variar de 21 a 42 cm (Braun et al., 1980). El tamaño testicular está determinado por la raza y edad del animal. Además, se sabe que existe una relación positiva entre peso corporal y tamaño testicular, sobre todo en animales en desarrollo (Allaoui et al., 2014). El eyaculado del carnero tiene un color blanco lechoso, el volumen promedio por eyaculado puede variar de 0.8 y 1.5 mL, con una concentración espermática de dos a seis mil millones de células espermáticas por mililitro de semen. (Zoot et al., 2014).

El carnero muestra una conducta sexual bien caracterizada. El cortejo de la hembra es corto, suele durar de 9 a 21 s, mientras que el número de montas puede variar de ocho a 16 en un periodo de 2 h (Abecia et al., 2005). La intensidad del comportamiento sexual depende de la raza y edad del semental, ya que la experiencia juega un papel fundamental en el desarrollo de los patrones



característicos de comportamiento del macho (Simitzis et al., 2006). Afortunadamente, uno o dos encuentros sexuales son suficientes para que sementales jóvenes muestren un desempeño sexual similar al de los adultos (Price et al., 1991).

### **2.3 Espermatogénesis en el carnero**

La espermatogénesis es el proceso de producción de espermatozoides, el cual está bajo el control del eje reproductivo del macho (hipotálamo-hipófisis-testículos) (McLachlan, 2000). La espermatogénesis tiene una duración de 49 días, durante este periodo de tiempo, los espermatozoides son producidos y liberados en los túbulos seminíferos (Origuela, 2012). La producción consecutiva de espermatozoides inicia después de la pubertad, con la activación de la división meiótica. El proceso inicia con la transición de espermatogonias  $A_0$  a  $A_1$  (Gewiss et al., 2021). Los cambios necesarios que desencadenan el inicio de la espermatogénesis suelen presentarse a edades tempranas. Por ejemplo, la apertura de los túbulos seminíferos se observa a las cuatro semanas de edad (Nazari-Zenouz et al., 2016), y las concentraciones de testosterona se incrementan a partir de las dos semanas de edad (Montiel-Olguín et al., 2016). Como se mencionó en el apartado anterior, el tamaño de los testículos indica la capacidad de un carnero de su producción de espermatozoides. El crecimiento de los testículos es lento en los primeros meses de vida, pero se acelera después de los 120 días (Romero-Martínez, 2004). En general, el patrón de crecimiento de los testículos es creciente hasta las 49 semanas de edad (Moulla et al., 2018)

La espermatogénesis se divide en fases, las cuales son de proliferación, división meiótica y diferenciación. La fase de proliferación se caracteriza por una división mitótica de las espermatogonias ( $A_0$ ,  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$ , I, B), para formar espermatoцитos primarios. En la fase meiótica, los espermatoцитos primarios dan origen a los secundarios (Orozco, 2017). En la fase de diferenciación, también conocida como espermiogénesis, la espermátida sufre cambios estructurales, para diferenciarse en

un espermatozoide (Mendives, 2007), tales como la formación del cromosoma, condensación del núcleo, y la formación del flagelo (Vishwana-Shannonn, 2018).

En general, la espermatogénesis es regulada por las gonadotropinas (LH y FSH) y testosterona. La unión de LH a sus receptores en las células de Leydig induce la producción de testosterona. Esta a su vez, en conjunto con FSH, serán las encargadas de regular el proceso de espermatogénesis, mediante la unión a su receptor en las células de Sertoli (McLachlan, 2000). La población de receptores a testosterona se incrementa significativamente durante los primeros 100 días de vida, al igual que el volumen de las células de Leydig y la cantidad de células de Sertoli (Kuntz et al., 1984).

El incremento en la concentración sanguínea de estas tres hormonas, durante la época reproductiva del carnero, incrementa la producción de espermátocitos primarios y el diámetro testicular. Por lo que no es de sorprenderse que exista una relación positiva entre las concentraciones sanguíneas de LH, testosterona y el diámetro testicular; pero no con las de FSH (Courot - Ortavant, 1981). Sin embargo, se sabe que la privación de FSH conduce a una disminución en el tamaño de las células de Sertoli, así como en el número de espermatogonias B y espermátocitos primarios (Kilgour et al., 1993).

El proceso de producción de espermátocitos se puede ver afectado por factores genéticos, nutricionales y ambientales. Se sabe que existe una variación natural en la capacidad de producción de espermátocitos entre razas. Al respecto, se ha reportado que la cantidad de células de Sertoli es mayor en ovinos de la raza Ile-de France que en los Romanov a una edad similar (Hochereau-de Reviers et al., 1987). Por otra parte, y de manera parecida, una subalimentación reduce la población de células de Sertoli (Reviers et al., 1987). En relación al factor ambiental, las condiciones de estrés calórico afectan severamente la producción de espermátocitos, ya que este proceso debe ocurrir a 5°C por debajo de la temperatura del animal, pero la incapacidad del animal para regular su temperatura compromete sus funciones fisiológicas normales. Los efectos negativos del estrés

calórico en la producción de espermatozoides pueden observarse hasta dos meses después de haber terminado la etapa de calor (Zoot et al., 2014).

## **2.4 Métodos de extracción de semen**

La extracción de semen en los ovinos puede llevarse a cabo mediante dos métodos principales, la vagina artificial y el uso del electroeyaculador. El método más recomendado para la colecta de semen en carneros es la vagina artificial, ya que este es menos estresante para el animal, y simula de mejor manera el proceso natural (monta) que culmina con la eyaculación del macho (Cueto et al., 2016).

La vagina artificial estimula la eyaculación del macho mediante la simulación de la temperatura y presión que genera el canal vaginal de la oveja. Los componentes de la vagina artificial son un tubo térmico de 17 cm de largo, una camisa interna cubierta con látex, un cono y tubo colector. Para preparar la vagina artificial, se aseguran los dos extremos del tubo térmico, junto con la camisa interna, y se llena el espacio entre ellos con agua caliente (50 °C) (Vera, 2009).

El proceso de colecta de semen con la vagina artificial es como sigue, el operador asegura a la oveja en un área de sujeción, o una segunda persona ayuda a contenerla. El técnico, con la vagina artificial, se coloca a un costado de la oveja y espera a que el carnero monte a la hembra. Cuando esto ocurra, el técnico direcciona el pene del carnero hacia la luz de la vagina artificial, siguiendo un ángulo de 45°. La vagina se retira cuando el macho muestre el golpe de riñón o bien cuando baje de la oveja. Por último, se verifica la presencia del eyaculado en el tubo colector (et al., 2021a). El volumen del eyaculado obtenido con vagina artificial puede variar de 0.8 a 3.0 mL, con una concentración de hasta siete millones de células espermáticas por mililitro (Ulloa, 2017).

La frecuencia con la que se puede llevar a cabo la colecta de semen con vagina artificial dependerá de factores, tales como el libido, condición corporal y temperamento del semental; pero se pueden realizar hasta tres saltos diarios, por

un periodo de hasta cinco días, tomando en cuenta descansos de dos a tres días (Gibbons, 2012)

La colecta de semen con el electro-eyaculador se basa en la simulación de los impulsos nerviosos que envía el cerebro a las glándulas accesorias. Para lograr esto, el electro-eyaculador se coloca en el recto del semental, la parte emisora de las descargas eléctricas se posiciona en el piso del recto, con dirección a las glándulas accesorias. Las descargas eléctricas (1 a 15 V) (Ulloa, 2017) estimulan la erección y la secreción de los productos de las glándulas accesorias, para formar el eyaculado (Byrne et al., 2000). Este método se utiliza en carneros que no están entrenados con vagina artificial o en aquellos en los simplemente ha sido imposible obtener una muestra de semen con la vagina. Durante la extracción de semen con este método, las descargas eléctricas generan un incremento en las concentraciones sanguíneas de cortisol y frecuencia cardiaca (Vishwanna-Shannon, 2018). En general, es un proceso estresante e incómodo para el carnero. En algunos casos se hace necesario el uso de anestésicos antes de utilizar el electro-eyaculador (Merino, 2015).

## **2.5 Análisis de muestras seminales**

Las muestras de semen son analizadas para determinar la fertilidad del semental. Algunas de las variables que se miden durante el análisis de muestras seminales son la motilidad, la concentración espermática, color, pH, el número de espermatozoides vivos, el porcentaje de anomalías y la integridad de la membrana espermática (De et al., 2014). A excepción del color, que puede ser evaluado a simple vista, el resto de las variables requiere de equipos especializado para su medición (Vishwannath-Shannon, 2012). El manejo de la muestra de semen es de vital importancia, ya que si esta no se maneja correctamente se pueden obtener valores perjudiciales para la evaluación del semental. En general, se deben de evitar los cambios bruscos de temperatura y el contacto con otras sustancias. Además, se debe de asegurar la limpieza del recipiente contenedor, para evitar su contaminación con bacterias (Luis et al., 2015).

El semen debe ser de consistencia cremosa y un color lechoso.(Alcides, 2009). En general, se asume que muestras con elevada concentración espermática tienden a tener un color blanco-lechoso. Mientras que muestras con una baja concentración espermática tienden a tener una apariencia turbia-transparente (Salamon & Maxwell, 2000b). En el caso de que el animal este pasando por un proceso infeccioso o haya sufrido alguna lesión física, el color del semen puede cambiar. Los colores rojizos y marrón indica presencia de sangre. Muestras de semen con estas coloraciones deben de ser desechadas, y el semental deberá de ser atendido (Gibbons, 2002).

El color de la muestra se registra inmediatamente después de la colecta de semen. La siguiente variable que se registra es el volumen. Este se registra directamente en el tubo colector (González, 2009). El pH se determina con potenciómetro, el del semen de carnero es de 6.2- 7.3, pero puede hasta los 7.5 (Guthrie et al., 2002).

La motilidad masal mide el vigor de las olas producidas por los espermatozoides en movimiento. Este tipo de motilidad solo se puede apreciar en especies que produzcan eyaculados con elevada concentración espermática. La escala de medición es de 0 a 5, cero es indicativo de no motilidad y cinco de motilidad vigorosa. La motilidad se mide con microscopio, utilizando una micro-gota de semen a 37 °C.(Gibbons, 2002).

La presencia de células espermáticas motiles se relaciona con la capacidad fecundante del espermatozoide, para contar la cantidad de espermatozoides motiles se utiliza una muestra de semen diluida. La muestra se observa con microscopio y se determina el número de células espermáticas con algún tipo de movimiento, valores inferiores al 40% son indicativos de problemas de fertilidad (Bertha et al., 1999).

La concentración espermática es el número de espermatozoides por unidad de volumen, se expresa en millones por mililitro de eyaculado. Esta variable puede ser medida con la ayuda de la cámara de Neubauer y por espectrofotometría. La exactitud de la medición dependerá de la habilidad del técnico y la precisión del equipo utilizado (Maya, 2010).

La medición del número de células espermáticas normales y vivas se lleva cabo utilizando la tinción eosina- nigrosina. La membrana celular de los espermatozoides sirve como barrera al paso de tinciones. Los espermatozoides vivos no permiten la entrada de colorantes a su medio intracelular, mientras que los muertos las absorben (Carrascosa et al., 2001). La muestra de semen se mezcla con volúmenes iguales a la tinción, se hace un barrido con la mezcla sobre un porta objetos. La muestra se observa con el microscopio, los espermatozoides que estaban vivos aparecerán con una coloración blanca (Ramírez, 1974). Las anomalías se pueden presentar en todas las partes del espermatozoide (cromosoma, cabeza, cuello, y cola) (Miquel, 2009). El eyaculado de carnero se considera anormal cuando las formas anormales son menores al 15%. Las formas anormales de los espermatozoides están asociadas con inmadurez sexual, procesos degenerativos y enfermedades (Chanapiwat et al., 2012; Madeira et al., 2013).

La integridad de la membrana espermática es fundamental para su metabolismo, e imprescindible para la fecundación, ya que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas (Joly et al., 1999). La prueba de integridad de membrana se mide colocando la muestra de semen en un medio de presión hiposmótico. Esto causa la entrada de agua en el interior de la célula, el hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Los espermatozoides con membranas dañadas no experimentan ningún cambio en el flagelo (Mendives, 2007). Se espera que los eyaculados frescos tengan más del 60% de espermatozoides con buena integridad de membrana (De et al., 2014).

## **2.6 Métodos de conservación de semen**

El semen puede ser utilizado en fresco o enfriado, refrigerado o congelado para alargar su vida media y utilizarlo en el momento más oportuno. Esto se logra mediante la incorporación de diluyentes, los cuales suelen contener una fuente de energía, antibióticos y amortiguadores de pH (Galián et al., 2021b). La dilución del semen se hace tomando en cuenta la concentración inicial de la muestra. Se agrega la cantidad de diluyente que nos permita obtener la concentración final deseada en

cada dosis (100, 150 y 300 millones de espermatozoides para la inseminación cervical con semen fresco, enfriado y refrigerado, respectivamente). La adición del diluyente debe de hacerse de tal manera que se minimice cambios bruscos de temperatura. (Facultad & Agropecuarias, 2017).

El semen fresco se usa inmediatamente después de su recolección, la temperatura de mantenimiento suele ser de 28-30 °C. La inseminación de hembras con este tipo de semen suele dar los porcentajes de gestación más elevados (65-70%) (Merino Australiano, 2015). La recomendación es utilizar este semen durante la primera hora, después de su colecta (Bertha et al., 1999). La principal desventaja de utilizar el semen fresco es que su vida media es corta, aunque suele ser utilizado con frecuencia ya que su corto almacenamiento no requiere mayor inversión económica (Guerra, 2015).

El semen enfriado se conserva por un periodo de ocho horas a una temperatura de 15 °C, mientras que el refrigerado suele mantenerse a 5 °C (Cueto et al., 2016). La ventaja de utilizar semen enfriado o refrigerado es que se incrementa la vida media del espermatozoide, pero la fertilidad de las muestras disminuye conforme avanza el tiempo de conservación. (Vishwannath-Shannon, 2012).

El semen congelado se mantiene en nitrógeno líquido a temperaturas de -196 °C, su vida media es indefinida, siempre y cuando se mantengan niveles adecuados de nitrógeno líquido dentro del tanque criogénico. La principal ventaja de utilizar semen congelado es que se tiene acceso al material genético de sementales de cualquier parte del mundo, y se pueden utilizar en el momento más conveniente. Las principales desventajas de utilizar este semen, son el gasto económico por mantenimiento de las pajillas en el tanque criogénico y, en general se obtienen porcentajes de gestaciones inferiores a los obtenidos cuando se utiliza semen fresco, enfriado o refrigerado (Felipe & Guerra, 2015).

## **2.7 Diluyentes de semen**

Los diluyentes se utilizan para alargar la vida media del espermatozoide, incrementar su volumen, y reducir su concentración por unidad de volumen. Esto con el objetivo de inseminar el mayor número de hembras posible (Vishwanath - Shannon, 2000). Como se mencionó con anterioridad, los diluyentes deben amortiguar los cambios de pH, deben de proveer una fuente de energía para el espermatozoide, impedir el crecimiento de bacterias y eliminar las presentes. Los antibióticos se seleccionan dependiendo de su compatibilidad con el pH del diluyente; por ejemplo, la penicilina y la estreptomina son estables en diluyentes a base de citrato (Vargas, 1.997). Algunos de los componentes más comunes de los diluyentes son tris, citrato, glucosa o fructosa y penicilina (De et al., 2014).

Otro componente importante de los diluyentes comerciales son los crioprotectores. Estas sustancias permiten moderar los cambios de concentraciones en los solutos, mantienen el equilibrio entre el agua que se encuentra en los espacios extra e intracelular. Además, unas las virtudes más importantes de los crioprotectores es que disminuyen la formación de cristales de hielo y estabilizan la membrana celular (Galián 2021a). El glicerol es el crioprotector más utilizado en la conservación de muestras de semen, sirve como solvente, su efecto en el semen es posible debido a que tiene un punto de congelación más bajo que el del agua, minimizando la concentración extracelular de solutos (Vishwanath - Shannon, 2000). Se debe de tener cuidado con el uso de glicerol, ya que a concentraciones elevadas puede ser toxico para las células (Facultad & Agropecuarias, 2017).

Adicional a los componentes tradicionales de los diluyentes, se suelen incorporar sustancias que sirven como fuente de energía y ayudan a minimizar el choque térmico, tales como la yema de huevo, agua de coco y leche (Joly et al., 1999).



## **2.8 Efectos del proceso de conservación del semen sobre la calidad espermática**

El proceso de conservación de semen ocasiona daños estructurales en el espermatozoide (Cardona, 2010). En algunos casos se observa daño a nivel de membrana celular, lo que da como resultado una capacitación prematura y se reduce la supervivencia del espermatozoide dentro del tracto reproductivo de la hembra (Vishwanath - Shannon, 2000). Además, se observa una disminución en la motilidad y capacidad fecundante, lo que explica en parte las menores tasas de gestación obtenidas en hembras inseminadas con semen conservado en comparación con el fresco (Nunes et al., 1982; De et al., 2014). Otras alteraciones observadas por efecto de la conservación de semen a bajas temperaturas incluyen la aglutinación de proteínas, pérdida de selectividad de la membrana y alteración en las funciones fisiológicas normales (Rizkallah et al., 2022).

La disminución en la calidad del espermatozoide conforme avanza el tiempo de conservación se debe a la acumulación de productos del metabolismo espermático que pueden llegar a ser tóxicos, tales como las especies reactivas de oxígeno, las cuales causan lipoperoxidación y pérdida de integridad de la membrana celular (Salamon - Maxwell, 2000a).

En una serie de experimentos se observó que la temperatura de conservación tiene un efecto directo en la calidad del semen de carnero. El almacenamiento de semen a 5 °C mantiene mejores valores de motilidad seminal y viabilidad después de 72 h de almacenamiento en comparación con muestras mantenidas a 15 °C. Además, se observó la capacidad fecundante del espermatozoide disminuye después de las 24 h de almacenamiento (O'Hara et al., 2010). De manera similar, los porcentajes de ovejas gestantes disminuyeron 44% cuando fueron inseminadas con semen almacenado por 96 h en comparación con el conservado por 24 h (Fernández Abella et al., 2014). En general, los porcentajes de gestaciones disminuyen cuando la inseminación, por vía cervical, se realiza con semen conservado por más de 24 h, aunque los espermatozoides pueden mantener su capacidad fecundante aun

después de 10 días de almacenamiento, cuando se utiliza la inseminación intrauterina (Maxwell - Salomon, 1993).

El tipo de diluyente utilizado tiene un efecto directo sobre la viabilidad y fertilidad del semen. Después de un periodo corto de almacenamiento (24 h) se demostró que las muestras seminales conservadas con diluyentes a base yema de huevo y soya mantienen un 20% más de espermatozoides motiles y con mayor velocidad que las conservadas con diluyentes a base de leche (Maksimović et al., 2018). En otro estudio, se evaluó el efecto del tipo de diluyente, pero por un periodo de 16 días, se encontró que las muestras de semen conservadas con un diluyente a base de trehalosa mantienen de mejor manera los porcentajes de espermatozoides motiles, que los conservados con diluyentes a base de tris y leche descremada (López-Sáez et al., 2000).

El daño oxidativo que se produce al espermatozoide ha sido de gran interés para los investigadores, ya que los daños causados al espermatozoide son irreversibles. Con el objetivo de reducir los daños causados por el estrés oxidativo, se han implementado diferentes protocolos de conservación, así como el uso de diversos diluyentes. Además, se ha estudiado el efecto de la incorporación de vitaminas, enzimas, aminoácidos, azúcares y extractos de plantas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno y el daño oxidativo (Allai et al., 2018b). Otros han estudiado la inclusión de agentes gelificantes, los cuales serán revisados en el siguiente apartado. Sin embargo, no se tienen un método definitivo de conservación de semen en refrigeración, que no cause daño al espermatozoide.

## **2.9 Uso de gelificantes en la conservación de semen**

Los hidrocoloides o agentes gelificantes son polímeros de cadena larga que se caracterizan por su capacidad de espesar y gelificar el medio líquido en el que se encuentran disueltos. Estos agente gelificantes tienen una gran capacidad de grupos hidroxilo, los cual les confiere una gran afinidad con las moléculas de agua. La capacidad que tiene un agente gelificante de realizar su acción dependerá de su

concentración, el tipo de agente utilizado, el pH del medio en el cual se está utilizando y la temperatura (Saha - Bhattacharya, 2010). Algunos agentes gelificantes incluyen a la grenetina, agar-agar y alginato.

La grenetina es un polímero natural que se hace a partir de la degradación hidrolítica de colágeno. Este último puede ser tratado de so maneras distintas, para la obtención de la gelatina, una forma acida y otra alcalina. Los principales componentes de la grenetina son la glicina, prolina e hidroxipolina (Alipal et al., 2019). Tiene propiedades de viscosidad y transparencia, contiene 85% de proteínas, 12% de agua y de 1 a 2% de sales. La rigidez y fuerza de la grenetina se mide en gramos BLOOM. (Nieves, 2018). Algunas fuentes de grenetina son los huesos, pieles y cartílagos de animales. (Mercedez, 1974).

La grenetina es de uso común el medio culinario para elaborar gelatinas en frio, flanes, yogures, helados, etc. Suele presentarse como un polvo de color amarillento, su sabor es insípido y sin olor. Se recomienda conservarlo en un lugar limpio, fresco y seco, alejado de la luz y el calor, con una temperatura entre 2 y 3 °C. Su modo de uso es disolver el líquido que se desea gelificar, y calentar hasta la ebullición.( Gayoso, 2018).

El alginato es otro agente gelificante, se clasifica como un polisacárido, se encuentra presente en las algas marinas (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* y *Macrocystis pyrifera*), siendo hasta el 40% de su peso. (Martin, 2003). Otras fuentes de alginato son las bacterias de los géneros *Azotobacter* y *Pseudomonas* (He et al., 2020). El alginato tiene propiedades hidrofílicas, y está compuesto por los ácidos manurónico y gulurónico (Severino et al., 2019). En la naturaleza el alginato existe como una mezcla de sales de cationes que se encuentra en la sal marina, tales como sodio, magnesio y calcio. La extracción del alginato se lleva a cabo mediante la adición de ácidos, para producir alginato ácido, el cual es neutralizado con una solución de hidróxido de sodio o bicarbonato, lo que da como resultado el alginato de sodio (He et al., 2020).

Alginato y sus subproductos se utilizan para gelificar y crear esferas en el área culinaria. Además, el alginato tiene aplicaciones en el área farmacéutica, medicina human, e ingeniería (Zhang - Zhao, 2020). En el área de medicina human se ha utilizado como un transportador de medicamentos para tratar el cáncer (Reig-Vano et al., 2021).

El agar es un polisacárido producido por la pared celular de las algas rojas (Chen et al., 2021). Está compuesto por una mezcla de agaropectinas (fracción no gelificante) y agarosa (fracción gelificante) (Mostafavi - Zaeim, 2020). La función natural del agar es una similar a la de la hemicelulosa en las plantas terrestres, pero con mayor flexibilidad, provee resistencia contra patógenos y funciona como un buffer (Lee et al., 2017). La extracción de del agar se lleva a cabo al hervir las algas para separar la goma de agar, la cual se disuelve en el agua. Posteriormente, el agar se separa por una serie de procesos de congelación y descongelación (Mostafavi - Zaeim, 2020). Algunas de las aplicaciones del agar incluyen a la producción de cubiertas comestibles de empaques de alimentos y como gelificantes de líquidos (Mostafavi - Zaeim, 2020).

Los gelificantes también han sido utilizados para gelificar los diluyentes de semen. La adición de 1.5% de grenetina al diluyente de semen de verraco mantuvo la morfología en muestras almacenadas por 72 h en comparación con las que no contenían grenetina. Además, la presencia de grenetina disminuyo el movimiento retrogrado de semen durante la inseminación artificial de las cerdas (Corcini et al., 2011). En carneros, la adición de 1.5% de grenetina al diluyente redujo la caída de los valores de motilidad e integridad de membrana por efecto del almacenamiento (48 h). Además, el número de ovocitos fecundados se incrementó cuando se utiliza semen conservado con gelatina por un periodo de 24 h en comparación con el semen conservado de manera tradicional (Yániz et al., 2005). En conejos, se observó que la adición de 1% de gelatina al diluyente mejoró el porcentaje de espermatozoides viables después de 72 h de almacenamiento en comparación con las muestras control (Nagy et al., 2002).

Alginato ha sido utilizado ampliamente para la microencapsulación de espermatozoides. El alginato cuando es depositado, en forma de gotas, en una solución de calcio, inmediatamente solidifica la parte externa de la gota, dejando en estado líquido el interior (Nebel et al., 1993). En cerdos, la microencapsulación de semen incrementa la longevidad del semen, manteniendo su motilidad, después de 72 h de almacenamiento (Huang et al., 2005). Resultados de investigación en búfalos muestran que los efectos benéficos del alginato se deben a que este incrementa la capacidad antioxidante del diluyente (Kumar et al., 2019), lo que se traduce en una célula espermática más saludable.

### 3 JUSTIFICACIÓN

La calidad del semen de carnero disminuye conforme se incrementa el tiempo de almacenamiento en líquido (refrigeración) (López-Sáez et al., 2000). La suplementación del diluyente de semen con diferentes productos, antioxidantes, tiene la finalidad de incrementar la vida media del espermatozoide en almacenamiento (Salamon - Maxwell, 2000a). Sin embargo, no existe un método definitivo que permita conservar la calidad del semen refrigerado de manera indefinida.

La adición de agentes gelificantes, tales como grenetina y alginato, han sido promisorios en preservar algunas características relacionadas con la calidad de semen en refrigeración. Es importante hacer hincapié en la importancia de este aspecto, ya que se conoce que la fertilidad de las muestras de semen conservadas disminuye después de 24 h de almacenamiento (Maxwell - Salomon, 1993). Esto limita demasiado la ventana de tiempo en la cual se puede utilizar este tipo de semen, con la certeza de obtener buenos porcentajes de gestaciones.

La adición de grenetina al diluyente de semen de carneros, conejos y machos cabríos ha mostrado ser efectiva en incrementar la vida media del espermatozoide conservado en forma líquida (López-Gatius et al., 2005; Salvador et al., 2006; Yániz et al., 2005). De manera similar, la incorporación de alginato al medio de conservación reduce los impactos negativos del efecto del tiempo de conservación sobre la calidad de muestras seminales de toros, búfalos y cerdos (Corcini et al., 2011; Kumar et al., 2019; Perteghella et al., 2017). En relación al agar, no tenemos conocimiento de información publicada donde se evalué el efecto de este gelificante en aspectos relacionados con la calidad y fertilidad de muestras seminales. Además, desconocemos la disponibilidad de información que describa el uso combinado de agentes gelificantes en muestras de semen de carnero.

#### **4 OBJETIVO**

Medir el efecto de la adición de agentes gelificantes (grenetina, agar y alginato) al diluyente de semen sobre el número de espermatozoides vivos, motiles, con motilidad progresiva y buena integridad de membrana en muestras seminales de carnero almacenadas en refrigeración.

#### **5 HIPÓTESIS**

La adición de agentes gelificantes (grenetina, agar y alginato) al diluyente de semen mejora el número de espermatozoides vivos, motiles, con motilidad progresiva y buena integridad de membrana en muestras seminales de carnero almacenada en refrigeración, en comparación con las muestras no suplementadas con gelificantes.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Ubicación**

El estudio se llevó a cabo en la Unidad de Producción de Ovinos del Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) de la Universidad Autónoma de Baja California. Durante todo el experimento, los animales fueron tratados de acuerdo a los lineamientos de bienestar animal establecidos por el “Canadian Council on Animal Care” (CCAC, 2009).

### **6.2 Animales y diseño experimental**

Se utilizó una muestra de semen hetero espermática obtenida de dos carneros adultos (Dorper x Pelibuey x Katahdin) mediante vagina artificial. Inmediatamente después de la colecta, se determinó la motilidad masal y concentración espermática mediante microscopio (Velab-B4, Microscopio binocular), siguiendo metodologías previamente descritas (Gore et al., 2020), sólo se utilizó la muestra si presentaba motilidad masal  $\geq 3$ .

La muestra hetero espermática fue diluida con un diluyente comercial (Tryladyl, Minitube) hasta obtener una concentración de  $40 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , de la cual se tomaron  $200 \mu\text{L}$ , para ser incorporados a uno de 28 tratamientos (Cuadro 1). El volumen final de cada tratamiento fue de  $2000 \mu\text{L}$ . La preparación de cada tratamiento se llevó a cabo con el mismo diluyente utilizado en la muestra de semen. La grenetina, alginato y agar fueron todos de grado alimenticio.



**Cuadro 1. Lista de tratamientos a evaluar**

<b>Tratamiento</b>	<b>Cantidades de agentes gelificantes utilizadas</b>
<b>Control</b>	No se suplementó con agentes gelificantes
<b>G5</b>	5 mg de grenetina
<b>G6</b>	6 mg de grenetina
<b>G7</b>	7 mg de grenetina
<b>GAG505</b>	5 mg de grenetina y 0.5 mg de agar
<b>GAG510</b>	5 mg de grenetina y 1.0 mg de agar
<b>GAG515</b>	5 mg de grenetina y 1.5 mg de agar
<b>GAG520</b>	5 mg de grenetina y 2.0 mg de agar
<b>GAG605</b>	6 mg de grenetina y 0.5 mg de agar
<b>GAG610</b>	6 mg de grenetina y 1.0 mg de agar
<b>GAG615</b>	6 mg de grenetina y 1.5 mg de agar
<b>GAG620</b>	6 mg de grenetina y 2.0 mg de agar
<b>GAG705</b>	7 mg de grenetina y 0.5 mg de agar
<b>GAG710</b>	7 mg de grenetina y 1.0 mg de agar
<b>GAG715</b>	7 mg de grenetina y 1.5 mg de agar
<b>GAG720</b>	7 mg de grenetina y 2.0 mg de agar
<b>GAL505</b>	5 mg de grenetina y 0.5 mg de alginato
<b>GAL510</b>	5 mg de grenetina y 1.0 mg de alginato
<b>GAL51</b>	5 mg de grenetina y 1.5 mg de alginato
<b>GAL520</b>	5 mg de grenetina y 2.0 mg de alginato
<b>GAL605</b>	6 mg de grenetina y 0.5 mg de alginato
<b>GAL610</b>	6 mg de grenetina y 1.0 mg de alginato
<b>GAL615</b>	6 mg de grenetina y 1.5 mg de alginato
<b>GAL620</b>	6 mg de grenetina y 2.0 mg de alginato
<b>GAL705</b>	7 mg de grenetina y 0.5 mg de alginato
<b>GAL710</b>	7 mg de grenetina y 1.0 mg de alginato
<b>GAL715</b>	7 mg de grenetina y 1.5 mg de alginato

### 6.3 Manejo de la muestra

Las muestras se mantuvieron en refrigeración a una temperatura de 4°C por seis días. Sin embargo, previo a las mediciones, cada muestra se colocó en baño María durante 60 segundos, transcurrido este tiempo se tomaron tres submuestras de cada tratamiento, en las cuales se llevó a cabo la medición de las variables de respuesta. La muestra original se regresaba nuevamente a refrigeración inmediatamente después de tomar las submuestras.

### 6.4 Variables de respuesta

Las variables de respuesta fueron el número de espermatozoides vivos, con buena integridad de membrana, número de células espermática motiles, y motilidad progresiva.

Las variables de respuesta fueron medidas mediante microscopio y siguiendo metodologías previamente descritas (Gore et al., 2020). Brevemente, el número de espermatozoides vivos se determinó mediante el conteo de células no teñidas (blancas), en un barrido hecho sobre un portaobjetos (26 x 76 mm) de una mezcla de la muestra de semen (5 µL) y eosina-nigrosina (10 µL). La muestra fue observada con el objetivo de 100X. La integridad de membrana se midió como el número de espermatozoides con flagelos que mostraban enrollamiento después de haberlos mezclado con una solución hipos-motica.

El número de espermatozoides motiles y con motilidad progresiva de determinó mediante el conteo de células espermáticas con algún tipo de movimiento y con movimiento rectilíneo. Se contaron 50 células espermáticas en cada medición de

cada variable de respuesta. El experimento fue repetido en cuatro ocasiones. Las variables de respuesta se midieron a las 0, 72 y 144 h después de la colecta. La medición a las 0 h: una vez preparados los tratamientos, se colocaron en refrigeración por 1 h para inducir la gelificación. Posteriormente, se inició el proceso de lectura y se consideró como la hora 0.

## 6.5 Análisis estadístico

Las variables de respuesta se analizaron en un diseño de bloques al azar generalizado bajo un modelo mixto de regresión logística, el cual se presenta a continuación:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + M_i + S_{j(i)} + \beta_2 T + \beta_3 T^2 + \text{Trat.k}$$

Dónde:

$\beta_0$  = Constante

P= P (una célula sobreviva, se mueva, sea motil o integra)

$M_i$  = Muestra i o bloque i (aleatorio)

$S_{j(i)}$  = efecto de la submuestra j dentro de muestra i (aleatorio)

Trat.k = efecto del tratamiento K.

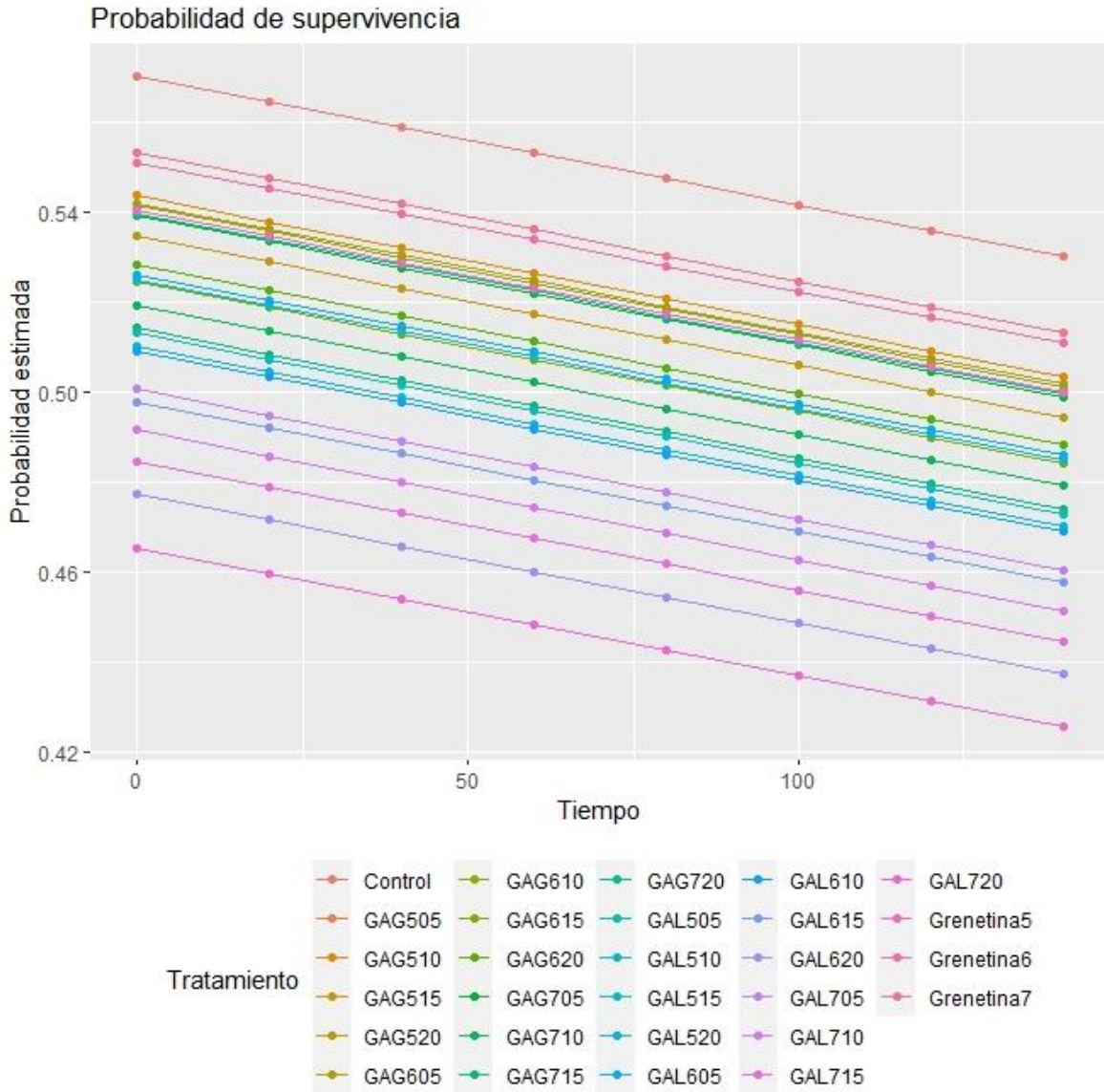
T= Tiempo

Los tratamientos fueron comparados utilizando una Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC). El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa Infostat, usando la opción de R (2020). Se consideró como significativo una  $P < 0.05$ .

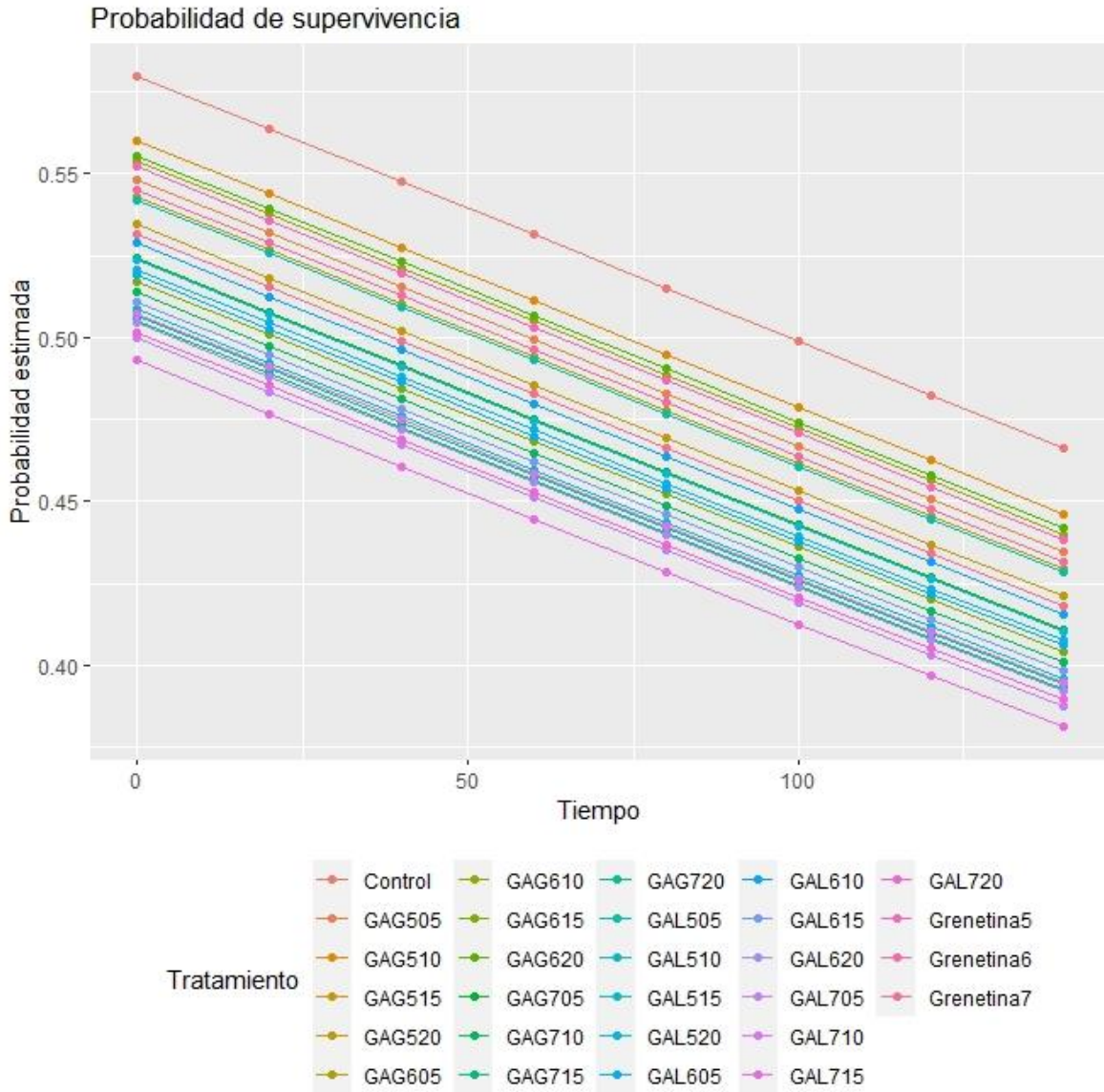
## 7 RESULTADOS

La probabilidad de encontrar una célula espermática viva, con buena integridad de membrana y con motilidad progresiva disminuyó en todos los tratamientos evaluados conforme se incrementó el tiempo de almacenamiento (Figuras 1, 2 y 3).

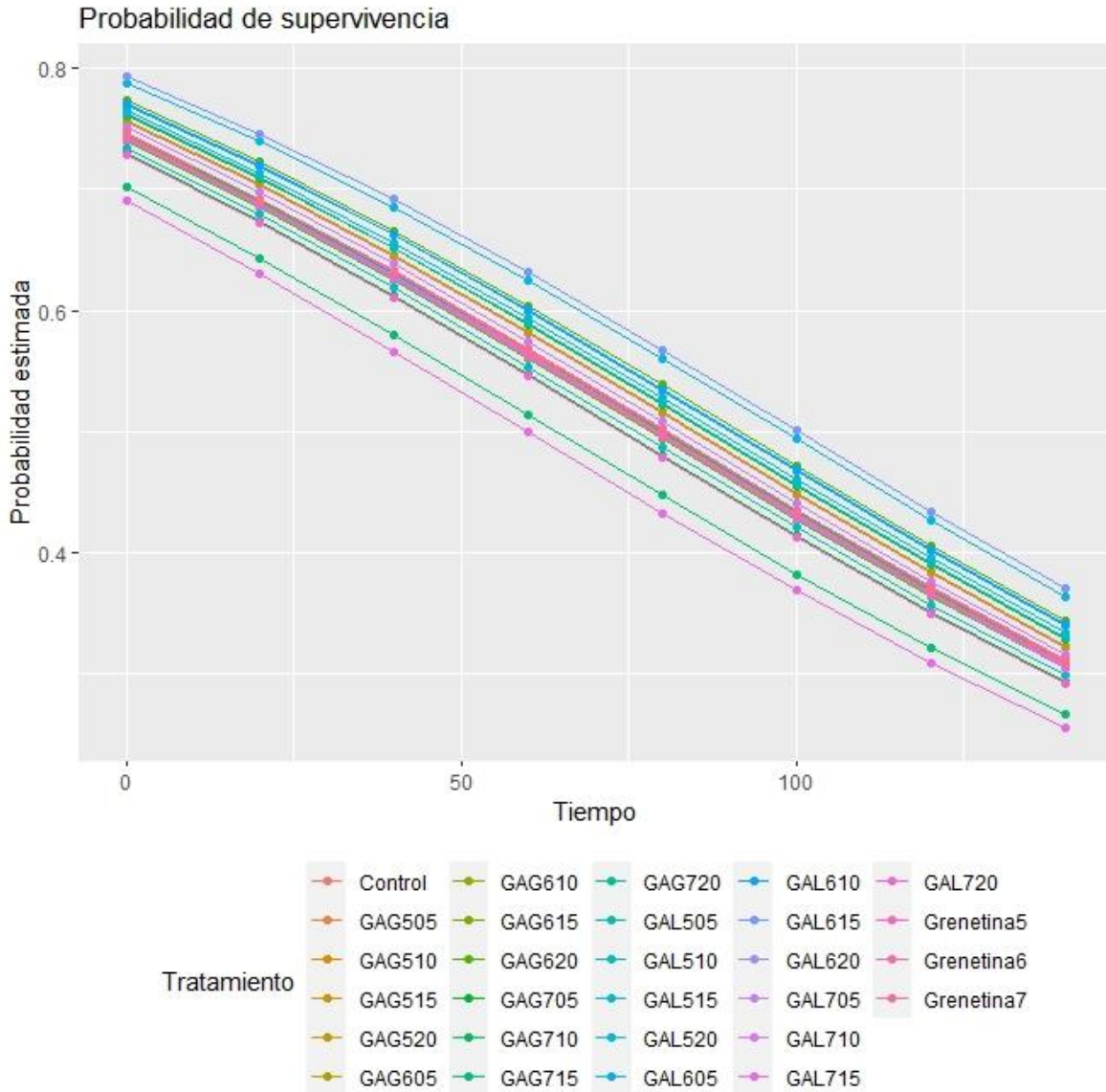
En general, el efecto de la adición de gelificantes sobre el porcentaje de espermatozoides vivos, motiles, con buena integridad de membrana y con motilidad progresiva no fue contundente (Cuadro 2). La adición de grenetina o su combinación con agar o alginato no tuvo un efecto benéfico en el número de espermatozoides vivos después de 144 h de almacenamiento. Los valores más altos ( $P < 0.05$ ) de espermatozoides vivos se obtuvieron en el grupo Control. Los valores más bajos ( $P < 0.05$ ) de espermatozoides vivos (44-48%) y motiles (46-54%) se observaron en varias combinaciones de grenetina y alginato, pero no con agar. Los valores numéricamente más altos (60%) para las medias de espermatozoides motiles se encontraron en los grupos donde se combinó grenetina con agar (GAG610, GAG510 y GAG250), aunque estadísticamente estos valores no fueron diferentes ( $P \geq 0.05$ ) al valor encontrado en el grupo Control (59%). Los valores más altos (48-50%) para la variable integridad de membrana se encontraron, en su mayoría, cuando se combinó grenetina con agar, sin diferencia estadística ( $P \geq 0.05$ ) con el grupo control (52%). En general, los valores más bajos ( $P < 0.05$ ) (43-47%) para esta variable se obtuvieron en los tratamientos con las concentraciones más altas de grenetina, agar y alginato. Los valores numéricos más altos para la variable motilidad progresiva (59%) se encontraron en los grupos GAL615 y GAL520, pero no fueron estadísticamente ( $P \geq 0.05$ ) distintos del valor obtenido en el grupo Control (54%). Los valores más bajos ( $P < 0.05$ ) (46-47%) para esta variable se obtuvieron con las concentraciones más altas de grenetina en combinación con agar y alginato.



**Figura 1. Probabilidad de encontrar espermatozoides vivos en muestras de semen conservadas por 144 h con y sin (control) agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)). La primera letra de cada tratamiento (G) indica la presencia de grenetina, la segunda y tercera letra indican la presencia de agar (AG) o alginato (AL), el primer número de cada tratamiento indica la cantidad (mg) de grenetina, los últimos dos números de cada tratamiento indican la cantidad de AG o AL adicionado (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg). Excepción: 5 mg de grenetina (G5), 6 mg de grenetina (G6) y 7 mg de grenetina (G7).**



**Figura 2. Probabilidad de encontrar espermatozoides con buena integridad de membran en muestras de semen conservadas por 144 h con y sin (control) agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)). La primera letra de cada tratamiento (G) indica la presencia de grenetina, la segunda y tercera letra indican la presencia de agar (AG) o alginato (AL), el primer número de cada tratamiento indica la cantidad (mg) de grenetina, los últimos dos números de cada tratamiento indican la cantidad de AG o AL adicionado (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg). Excepción: 5 mg de grenetina (G5), 6 mg de grenetina (G6) y 7 mg de grenetina (G7).**



**Figura 3. Probabilidad de encontrar espermatozoides con motilidad progresiva en muestras de semen conservadas por 144 h con y sin (control) agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)). La primera letra de cada tratamiento (G) indica la presencia de grenetina, la segunda y tercera letra indican la presencia de agar (AG) o alginato (AL), el primer número de cada tratamiento indica la cantidad (mg) de grenetina, los últimos dos números de cada tratamiento indican la cantidad de AG o AL adicionado (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg). Excepción: 5 mg de grenetina (G5), 6 mg de grenetina (G6) y 7 mg de grenetina (G7).**

**Cuadro 2. Efecto (Medias±Error estandar) de la adición de agentes gelificantes (grenetina (G), agar (AG) y alginato (AL)) en indicadores de calidad se muestras seminales de carneros conservadas en refrigeración (4 °C) por 144 h.**

Tratamiento <sup>δ</sup>	Variables de respuesta*			
	Buena integridad de membrana	Motiles	Motilidad progresiva	Vivos y muertos
<b>Control</b>	0.52±0.02 <sup>A</sup>	0.59±0.03 <sup>A</sup>	0.54±0.07 <sup>B</sup>	0.55±0.01 <sup>A</sup>
<b>G5</b>	0.49±0.02 <sup>A</sup>	0.58±0.03 <sup>A</sup>	0.52±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>G6</b>	0.49±0.02 <sup>A</sup>	0.58±0.03 <sup>A</sup>	0.53±0.07 <sup>B</sup>	0.53±0.01 <sup>B</sup>
<b>G7</b>	0.47±0.02 <sup>B</sup>	0.56±0.03 <sup>A</sup>	0.53±0.07 <sup>B</sup>	0.53±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG505</b>	0.49±0.02 <sup>A</sup>	0.59±0.03 <sup>A</sup>	0.53±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG510</b>	0.50±0.02 <sup>A</sup>	0.60±0.03 <sup>A</sup>	0.53±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG515</b>	0.50±0.02 <sup>A</sup>	0.56±0.03 <sup>A</sup>	0.53±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG520</b>	0.48±0.02 <sup>B</sup>	0.59±0.03 <sup>A</sup>	0.54±0.07 <sup>B</sup>	0.51±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG605</b>	0.48±0.02 <sup>A</sup>	0.59±0.03 <sup>A</sup>	0.52±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>G6AG10</b>	0.50±0.02 <sup>A</sup>	0.60±0.03 <sup>A</sup>	0.52±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>G6AG15</b>	0.46±0.02 <sup>B</sup>	0.56±0.03 <sup>A</sup>	0.52±0.07 <sup>B</sup>	0.50±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG620</b>	0.50±0.02 <sup>A</sup>	0.56±0.03 <sup>A</sup>	0.56±0.07 <sup>B</sup>	0.51±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG705</b>	0.47±0.02 <sup>B</sup>	0.59±0.03 <sup>A</sup>	0.51±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG710</b>	0.46±0.02 <sup>B</sup>	0.57±0.03 <sup>A</sup>	0.55±0.07 <sup>B</sup>	0.50±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAG715</b>	0.45±0.02 <sup>B</sup>	0.55±0.03 <sup>A</sup>	0.47±0.07 <sup>C</sup>	0.49±0.01 <sup>B</sup>
<b>G7AG20</b>	0.45±0.02 <sup>B</sup>	0.57±0.03 <sup>A</sup>	0.53±0.07 <sup>B</sup>	0.49±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAL505</b>	0.48±0.02 <sup>A</sup>	0.57±0.03 <sup>A</sup>	0.55±0.07 <sup>B</sup>	0.52±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAL510</b>	0.45±0.02 <sup>B</sup>	0.58±0.03 <sup>A</sup>	0.51±0.07 <sup>B</sup>	0.49±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAL515</b>	0.46±0.02 <sup>B</sup>	0.55±0.03 <sup>A</sup>	0.55±0.07 <sup>B</sup>	0.50±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAL520</b>	0.46±0.02 <sup>B</sup>	0.46±0.03 <sup>C</sup>	0.58±0.07 <sup>A</sup>	0.49±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAL605</b>	0.46±0.02 <sup>B</sup>	0.51±0.03 <sup>B</sup>	0.56±0.07 <sup>B</sup>	0.51±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAL610</b>	0.47±0.02 <sup>B</sup>	0.53±0.03 <sup>B</sup>	0.56±0.07 <sup>B</sup>	0.49±0.01 <sup>B</sup>
<b>GAL615</b>	0.45±0.02 <sup>B</sup>	0.53±0.03 <sup>B</sup>	0.59±0.07 <sup>A</sup>	0.48±0.01 <sup>C</sup>
<b>GAL620</b>	0.45±0.02 <sup>B</sup>	0.48±0.03 <sup>C</sup>	0.52±0.07 <sup>B</sup>	0.46±0.01 <sup>C</sup>
<b>GAL705</b>	0.44±0.02 <sup>B</sup>	0.58±0.03 <sup>A</sup>	0.54±0.07 <sup>B</sup>	0.48±0.01 <sup>C</sup>
<b>GAL710</b>	0.45±0.02 <sup>B</sup>	0.53±0.03 <sup>B</sup>	0.52±0.07 <sup>B</sup>	0.47±0.01 <sup>C</sup>
<b>GAL715</b>	0.43±0.02 <sup>B</sup>	0.54±0.03 <sup>B</sup>	0.46±0.07 <sup>C</sup>	0.46±0.01 <sup>C</sup>
<b>GAL720</b>	0.44±0.02 <sup>B</sup>	0.49±0.03 <sup>C</sup>	0.51±0.07 <sup>B</sup>	0.44±0.01 <sup>C</sup>



\*Medias con superíndice diferente dentro de cada columna indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

ªLa primera letra de cada tratamiento (G) indica la presencia de grenetina, la segunda y tercera letra indican la presencia de agar (AG) o alginato (AL), el primer número de cada tratamiento indica la cantidad (mg) de grenetina, los últimos dos números de cada tratamiento indican la cantidad de AG o AL adicionado (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg). Excepción: 5 mg de grenetina (G5), 6 mg de grenetina (G6) y 7 mg de grenetina (G7).

## 8 DISCUSIÓN

El experimento evaluó la adición de diferentes concentraciones de grenetina sola o en combinación con distintas concentraciones de alginato y agar sobre el número de espermatozoides vivos, motiles, con buena integridad de membrana y con motilidad progresiva en muestras seminales de carnero conservadas en refrigeración por 144 h. En general, el valor de las variables descendió a medida que se incrementó el tiempo de almacenamiento. Esta tendencia ha sido también reportada por otros autores (O'Hara et al., 2010). O'Hara y colaboradores almacenaron semen de carnero por 72 h y obtuvieron porcentajes espermatozoides vivos entre 55 y 68%, cuando el semen se conservó a 5 °C, pero los valores disminuyeron casi un 50% cuando la muestra de semen se almacenó a 15 °C. Los valores de espermatozoides vivos son similares a los obtenidos en el presente trabajo de investigación. Sin embargo, es importante recalcar que existe una diferencia considerable en el tiempo de almacenamiento.

El almacenamiento de semen de carnero por 24 h a 4 °C produjo valores de motilidad progresiva entre 17 y 23% (Maksimović et al., 2018), los cuales son inferiores a los encontrados en el presente trabajo de investigación. En otro estudio donde se evaluó el efecto del tipo de diluyente, sobre la viabilidad de semen de carnero almacenado por 16 días a una temperatura de 5 °C, se obtuvieron valores de porcentaje de espermatozoides motiles superiores al 50% hasta el día ocho de almacenamiento; valores similares fueron registrados para el porcentaje de espermatozoides con buena integridad de membrana, pero hasta el día 14 de conservación (López-Sáez et al., 2000). En el presente estudio de investigación, 25

de los 28 tratamientos evaluados presentaron valores para la variable de espermatozoides motiles superiores al 50%, solo los tratamientos GAL720, GAL620 y GAL520 no sobrepasaron este porcentaje. Por otra parte, los valores de porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva obtenidos por López-Sáez y colaboradores solo son comparables con los obtenidos en el grupo Control, ya que los tratamientos con agentes gelificantes obtuvieron valores para esta variable entre 43 y 50%.

Los estudios anteriores muestran claramente que existe una gran variación entre los valores registrados, para las distintas variables evaluadas en la determinación de la calidad de una muestra espermática. Sin embargo, se tiene un común que los valores disminuyen conforme avanza el tiempo de almacenamiento de la muestra, y que el tipo de diluyente tiene un efecto directo sobre la vida media del espermatozoide. Esto se debe a características propias de cada diluyente, tales como su capacidad antioxidante (Allai et al., 2018b). Lo anterior es de gran relevancia, ya que se ha observado que la capacidad que tiene el semen para responder al daño oxidativo disminuye conforme se incrementa el periodo de almacenamiento (Sadeghi et al., 2020).

Además, otro factor a considerar es la estabilidad del mismo diluyente y su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. En un estudio se evaluó el efecto del tipo de diluyentes sobre diferentes variables, para medir la calidad de muestras seminales de toro; se encontró el comportamiento natural de las variables, el cual es que sus valores disminuyen conforme pasa el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, al final del periodo de almacenamiento se observó que los valores diferían entre los diluyentes evaluados. Además, se registró una carga bacteriana diferente entre ellos. En general, el diluyente con mayor carga bacteriana obtuvo los valores más bajos para la variable de viabilidad espermática, después de 24 h de almacenamiento (Fernandez-Novo et al., 2021).

En el presente trabajo de investigación se utilizó el mismo diluyente de semen en todos los tratamientos, por lo que esta fuente de variación fue controlada. Por tanto,

se espera que la variación en los valores de las variables de respuesta se deba únicamente a la presencia de los distintos agentes gelificantes evaluados.

La grenetina es uno de los agente gelificantes que más ha sido estudiado en la conservación y calidad de semen; aunque desconocemos su uso en combinación con otros agente gelificantes. La suplementación de semen de carnero con 1.5% de grenetina mejoró en 20 puntos porcentuales el porcentaje de espermatozoides motiles (51.9 vs 31.1%), después de 72 h almacenamiento, en comapración con el diluyente no suplementado con agentes gelificantes. Sin embargo, no se encontró efecto en el porcentaje de espermatozoides con buena integridad de membrana (Gheller et al., 2018). En otro trabajo de investigación, la suplementación de muestras de semen conservadas por 48 h mejoró la motilidad (69.7 vs 55.3%) y la integridad de membran (70.3 vs 56.8%) (Yániz et al., 2005). De manera similar, la adición de grenetina en muestras de semen de machos caprinos conservadas por 72 h a 5 °C mejoró la motilidad espermatica (67 vs 61%) (Salvador et al., 2006). Resultados beneficos de la adición de grenetina sobre la calidad de muestras seminales han sido tambien reportados en cerdos (Corcini et al., 2011) y conejos (López-Gatius et al., 2005).

En el presente trabajo de investigación, las muestras de semen fueron conservadas por 144 h. A diferencia de los resultados reportados por otros investiagdores (Salvador et al., 2006; (Yániz et al., 2005); Gheller et al., 2018), la suplementación con grenetina o su combinación con otros agentes gelificantes no mejoró ninguna de las variables de respuesta evalaudas en el presente trabajo de investigación. Se cree que el efecto benefico de la adición de gelatina se debe a que minimiza la sedimentación de células espermaticas, lo que reduce cambios en el medio de conservación. Además, la conservación de muestras seminales con grenetina disminuye la actividad metabolica (Corcini et al., 2011) y la producción de desechos metabolicos por parte de la célula espermática (Salvador et al., 2006).

Las razones por las cuales la adición de agentes gelificantes no mejoraron ninguna de las variables de respuesta evaluadas en el presente trabajo de investigación pueden ser las siguientes: los resultados compartidos en el presente trabajo de

investigación muestran las medias obtenidas de las mediciones realizadas a las 0, 72 y 144 h; es probable que si se realizan las comparaciones de las medias, unicamente tomando en cuenta los valores colectados a las 144 h, podremos detectar diferencias significativas, al igual que el resto de la evidencia científica disponible (Salvador et al., 2006; (Yániz et al., 2005); Gheller et al., 2018). Sin embargo, estos análisis de resultados pertenecen a otro documento de investigación. Otra posible razón de la ausencia de efecto en las variables evaluadas puede ser el reducido número de repeticiones del experimento (cuatro). Por último, aun cuando se espera un efecto beneficioso en los valores de las variables de respuesta, por efecto de la adición de gelificantes, es probable que la adición de estos gelificantes causará alguna alteración química en el diluyente, que conducirá a valores reducidos al momento de llevar a cabo la lectura de las variables al tiempo cero (Figura 2).

Alginato ha sido utilizado comúnmente para la encapsulación de células espermáticas. La reacción de gotas hechas de una solución de alginato con una de calcio permite solidificar casi de manera instantánea la cubierta externa de la gota, manteniendo su centro en estado líquido (Nebel - Saacke, 1995). La formación de estas capsulas, o también nombradas esferas de alginato, permite una liberación lenta de los espermatozoides dentro del tracto reproductivo de la hembra (Nebel et al., 1993). En el presente estudio, el semen no fue conservado en forma de capsulas, ya que la concentración de alginato no fue la suficiente para inducir la formación de esferas. En un estudio con cerdos, la encapsulación se llevó a cabo mediante la preparación del diluyente con 15% de alginato (Huang et al., 2005). Sin embargo, dosis más altas, que las incluidas en los tratamientos del presente estudio, resultaban en muerte del espermatozoide, por lo que se decidió utilizar las dosis indicadas en cada tratamiento. De manera similar, otros investigadores descartaron utilizar dosis por encima de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ , y optaron por evaluar dosis bajas de alginato (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) (Kumar et al., 2019). El efecto negativo, de la inclusión de dosis altas de alginato en el diluyente de semen, es probable que se deba al elevado grado de viscosidad generado por alginato, incluso a bajas concentraciones.

La razón por la cual el alginato y agar se utilizaron en combinación con grenetina fue porque ninguno de estos agentes gelificantes logró inducir gelificación del medio por si mismo. La ausencia de gelificación se contraponía con el beneficio de la adición de agentes gelificantes, el cual es cambiar el estado físico del diluyente, de líquido a semi-sólido, para minimizar el movimiento del espermatozoide.

Los estudios en los cuales se evalúa la inclusión de alginato en la calidad de muestras seminales son limitados. En cerdos, se reportó que la adición de alginato mejoró el porcentaje de espermatozoides motiles después de nueve días de almacenamiento a 5 °C (49.3 vs 13.6%). Este efecto beneficioso puede deberse a que se conoce que la adición de alginato mejora la capacidad antioxidante del diluyente y disminuye el crecimiento de bacterias (Kumar et al., 2019). Sin embargo, la adición de alginato (1%) no mejoró el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva o con buena integridad de membrana en semen de toro (Perteghella et al., 2017). Puede ser que este resultado se deba a un efecto negativo de la dosis. De acuerdo con algunos autores, alginato puede interferir con el movimiento del espermatozoide (Torre et al., 2000).

## **9 CONCLUSION**

La adición de agentes gelificantes (grenetina, alginato y agar) no mejoró el número de espermatozoides vivos, motiles, con motilidad progresiva y buena integridad de membrana en muestras de semen de carnero almacenadas en refrigeración por 144 h.

## 10 LITERATURA CITADA

- Abecia, J. A., María, G., & Forcada, F. (2005). A note on mating preferences in Rasa Aragonesa rams. *Applied Animal Behaviour Science*, 91(3–4), 355–361. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.10.006>
- Agustin-Origuela. (2012). La conducta sexual del carnero: Revisión. Ciencias Agropecuarias, Estado de Morelos. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242014000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242014000100004)
- Aibazov, M., Trukhachev, V., Selionova, M., & Malorodov, V. (2022). Seasonal changes in testis size, testosterone levels and sperm production quality in meat rams. *Reproduction in Domestic Animals*, 57(10), 1125–1135. <https://doi.org/10.1111/rda.14183>
- Alipal, J., Mohd Pu'ad, N. A. S., Lee, T. C., Nayan, N. H. M., Sahari, N., Basri, H., Idris, M. I., & Abdullah, H. Z. (2019). A review of gelatin: Properties, sources, process, applications, and commercialisation. *Materials Today: Proceedings*, 42, 240–250. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.922>
- Allai, L., Benmoula, A., Marciane da Silva, M., Nasser, B., & El Amiri, B. (2018a). Supplementation of ram semen extender to improve seminal quality and fertility rate. *Animal Reproduction Science*, 192(November 2017), 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.019>
- Allaoui, A., Safsaf, B., Laghrour, W., & Tlidjane, M. (2014). Factors Affecting Scrotal Measurements and Weight of Ouled Djellal Rams in Eastern and South-Eastern Algeria. *APCBEE Procedia*, 8(Caas 2013), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2014.03.037>
- Bandeira, A. M. P., Matos, J. E., Maria, A. N., Carneiro, P. C. F., Purdy, P. H., & Azevedo, H. C. (2018). The effects of gelatin supplementation prior to cooling on ram semen quality and fertility. *Animal Reproduction*, 15(1), 23–28. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2017-0021>

- Bertha, R., Mejorada, A., Ortíz Hernández, A., Manuel, J., Villalobos, B., Feldman Steel, D., & Valencia Méndez, J. (1999). Motilidad y fertilidad del semen de carnero descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. En *Vet. Méx* (Vol. 30, Issue 3).
- Braun, W. F., Thompson, J. M., & Ross, C. V. (1980). Ram scrotal circumference measurements. *Theriogenology*, *13*(3), 221–229. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(80\)90084-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(80)90084-9)
- Byrne, G. P., Lonergan, P., Wade, M., Duffy, P., Donovan, A., Hanrahan, J. P., & Boland, M. P. (2000). Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Animal Reproduction Science*, *62*(4), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00121-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00121-4)
- Cardona M. W. (2010). Concentración espermática. En *Arch. Esp. Urol* (Vol. 63, Issue 2).
- Carrascosa, R. E., Ponzio, M. F., & Lacuara, J. L. (2001). Storage of Chinchilla lanigera semen at 4°C for 24 or 72 h with two different cryoprotectants. *Cryobiology*, *42*(4), 301–306. <https://doi.org/10.1006/CRYO.2001.2326>
- Chacón, J. L., Lozano, M. H., Orozco, C. J., & Ardila, S. A. (2018). Características de la pubertad en corderos de pelo y sus cruces en Colombia en condiciones de baja altitud. *Revista MVZ Cordoba*, *24*(1), 7097–7103. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1227>
- Chanapiwat, P., Kaeoket, K., & Tummaruk, P. (2012). Cryopreservation of boar semen by egg yolk-based extenders containing lactose or fructose is better than sorbitol. *Journal of Veterinary Medical Science*, *74*(3), 351–354. <https://doi.org/10.1292/JVMS.11-0273>
- Chen, X., Fu, X., Huang, L., Xu, J., & Gao, X. (2021). Agar oligosaccharides: A review of preparation, structures, bioactivities and application. *Carbohydrate Polymers*, *265*(March), 118076. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118076>

- Corcini, C. D., Moreira, F., Pigozzo, R., Varela, A. S., Torres, N. U., & Lucia, T. (2011). Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. *Livestock Science*, 138(1–3), 289–292. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.11.019>
- Courot, M., & Ortavant, R. (1981). Endocrine control of spermatogenesis in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 30(2), 47–60. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350010206>
- Cruz-Espinoza, F., Gallegos-Sánchez, J., Mendieta-Galán, T. A., Márquez-Hernández, C. I., & Salazar-Ortiz, J. (2021). Reproductive management of the ram (*Ovis orientalis aries*). *Agro Productividad*, V, 149–156. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i8.2101>
- Cueto, M., Gibbons, A., Macarena Bruno-Galarraga, M., & Fernández, J. (2016). Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual\\_de\\_semen\\_ovino\\_2da\\_edicion.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf)
- Earl, C. R., D'Occhio, M. J., Kennaway, D. J., & Seamark, R. F. (1990). Temporal Changes in the Pattern of Melatonin Secretion in Sheep Held in Constant Darkness. *Journal of Pineal Research*, 8(2), 115–121. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.1990.tb00671.x>
- Facultad, Z., & Agropecuarias, C. (2017). Criopreservacion de semen caprino utilizando diferentes concentraciones de glicerol en el diluyente. <https://ciencia.lasalle.edu.co/zootecnia>
- Felipe, P., & Guerra, M. (2015). Beneficios y ventajas de la inseminación artificial utilizando semen congelado en programas de reproducción en equinos. [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria//ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/89](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria//ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/89)
- Fernández Abella, D., Da Costa, M., Guérin, Y., & Dacheux, J. L. (2014). Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. *Animal*, 9(2), 313–319. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002109>



- Fernandez-Novo, A., Santos-Lopez, S., Barrajon-Masa, C., Mozas, P., de Mercado, E., Caceres, E., Garrafa, A., Gonzalez-Martin, J. V., Perez-Villalobos, N., Oliet, A., Astiz, S., & Perez-Garnelo, S. S. (2021). Effect of extender, storage time and temperature on kinetic parameters (Casa) on bull semen samples. *Biology*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/biology10080806>
- Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables1. *Journal of Animal Science*, *80*(E-suppl\_2), 1–10. [https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80e-suppl\\_21a](https://doi.org/10.2527/animalsci2002.80e-suppl_21a)
- Fourie, P. J. (2015). Promoting the purchasing of performance tested Dorper rams: the role of agricultural extension. *South African Journal of Agricultural Extension*, *43*(1), 32–40.
- Galián, S., Peinado, B., Almela, L., & Poto, A. (2021a). Calidad del semen caprino post-descongelación al utilizar un protocolo de congelación convencional para la especie porcina. En *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA* (Vol. 16).
- Galián, S., Peinado, B., Almela, L & Poto, A. (2021b). Calidad del semen caprino post-descongelación al utilizar un protocolo de congelación convencional para la especie porcina. En *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA* (Vol. 16).
- Gayoso, E. (2018). Condiciones de conservación de agar agar. *Delite*, *01*.
- Gewiss, R., Schleif, M., & Griswold, M. (2021). The role of retinoic acid in the commitment to meiosis. *Asian Journal of Andrology*, *23*(6), 549–554. <https://doi.org/10.4103/aja202156>
- Gheller, S. M. M., Corcini, C. D., Pradieé, J., Rizzoto, G., Lucia, T., Moreira, F., & Varela Junior, A. S. (2018). Gelatin protects ram semen stored for 72 h at 5 °C. *Small Ruminant Research*, *158*, 54–56. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.09.011>

- Gibbons, A. (2012). Inseminación artificial caprina. *Inseminacion Artificial*. 17. [https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-manual\\_inseminacion\\_artificial\\_en\\_caprinos.pdf](https://inta.gov.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-manual_inseminacion_artificial_en_caprinos.pdf)
- Gibbons, A. (2002). Inseminación artificial con semen congelado en cabras de raza angora. *Bariloche. Taurus.*, 24.
- Gibbons, A. E., Fernandez, J., Bruno-Galarraga, M. M., Spinelli, M. V., & Cueto, M. I. (2019). Technical recommendations for artificial insemination in sheep. *Animal Reproduction*, 16(4), 803–809. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0129>
- González, A. (2021). Fisiología de la reproducción y productividad en pequeños rumiantes. EAE, España. 436 p.
- Gore, D. L. M., Muasya, T. K., Okeno, T. O., & Mburu, J. N. (2020). Comparative reproductive performance of Saanen and Toggenburg bucks raised under tropical environment. *Tropical Animal Health and Production*, 52(5), 2653–2658. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02297-4>
- Gündoğan, M., Baki, D., & Yeni, D. (2003). Reproductive Seasonality in Sheep. *Acta Agriculturae Scandinavica - Section A: Animal Science*, 53(4), 175–179. <https://doi.org/10.1080/09064700310014960>
- Guthrie, H. D., Liu, J., & Critser, J. K. (2002). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 67(6), 1811–1816. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD67.6.1811>
- He, L., Shang, Z., Liu, H., & Yuan, Z. X. (2020). Alginate-Based Platforms for Cancer-Targeted Drug Delivery. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1487259>
- Hochereau-de Reviers, M. T., Monet-Kuntz, C., & Courot, M. (1987). Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 34, 101–114. <https://doi.org/10.1530/biosciproc.9.009>

- Huang, S. Y., Tu, C. F., Liu, S. H., & Kuo, Y. H. (2005). Motility and fertility of alginate encapsulated boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 87(1–2), 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.09.005>
- Hulet, C. V., Blackwell, R. L., Ercanbrack, S. K., Price, D. A., & Wilson, L. O. (1962). Mating Behavior of the Ewe. *Journal of Animal Science*, 21(4), 870–874. <https://doi.org/10.2527/jas1962.214870x>
- Joly, F., Besse, C., & Impr. Hérissé). (1999). *integridad de la membrana plasmatica colecta de ovinos*. Hachette jeunesse.
- Kenyon, P. R., Viñoles, C., & Morris, S. T. (2012). Effect of teasing by the ram on the onset of puberty in Romney ewe lambs. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 55(3), 283–291. <https://doi.org/10.1080/00288233.2012.693105>
- Kilgour, R. J., Courot, M., Pisselet, C., Dubois, M. P., & Sairam, M. R. (1993). Inhibition of FSH affects spermatogenesis in the mature ram. *Animal Reproduction Science*, 32(3–4), 213–225. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90093-7](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90093-7)
- Kumar, P., Pawaria, S., Dalal, J., Ravesh, S., Bharadwaj, S., Jerome, A., Kumar, D., Jan, M. H., & Yadav, P. S. (2019). Sodium alginate potentiates antioxidants, cryoprotection and antibacterial activities of egg yolk extender during semen cryopreservation in buffalo. *Animal Reproduction Science*, 209(March), 106166. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106166>
- Lee, W. K., Lim, Y. Y., Leow, A. T. C., Namasivayam, P., Ong Abdullah, J., & Ho, C. L. (2017). Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 164, 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.078>
- López-Gatius, F., Sances, G., Sancho, M., Yániz, J., Santolaria, P., Gutiérrez, R., Núñez, M., Núñez, J., & Soler, C. (2005). Effect of solid storage at 15°C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology*, 64(2), 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.015>

- López-Sáez, A., Ortiz, N., Gallego, L., & Garde, J. J. (2000). Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Archives of Andrology*, 44(2), 155–164. <https://doi.org/10.1080/014850100262335>
- Lozano-gonzález, J. F., Uribe-velásquez, L. F., & Osorio, J. H. (2012). Control hormonal de la reproducción en hembras ovinas. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 6(2), 134–147.
- Luis, R. G., Rocío, S. M., & Alexei, S. A. (2015). Evaluation of ram sperm quality post-thawing by using two energy sources and two cryoprotectants. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Peru*, 26(1), 49–56. <https://doi.org/10.15381/RIVEP.V26I1.10942>
- Macías, A., Martín, E., Laviña, A., Ferrer, L. M., Lidón, I., Rebollar, R., & Tejedor, M. T. (2020). Cervical artificial insemination in sheep: sperm volume and concentration using an antiretrograde flow device. *Animal Reproduction Science*, 221(March). <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106551>
- Madeira, E. M., Bianchi, I., Vieira, M. B., Schneider, A., Severo, N. C., Pfeifer, L. F. M., & Corrêa, M. N. (2013). Avaliação de diferentes crioprotetores intra e extracelulares na criopreservação de sêmen de touros. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(2), 415–420. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000200017>
- Maksimović, N., Milovanović, A., Barna, T., Caro Petrović, V., Pantelić, V., Lazarević, M., & Stojanov, I. (2018). Short-term liquid storage of ram semen in various extenders. *South African Journal of Animal Science*, 48(4), 717–723. <https://doi.org/10.4314/sajas.v48i4.13>
- Maquivar, M. G., Smith, S. M., & Busboom, J. R. (2021). Reproductive management of rams and ram lambs during the pre-breeding season in us sheep farms. *Animals*, 11(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/ani11092503>
- Martin, D. A. (2003). Sustancias utilizadas como agente gelificante. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3 (2). <https://doi.org/10.22490/21456453.972>

- Maxwell, W. M. C., & Salomon, S. (1993). Liquid storage of ram semen: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 613–638. <https://doi.org/10.1071/RD9930613>
- McLachlan, R. I. (2000). The endocrine control of spermatogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 14(3), 345–362. <https://doi.org/10.1053/beem.2000.0084>
- Mendives, J. A. A. (2007). Importancia de los ovino tropicales. 310 *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 15(1). <http://www.bioline.org.br/pdf?la07068#:~:text=Gracias%20a%20esta%20espe cie%20se,f%C3%A9rtiles%20con%20las%20ovejas%20domesticas.>
- Mercedez Ramirez. (1974). *Obtencion de grenetina a partir de hidrolisis*. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/2141>
- Australiano, M. C. (2015). Calidad espermática y la fertilidad de semen fresco y congelado.
- Monet Kuntz, C., Hochereau de Reviers, M. T., & Terqui, M. (1984). Variations in testicular androgen receptors and histology of the lamb testis from birth to puberty. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70(1), 203–210. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0700203>
- Montiel-Olguín, L. J., Vera-Ávila, H., Raymundo, Villagómez-Amezcuca, E., Castañeda-Rodríguez, V., Cárdenas-León, M., & Jiménez-Severiano, H. (2016). Desarrollo del eje reproductivo endocrino en corderos de pelo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 7(3), 341. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v7i3.4214>
- Mostafavi, F. S., & Zaeim, D. (2020). Agar-based edible films for food packaging applications - A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 1165–1176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.123>
- Moulla, F., El-Bouyahiaoui, R., Nazih, R., Abdelaziz, N., Zerrouki, N., & Iguer-Ouada, M. (2018). Characterization of the onset of puberty in Tazegzawt lambs, an endangered Algerian sheep: Body weight, thoracic perimeter, testicular growth,

- and seminal parameters. *Veterinary World*, 11(7), 889–894. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.889-894>
- Mozo, R., Galeote, A. I., Alabart, J. L., Fantova, E., & Folch, J. (2015). Evaluating the reproductive ability of breeding rams in North-Eastern Spain using clinical examination of the body and external genitalia. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0600-9>
- Mukasa-Mugerwa, E., & Ezaz, Z. (1992). Relationship of testicular growth and size to age, body weight and onset of puberty in Menz ram lambs. *Theriogenology*, 38(5), 979–988. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90172-N](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90172-N)
- Nagy, S., Sinkovics, G., & Kovács, A. (2002). Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Animal Reproduction Science*, 70(3–4), 283–286. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00189-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00189-0)
- Nazari-Zenouz, F., Moghaddam, G., Hamidian, G., Ashrafi, J., Rafat, S. A., & Qasemi-panahi, B. (2016). Postnatal testicular development and testosterone changes in Ghezel ram lambs. *Small Ruminant Research*, 141, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.07.001>
- Nebel, R. L., & Saacke, R. G. (1995). Spermatozoal microencapsulation and capsule behavior in the female tract. *Reproduction in Domestic Animals*, 31(1), 75–85. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1995.tb00008.x>
- Nebel, R. L., Vishwanath, R., McMillan, W. H., & Saackea, R. G. (1993). Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: A review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5(6), 701–712. <https://doi.org/10.1071/RD9930701>
- Nieves, C. R. A. (2018). Método para la obtención de grenetina. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/31075>
- O'Hara, L., Hanrahan, J. P., Richardson, L., Donovan, A., Fair, S., Evans, A. C. O., & Lonergan, P. (2010). Effect of storage duration, storage temperature, and

- diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73(4), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.10.009>
- Orihuela-Trujillo, A. (2014). La conducta sexual del carnero. Revisión Ram´s sexual behavior. Review. *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 5(1), 49–89.
- Orozco, J. (2017). Características de la pubertad en ovinos machos de pelo colombiano y sus cruces con Katahdin y Santa Inés en Villavicencio, Meta. <https://ciencia.lasalle.edu.co/>
- Perteghella, S., Gaviraghi, A., Cenadelli, S., Bornaghi, V., Galli, A., Crivelli, B., Vigani, B., Vigo, D., Chlapanidas, T., Faustini, M., & Torre, M. L. (2017). Alginate encapsulation preserves the quality and fertilizing ability of Mediterranean Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) and Holstein Friesian (*Bos taurus*) spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Veterinary Science*, 18(1), 81–88. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.1.81>
- Pool, K. R., Rickard, J. P., Pini, T., & de Graaf, S. P. (2020). Exogenous melatonin advances the ram breeding season and increases testicular function. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66594-6>
- Price, E. O., Estep, D. Q., Wallach, S. J., & Dally, M. R. (1991). Sexual performance of rams as determined by maturation and sexual experience. *Journal of Animal Science*, 69(3), 1047–1052. <https://doi.org/10.2527/1991.6931047x>
- Purdy, P. H., Spiller, S. F., McGuire, E., McGuire, K., Koepke, K., Lake, S., & Blackburn, H. D. (2020). Critical factors for non-surgical artificial insemination in sheep. *Small Ruminant Research*, 191(March), 106179. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106179>
- Ramón-Ugalde, J. P., & Sanginés-García, J. R. (2002). Respuesta al efecto macho de primas Pelibuey en condiciones de pastoreo y suplementación en trópico Response to ram effect in Pelibuey yearling ewes under grazing and supplemented conditions in a tropical environment. *Tecnica Pecuaria de México*, 40(2), 309–317.

- Reig-Vano, B., Tylkowski, B., Montané, X., & Giamberini, M. (2021). Alginate-based hydrogels for cancer therapy and research. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 424–436. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.161>
- Rizkallah, N., Chambers, C. G., de Graaf, S. P., & Rickard, J. P. (2022). Factors Affecting the Survival of Ram Spermatozoa during Liquid Storage and Options for Improvement. *Animals*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ani12030244>
- Romero-Martínez, J. (2004). *ovinicultua*. [https://fmvz.unam.mx/fmvz/p\\_estudios/apuntes\\_zoo/unidad\\_4\\_ovinos.pdf](https://fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_zoo/unidad_4_ovinos.pdf)
- Rosa, H. J. D., & Bryant, M. J. (2002). The “ram effect” as a way of modifying the reproductive activity in the ewe. *Small Ruminant Research*, 45(1), 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00107-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00107-4)
- Sadeghi, S., Del Gallego, R., García-Colomer, B., Gómez, E. A., Yániz, J. L., Gosálvez, J., López-Fernández, C., & Silvestre, M. A. (2020). Effect of Sperm Concentration and Storage Temperature on Goat Spermatozoa during Liquid Storage. *Biology*, 9(9), 300. <https://doi.org/10.3390/biology9090300>
- Saha, D., & Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 47(6), 587–597. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0162-6>
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000a). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (2000b). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 77–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00155-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00155-X)
- Salvador, I., Yániz, J., Viudes-de-Castro, M. P., Gómez, E. A., & Silvestre, M. A. (2006). Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. *Theriogenology*, 66(4), 974–981. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.02.042>



- Severino, P., da Silva, C. F., Andrade, L. N., de Lima Oliveira, D., Campos, J., & Souto, E. B. (2019). Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current Pharmaceutical Design*, 25(11), 1312–1334. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190425163424>
- Simitzis, P. E., Deligeorgis, S. G., & Bizelis, J. A. (2006). Effect of breed and age on sexual behaviour of rams. *Theriogenology*, 65(8), 1480–1491. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.001>
- Torre, M. L., Maggi, L., Vigo, D., Galli, A., Bornaghi, V., Maffeo, G., & Conte, U. (2000). Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads. *Biomaterials*, 21(14), 1493–1498. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00035-1](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00035-1)
- Ulloa, A. R. L. (2017). Estrés al uso de eyaculador en carneros. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28377>
- Vera, T. A. (2009). “*Guía para la evaluación del semen de caprinos. Aporte de algunas metodologías para la evaluación de la calidad seminal de reproductores machos caprinos*”. Cartilla de divulgación Comportamiento reproductivo anual de caprinos View project Diagnosis of abortion in small ruminants in Argentina View project. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2143.9125>
- Vishwanath, R., & Shannon, P. (2000). Semen líquido y fresco. *Animal Reproduction Science*, 62(1–3), 23–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00153-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00153-6)
- Vishwanna-Shannon. (2018). Recolección y manipulación seminal in vitro. *CBS* 54, 54, 58. [https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronic/recoleccion\\_manipulacion.pdf](https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronic/recoleccion_manipulacion.pdf)
- Vishwannath-Shannon 2000. (2012). Semen refrigerado y la adición. *Biblioteca Digital Argentina*, A. [https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronic/recoleccion\\_manipulacion.pdf](https://www.casadelibrosabiertos.uam.mx/contenido/contenido/Libroelectronic/recoleccion_manipulacion.pdf)

- Yániz, J., Martí, J. I., Silvestre, M. A., Folch, J., Santolaria, P., Alabart, J. L., & López-Gatius, F. (2005). Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15°C on their survival and penetrating capacity. *Theriogenology*, 64(8), 1844–1851. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.012>
- Zhang, M., & Zhao, X. (2020). Alginate hydrogel dressings for advanced wound management. En *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 162). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311>
- Zoot, L. S. I., Zoot G. I. M. & Zoot M. M. I. (2014). Aspectos reproductivos de los carneros. En *Agrarias. UNLZ* (Vol. 1, Issue 1).