

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EVALUACIÓN ESPERMÁTICA DE SEMEN DE  
OVINO TRATADO POR LA TÉCNICA DE  
GRADIENTE DE DENSIDAD**

Tesis para optar el Título Profesional de  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

Autora

**BELMA EXRLALIA DELGADO CÁCERES**

Dr. Hugo Gonzales Figueroa

Director de Tesis

**LIMA – PERÚ**

**2013**

## *DEDICATORIA*

A mi familia, porque a pesar del tiempo, siguieron creyendo en mí. Por ser el estandarte que me conduce a seguir adelante y obtener lo que me propongo. Todo mi esfuerzo se ve reflejado en este trabajo y es un orgullo podérselos brindar. Gracias a ustedes hoy puedo ver realizados mis estudios ya que siempre estuvieron motivándome. Simplemente, muchas gracias.

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre, con todo mi amor y gratitud, quien me demostró que con esfuerzo y paciencia se pueden lograr los objetivos.

A mi familia, quienes impulsaron el desarrollo de mi formación académica apoyándome en todo momento y llenándome de su cariño.

A Julio Diego Aguilar por soportar mis nervios y mal humor en la recta final de este trabajo y que siempre estuvo a mi lado llenándome de su amor incondicional y su apoyo, siendo un impulso para seguir adelante.

A mi asesor, Hugo Figueroa, por haber aceptado la tutoría de esta tesis y apoyarme en este proyecto incondicionalmente además de mostrarme una gran amistad.

Al Ing. Próspero Cabrera, Jefe del Banco Nacional de Semen, por facilitarme el uso de sus instalaciones y el apoyo económico aportado durante la realización de este trabajo.

A Juan Carlos Pinillos, por su ayuda en la parte experimental de este trabajo y sin la cual habría sido demasiado tedioso y aburrido.

A Pedro Lope, por su ayuda y paciencia demostrada en la realización de los diluyentes, reactivos químicos y ayuda en lo referente a la salud y entrenamiento de la oveja y carneros utilizados.

A todos los integrantes del Banco Nacional de Semen, por su apoyo brindado y los momentos agradables compartidos.

A mi oveja y carneros, sin los cuales indudablemente no hubiese sido posible realizar este trabajo.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>9</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>14</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>18</b>
IMPORTANCIA DEL RECURSO OVINO .....	18
FISIOLOGIA REPRODUCTIVA DEL OVINO MACHO .....	19
INSEMINACION ARTIFICIAL EN OVINOS .....	20
COLECCION DE SEMEN .....	21
EVALUACION DE LAS CARACTERISTICAS DE UNA MUESTRA SEMINAL .....	22
<i>Color</i> .....	23
<i>Aspecto</i> .....	23
<i>Volumen</i> .....	23
<i>pH</i> .....	24
<i>Motilidad Masal</i> .....	24
<i>Motilidad Individual</i> .....	24
<i>Concentración espermática</i> .....	25
<i>Morfología espermática</i> .....	26
<i>Vitalidad</i> .....	27
<i>Integridad de la membrana espermática</i> .....	28
DILUYENTES PARA SEMEN .....	29
<i>Triladyl</i> ® .....	30
CAPACITACION ESPERMATICA.....	31
<i>Capacitación Espermática in vivo</i> .....	31
<i>Capacitación Espermática in vitro</i> .....	33
TECNICAS DE SELECCION ESPERMATICA .....	34
TECNICAS DE SELECCION POR GRADIENTES DE DENSIDAD CON OVIPURE™ .....	35
REFRIGERACION DEL SEMEN DE CARNERO.....	36
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>

OBJETIVO GENERAL.....	39
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	39
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
LUGAR DE ESTUDIO .....	41
ANIMALES .....	41
DISEÑO PROCEDIMENTAL .....	42
<i>Colección y toma de muestra.....</i>	<i>44</i>
<i>Evaluación Macroscópica.....</i>	<i>45</i>
<i>Determinación de la concentración espermática y la motilidad masal .....</i>	<i>45</i>
<i>Preparación del diluyente y pre-dilución.....</i>	<i>47</i>
<i>División de los grupos de estudio: control y experimental .....</i>	<i>48</i>
<i>Aplicación de la técnica de gradiente de densidad .....</i>	<i>48</i>
<i>Determinación de la tasa de recuperación espermática.....</i>	<i>50</i>
<i>Dilución de las muestras de ambos grupos a la concentración deseada .....</i>	<i>50</i>
<i>Evaluaciones Microscópicas en tiempo cero.....</i>	<i>52</i>
<i>Preparación y Envasado en Pajillas.....</i>	<i>55</i>
<i>Refrigeración de las muestras.....</i>	<i>56</i>
<i>Evaluación microscópica de las muestras refrigeradas por 24 horas. ....</i>	<i>57</i>
ANALISIS ESTADISTICO .....	57
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS DE LOS EYACULADOS .....	59
DETERMINACION DE LA TASA DE RECUPERACION ESPERMATICA .....	60
PARAMETROS MICROSCOPICOS DE LAS MUESTRAS DEL GRUPO CONTROL Y GRUPO EXPERIMENTAL EN TIEMPO CERO .....	60
<i>Motilidad Individual .....</i>	<i>60</i>
<i>Vitalidad.....</i>	<i>61</i>
<i>Anormalidades .....</i>	<i>61</i>
<i>Integridad de Membrana.....</i>	<i>62</i>
PARAMETROS MICROSCOPICOS DE LAS MUESTRAS DEL GRUPO CONTROL Y GRUPO EXPERIMENTAL DESPUES DE 24 HORAS DE REFRIGERACION .....	62
<i>Motilidad Individual .....</i>	<i>63</i>
<i>Vitalidad.....</i>	<i>63</i>
<i>Integridad de Membrana.....</i>	<i>63</i>

<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>65</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>71</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>73</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>85</b>
TABLAS.....	85
GRAFICAS.....	91
PREPARACION DEL DILUYENTE .....	95
FIGURAS COMPLEMENTARIAS .....	100
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>109</b>
<b>APÉNDICE 1.</b> ESQUEMA REPRESENTATIVO DE VAGINA ARTIFICIAL.....	109
<b>APÉNDICE 2.</b> VALORES NORMALES DE LOS PARAMETROS ESPERMATICOS SEGUN LOS CRITERIOS DEL LABORATORIO DE PROCESAMIENTO DE SEMEN DEL BANCO NACIONAL DE SEMEN DE LA UNALM. ....	110
<b>APÉNDICE 3.</b> CONCENTRACION DEL SEMEN DE CARNERO VALORADO POR SU ASPECTO. ....	111
<b>APÉNDICE 4.</b> VALORACION DE LA MOTILIDAD EN MASA MICROSCOPICA. PARA SER ACEPTABLE, UNA MUESTRA DE SEMEN DEBE MOSTRAR POR LO MENOS, UN MODELO DE ONDAS TIPO TRES.....	112
<b>APÉNDICE 5.</b> DIFERENTES GRADOS DE REACCION EN ESPERMATOZOIDES EXPUESTOS AL TEST HIPOSMOTICO. A: ESPERMATOZOIDES CON MEMBRANA ALTERADA, DAÑADA. B, C, D, E, F Y G. ESPERMATOZOIDES CON INTEGRIDAD FUNCIONAL DE MEMBRANA INTACTA.....	113
<b>APÉNDICE 6.</b> LA CAPACITACION ESPERMATICA SE CORRELACIONA A CAMBIOS CINETICOS Y ESTRUCTURALES CONOCIDOS COMO HIPERACTIVACION (HA) Y REACCION ACROSOMAL (RA), RESPECTIVAMENTE. LA FINALIDAD FINAL ES LA FECUNDACION. LOS ESPERMATOZOIDES QUE NO ALCANZARON A FECUNDAR, MORIRAN Y SERAN REABSORBIDOS.....	114
<b>APÉNDICE 7.</b> LOS PASOS DE LA TECNICA DE GRADIENTE DE DENSIDAD CON OVIPURE™.....	115
<b>APÉNDICE 8.</b> ESQUEMA DEL SISTEMA PARA EL LLENADO DE PAJILLAS .....	116
<b>APÉNDICE 9.</b> SELLADO DE PAJILLAS.....	117
<b>APÉNDICE 10.</b> COMPOSICION DEL TRILADYL® .....	118

## RESUMEN

La finalidad del presente estudio fue evaluar en 2 tiempos la calidad espermática de muestras de semen de ovino tratadas por la técnica de gradiente de densidad con respecto a muestras no tratadas. Se utilizó un total de 102 eyaculados de carnero que presentaron en promedio un volumen de  $1.12 \pm 0.34$  ml, color blanquecino, aspecto cremoso, pH de  $6.73 \pm 0.25$ , concentración inicial de  $3.54 \times 10^9 \pm 5.30 \times 10^8$  esp/ml y motilidad masal alrededor del grado 4. Posteriormente, cada eyaculado se dividió en un grupo control y experimental de volúmenes iguales. El semen del grupo control fue diluido con Triladyl® y el experimental, tratado con la técnica de gradiente de densidad. La tasa de recuperación espermática después del tratamiento fue del  $31.50 \pm 10.89\%$ . Se encontró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la motilidad individual progresiva, el porcentaje de espermatozoides vivos y de espermatozoides con membrana intacta en las muestras tratadas con respecto al grupo control ( $92.07 \pm 1.81\%$  vs.  $85.74 \pm 1.75\%$ ,  $78.42 \pm 5.13\%$  vs.  $75.19 \pm 4.59\%$ ,  $78.55 \pm 4.34\%$  vs.  $73.37 \pm 4.48\%$ , respectivamente); así como una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de espermatozoides anormales en las muestras del grupo experimental con respecto al grupo control ( $8.41 \pm 1.33\%$  vs.  $9.94 \pm 1.73\%$ ). El resto de muestras de ambos grupos fue distribuido en pajillas de 0.25 ml y enfriadas hasta alcanzar los  $5^{\circ}\text{C}$  para su refrigeración por 24 horas. Las muestras tratadas con gradiente de densidad presentaron un aumento significativos ( $p < 0.05$ ), con respecto al grupo control, en motilidad individual progresiva, el porcentaje de espermatozoides vivos y el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta ( $86.94 \pm 3.14\%$  vs.  $82.44 \pm 2.26\%$ ,  $71.24 \pm 4.11\%$  vs.  $68.82 \pm 4.15\%$ ,  $70.87 \pm 3.11\%$  vs.  $67.98 \pm 4.42\%$ , respectivamente). En conclusión, la técnica de gradiente favoreció la obtención de un mayor número de espermatozoides vivos, de mejor motilidad y con membrana intacta, así como la disminución del número de espermatozoides anormales tanto en muestras frescas como refrigeradas.

**Palabras Clave:** Semen de Carnero, Espermatozoides, Calidad seminal, Técnica de gradiente de densidad



## ABSTRACT

The purpose of the present study was to assess at 2 evaluation times the sperm quality from ram semen treated with the density gradient technique and to compare it against non-treated ram semen. A total of 102 ejaculates were evaluated. The mean macroscopic parameters were: volume of  $1.12 \pm 0.34$  ml, creamy white color, creamy-dense appearance, pH of  $6.73 \pm 0.25$ , initial concentration of  $3.54 \times 10^9 \pm 5.30 \times 10^8$  spz/ml and mass motility around grade 4. Then, each ejaculate was divided into two equal volume groups: the control and experimental group. For the control group, the sample was diluted in Triladyl®. The experimental group was treated with the density gradient technique. The recovery rate after treatment was  $31.50 \pm 10.89\%$ . The results showed that, at zero hour, samples treated undergo a significant increase ( $p < 0.05$ ), compared with the control group, in individual progressive motility, percentage of living spermatozoa and the percentage of spermatozoa with intact membrane ( $92.07 \pm 1.81\%$  vs.  $85.74 \pm 1.75\%$ ,  $78.42 \pm 5.13\%$  vs.  $75.19 \pm 4.59\%$ ,  $78.55 \pm 4.34\%$  vs.  $73.37 \pm 4.48\%$ , respectively). There was also a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the percentage of abnormal in samples from the experimental group compared to control group spermatozoa ( $8.41 \pm 1.33\%$  vs.  $9.94 \pm 1.73\%$ ). The remaining samples, from both the control and experimental group, were distributed in 0.25 ml straws and cooled to  $5^\circ\text{C}$  for 24 hours refrigeration. Then, the samples were evaluated. After 24 hours at  $5^\circ\text{C}$ , the samples treated with the density gradient technique showed significantly greater values ( $p < 0.05$ ), compared with the control group, in individual progressive motility, percentage of living spermatozoa and the percentage of spermatozoa with intact membrane ( $86.94 \pm 3.14\%$  vs.  $82.44 \pm 2.26\%$ ,  $71.24 \pm 4.11\%$  vs.  $68.82 \pm 4.15\%$ ,  $70.87 \pm 3.11\%$  vs.  $67.98 \pm 4.42\%$ , respectively). In conclusion, in the present study, the density gradient technique allowed to obtain better a greater number of living spermatozoa with better motility, intact membrane and with lower abnormalities in fresh and refrigerated samples.

**Key Words:** *Ram Semen, Spermatozoa, Sperm quality, Density gradient technique*

# INTRODUCCIÓN

La crianza de ovinos se encuentra mayormente en manos de pequeños reproductores por lo que el uso de tecnología reproductiva es reducido. Esto genera como resultado el deterioro de los productos finales derivados de ovino como son la lana, carne y leche. Sin embargo, hoy en día se implementan cada vez más, técnicas que permiten producir cambios significativos en la productividad de la progenie.

Una de estas técnicas es la Inseminación Artificial (IA), herramienta importante en la producción ganadera, que permite mejorar la calidad genética de la descendencia al seleccionar progenitores con características fenotípicas y genotípicas deseadas. Es así, que esta tecnología es ampliamente utilizada en centros de producción ganadera a nivel mundial. Por tanto, se hace necesario realizar estudios para evaluar, seleccionar y conservar adecuadamente las muestras de semen, asegurándose su calidad.

Los parámetros o indicadores más utilizados para evaluar la calidad de una muestra de semen son: motilidad, concentración espermática, número de espermatozoides vivos, integridad de la membrana espermática y porcentaje de anormalidades. Otros indicadores son la integridad del acrosoma y el grado de fragmentación del ADN

En los programas de IA, algunos machos de alto valor genético tienen eyaculados de baja calidad seminal. En lugar de ser descartados, hay ocasiones donde estos eyaculados son utilizados en el proceso de inseminación afectando negativamente a la progenie y las tasas de preñez, generando pérdidas económicas a los ganaderos ya que la progenie obtenida no siempre presenta las características deseadas o se ven obligados a repetir el proceso de inseminación debido a la disminución de las tasas de preñez. La situación se complica aún más cuando los ganaderos se ven en la necesidad de utilizar muestras refrigeradas o congeladas debido a que hay disminución en la calidad seminal si es que no se trata la muestra con el cuidado respectivo. Por ello, con el fin de seleccionar las subpoblaciones de

espermatozoides de mejor calidad y descartar a los espermatozoides muertos, se llevan a cabo técnicas de selección espermática, como: la técnica de lavado, la de gradientes de densidad, migración (*swim up*, *swim down*), filtración (fibra de vidrio), entre otras.

Las técnicas mencionadas presentan ventajas y desventajas dependiendo del uso que se quiera dar a la muestra. Por ejemplo, la técnica de lavado se basa en la concentración de espermatozoides, pero no los separa del detritus, de células epiteliales ni de leucocitos, por lo que esta técnica no es ideal si queremos asegurarnos buenos resultados desde un comienzo. La técnica de filtración es utilizada cada vez menos, dejando así como técnicas más usadas a las de migración y las de gradiente de densidad.

La técnica a través de gradientes permite recuperar una mayor cantidad de subpoblaciones de espermatozoides con las mejores características de motilidad, descartando así, a los espermatozoides inmóviles, muertos, inmaduros, senescentes, así como también a células epiteliales y bacterias. También se sabe que esta técnica presenta menor contaminación de plasma seminal, hecho que está asociado al aumento de la tasa de fecundación tanto por inseminación intra-uterina (IIU) como por fecundación *in vitro* (FIV). Esto no ocurre, por ejemplo, con la técnica de *swim up*. También, se ha observado que los espermatozoides seleccionados por gradientes de densidad son más estables en términos de fragmentación de ADN que los seleccionados por otras técnicas. Sin embargo, aun con todas las ventajas señaladas, el uso de técnicas de selección espermática no está muy difundido en el ámbito nacional de producción y mejoramiento ovino.

Por todo lo expuesto, es interesante evaluar nuevas tecnologías en la reproducción animal ovina, como la técnica de gradiente de densidad, como un método que permita la recuperación de espermatozoides de mejores características y así justificar su utilización en centros de reproducción animal, contribuyendo al desarrollo, productividad y mejoramiento integral de la ganadería ovina del país.

# ANTECEDENTES

## **Importancia del recurso Ovino**

El ovino es un animal del cual se obtiene materias primas de vital importancia económica como son la lana, carne, leche, piel y estiércol; además, hay otros derivados como el cebo que se puede utilizar para la producción de jabón (Bywater y Rowlands, 1970). Es por esto que la crianza de ovinos representa una fuente de trabajo y sustento para un importante sector de la población, especialmente en zonas donde el desarrollo de la agricultura se ve limitado debido a las severas condiciones geográficas, pero que son propicias para la ganadería ovina (FAO, 2006).

El Perú cuenta con una población de 14 822 226 de ovinos que se distribuyen a lo largo del territorio nacional (Díaz Ramírez, 2011). El 3.1% se registran en la Costa, el 96.2% en la Sierra y el 0.7% en la Selva. La región Puno es el primer productor de ovinos con el 26% de la población nacional, siendo Cusco el segundo productor con el 16%. Otros destacados productores se encuentran en Junín (9%), Pasco (7%), Huancavelica (7%) y Ayacucho (6%). Son estas regiones, que por presentar el mayor porcentaje en la población de ovinos, tienen la prioridad en la implementación de políticas para el sector productor ovino. Esto involucra aproximadamente a 1 500 000 productores de los cuales la mayoría radica en las zonas alto andinas del país (Díaz Ramírez, 2011).

La ganadería ovina se encuentra bajo una crianza extensiva liderada básicamente por empresas asociativas como son las SAIS (Sociedades Agrícolas de Interés Social), Cooperativas Agrarias de Producción, Empresas Rurales de Propiedad Social, medianos y pequeños productores (MINAG, 2008). Del total de productores dedicados a la crianza de ovinos, el 42.6% representa a los pequeños productores, el 7.8% a los medianos

productores, el 31.6% a las comunidades campesinas y el 1.8% restante, representa a las SAIS (MINAG, 2008).

En el Perú, la crianza ovina tiene importancia económica y social debido a que se producen anualmente 33 504 toneladas de carne, 11 614 toneladas de lana y 2 697 016 unidades de cuero, generándose ingresos económicos para la subsistencia de 535 mil familias campesinas (MINAG-DGIA, 2004.)

## **Fisiología Reproductiva del Ovino Macho**

La función testicular de los machos de cualquier especie puede definirse como la capacidad para producir gametos en cantidad y calidad adecuada para llevar a cabo la fertilización. Para esto, es necesario que el individuo produzca las hormonas necesarias que permitirán la maduración sexual del individuo (Sharpe, 1994).

La hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) es una hormona sintetizada en el hipotálamo y que actúa dentro de la fisiología del macho elevando las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) a nivel hipofisiario, las cuales a su vez, tienen un efecto directo sobre la espermatogénesis y la secreción de testosterona (Hafez et al., 2000) Es la LH la hormona encargada de estimular la producción de testosterona por las células de Leydig en el estroma testicular (Sutovsky y Manandhar, 2006). En bovinos de raza Holstein, dosis repetidas de GnRH causan un incremento en la producción seminal y las concentraciones de LH y Testosterona (Miller y Amman, 1986). Asimismo, en ovinos produce un incremento en la concentración de testosterona sérica y un incremento de la actividad sexual (Andaur et al., 2004). Los niveles elevados de testosterona inhiben la secreción de GnRH mediante un mecanismo denominado retroalimentación negativa (O' Donnell et al., 2006).

Los carneros alcanzan la madurez sexual en la pubertad, que se define como la edad en la cual los órganos reproductores del carnero se vuelven funcionales. Esto ocurre entre los 5 y

7 meses de edad y cuando el animal tiene entre el 50 - 60% de su peso maduro. La producción de esperma en carneros toma alrededor de 49 días (7 semanas). El tamaño testicular es un indicador de la habilidad del carnero de producir espermatozoides. Además, el palpar el epidídimo ayuda a determinar las reservas de esperma (Sheep Production Handbook, 2002).

En el caso del carnero, su capacidad para producir semen y realizar la monta se mantiene durante todo el año, apreciando fluctuaciones en la capacidad reproductiva (Boland et al., 1985). La calidad del semen es superior en otoño y el invierno y bajo en primavera y el verano, el volumen del eyaculado y la concentración espermática también disminuyen (Hafez, 1952). La actividad sexual en los carneros cambia con la estacionalidad, influenciada por el cambio en los periodos de luz, la edad y jerarquía social (Mickelsen et al., 1982, Schanbacher y Lunstra, 1976).

## **Inseminación Artificial en Ovinos**

La inseminación artificial (IA) es la práctica de manejo reproductivo más valiosa para el productor de ganado. Con este procedimiento se hace uso eficaz de la generosa dotación de espermatozoides disponibles de un macho, de manera que se incrementa considerablemente el progreso genético y se mejora en muchas ocasiones la eficiencia de la reproducción (Bearden y Fuquay, 1982).

Una de las grandes ventajas que presenta la IA es la utilización de sementales de gran valor genético para inseminar un número mayor de hembras que las que podrían cubrir por monta natural, debido a que, tras la dilución del semen, se consigue un aumento del volumen eyaculado. Esto da la facilidad de manejar dosis seminales en las cantidades que sean necesarias para asegurar la preñez. La fase inicial de un programa de inseminación artificial es la selección de los reproductores en base a su valor individual, (características morfológicas, fisiológicas, edad, estado sanitario, aptitud dentro de la explotación (lechera o cárnica) y datos de producción de sus descendientes (Evans y Maxwell, 1990).

En ovino, la IA se realiza por vía laparoscópica en oveja sincronizadas con progesterona o progestágenos (Killeen y Caffrey, 1982). La técnica creada a principios de la década de los ochenta, determina porcentajes de preñez variables entre 30 y 65%, según la calidad espermática cuando se utiliza con semen congelado (Azzarini y Valledor, 1988; Tervit et al., 1994; Cueto y Gibons, 1996). Estos valores son inferiores y muy variables respecto a los obtenidos por vía intrauterina con semen fresco (75-85%) o refrigerado a 4-5° C (55-65%) (Maxwell et al., 1993; Fernández et al., 1998).

Los logros conseguidos con la IA en ganado ovino y los avances conseguidos en el caprino han animado a los ganaderos, especialmente a los del sector lechero, a ampliar sus perspectivas de futuro, viéndose en la imprescindible necesidad de implementar esta técnica para mejorar la producción individual de su ganado (Cortés Gallego, 1997).

## **Colección de Semen**

El uso de la vagina artificial se ha convertido en uno de los mejores métodos para la colección de semen en ovinos por su rapidez y limpieza, por no ser estresante para el animal y por proporcionar un semen de alta calidad. Este dispositivo es una imitación de la vagina de la oveja y que proporciona los estímulos térmicos (temperatura) y mecánicos (presión) adecuados para la erección del pene y la eyaculación. La calidad de semen obtenido depende de la frecuencia de colección, pero sobre todo, del estado del animal al momento de la colección (Evans y Maxwell, 1990).

La vagina artificial consta, normalmente, de un cilindro que puede ser de goma y es rígido de 12 a 15 cm de largo y alrededor de 5 cm de diámetro en el cual se hace un orificio provisto de un tapón de rosca (Apéndice 1). Por el centro del dispositivo se introducirá el agua caliente a 40-42 °C y aire para simular las condiciones de temperatura y presión adecuadas. Entre el tubo de la vagina y el agua caliente, debe existir un tubo de látex que sirve como funda para la vagina (Bearden y Fuquay, 1982).

Se utiliza una hembra para estimular la libido y la monta. El operador, situado al lado derecho de la hembra, coloca la vagina artificial en dicho flanco y la sujeta con la mano derecha, de tal forma que el extremo abierto quede mirando hacia el macho. La válvula de la vagina debe dirigirse hacia abajo con una inclinación de aproximadamente 45°, evitando el contacto con el carnero macho. En el momento del salto, se dirige con la mano izquierda el pene hacia el interior de la vagina artificial, procurando hacerlo siempre del prepucio para evitar la retracción del mismo. Cuando el pene entra en contacto con la superficie caliente de la vagina artificial, el semental da el característico "golpe de riñón" y eyacula dentro tubo colector (Evans y Maxwell, 1990).

Existen otras técnicas de colección de semen como la de electro eyaculación, que consiste en introducir un electrodo bipolar, a una longitud no mayor de 10cm, en el recto del macho. Se aplican estímulos eléctricos en serie y a intervalos de tiempo definidos consiguiendo la erección del pene y la posterior eyaculación. Toda la operación dura entre 10 y 15 minutos, con considerables variaciones individuales (Hafez, 2002).

## **Evaluación de las características de una muestra seminal**

La evaluación espermática nos permite estimar la fertilidad potencial de cualquier semental y consiste en la evaluación, en el laboratorio, de parámetros espermáticos que son indicadores de la calidad del semen del reproductor de interés (Sorensen, 1991).

Estos parámetros pueden ser de carácter macroscópico (color, aspecto, volumen, pH) ya que pueden ser evaluados a simple vista de la muestra seminal; y microscópicos (motilidad masal, motilidad individual, concentración espermática, anormalidades, integridad de membrana, vitalidad) que deben ser evaluados utilizando un microscopio (Aisen, 2004).

Los valores normales de los parámetros espermáticos considerados en una evaluación seminal se resumen en el Apéndice 2. Se toma por sentado que cualquier muestra seminal a utilizarse en un estudio experimental debe cumplir con los valores mencionados.



## **Color**

La cantidad de espermatozoides presentes en el eyaculado hace que la muestra tome una coloración blanquecina – amarillenta cuando la muestra es de buena calidad. Cuando es de baja calidad, es similar a la leche acuosa (Hafez, 1996). En este sentido puede admitirse una relación directa entre la intensidad del color y la riqueza espermática (Pérez y Pérez, 1985).

Un color rojizo indica la presencia de sangre, así como los colores grises o marrones indican contaminación o infección, debiéndose en estos casos, desechar el eyaculado y proceder a la revisión del carnero (Gibbons et al., 2004).

## **Aspecto**

El aspecto del semen depende de la relación de dos constituyentes: la concentración de espermatozoides y la calidad del plasma seminal. Las muestras de alta consistencia contienen más espermatozoides que las muestras más acuosas (Apéndice 3). El semen debe tener un aspecto cremoso - lechoso y uniforme (Evans y Maxwell, 1990).

## **Volumen**

Cuando la recolección se realiza con vagina artificial, normalmente se obtienen eyaculados de aproximadamente 1 ml. Este volumen, varía según la edad, tamaño, condición corporal del animal, frecuencia de colección y destreza del operador (Gibbons et al., 2004).

Los volúmenes de eyaculados pueden admitirse como normales cuando sus rangos van de 0.5 a 2.0 ml con una media de 0.8 ml. Se sabe, además, que las cópulas reiteradas a intervalos demasiado cortos disminuyen el volumen recolectado y, por el contrario, la excitación acentuada aumenta (Pérez y Pérez, 1985).

## **pH**

El valor del pH es el resultante de la neutralización entre las reacciones glandulares de acción tampón y la concentración iónica del material de las ampollas de Henle y del epidídimo. En ovinos, el pH tiende a la acidosis, fenómeno importante ya que en él radica su capacidad fecundante. La reacción alcalina es características de una escasa fertilidad y muchas veces va acompañada de necrospemia y de una disminución en la concentración espermática y motilidad (Evans y Maxwell, 1990).

En el carnero y en el macho cabrío, los valores de pH oscilan entre 6.2 – 7.3, llegando incluso a citarse como normal un pH de 7.5 (Pérez y Pérez, 1985). En el Perú, Ascue (1985), trabajando con muestras de ovinos de la sierra central, reportó un rango de pH de entre 6.3 y 6.8.

## **Motilidad Masal**

La motilidad masal valora la formación y progresión de ondas producidas por el desplazamiento de los espermatozoides. La onda de movimiento solo puede ser observada en especies de alta concentración espermática, como es el caso de pequeños rumiantes (Evans y Maxwell, 1990). Se determina mediante microscopía óptica a 100 aumentos (100x) utilizando una pequeña gota de semen puro colocada sobre un portaobjeto temperado a 37 °C. Su clasificación utiliza la escala descrita en el Apéndice 4 (Pérez y Pérez, 1985; Padrón et al., 1998).

## **Motilidad Individual**

Es una de las pruebas que se utiliza con mayor frecuencia para evaluar la calidad de semen diluido. En algunas especies, parece estar correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide. Si existe menos del 40% de espermatozoides con movimiento lineal progresivo, es menos probable que haya fertilidad. Debido a la influencia que tienen las

variaciones de temperatura sobre la motilidad espermática, las muestras deben ser evaluadas tan pronto sea posible (WHO, 1992).

La técnica consiste en la observación microscópica a 400 aumentos (400x) de una muestra de semen diluido en una lámina portaobjetos temperada. Se consideran espermatozoides móviles aquellos que aparecen activos y con movimiento progresivo. La motilidad individual es el porcentaje de espermatozoides móviles con respecto al total de espermatozoides visualizados (Sorensen, 1991; Arthur, 1991).

En el Perú, Quispe (1998), evaluando 3 tiempos de equilibrio (2, 10 y 18 horas) en semen de carneros, reportó motilidades de 78.3%, 73.5% y 71.6%, respectivamente, utilizando el dilutor Tris–yema de huevo. Con el dilutor leche–yema de huevo reportó motilidades de 78.3%, 75.0% y 73.3% a los mismos tiempos de equilibrio. Por su parte, Ramírez et al. (2001), trabajando con semen refrigerado, encontró que los porcentajes de motilidad individual fueron de  $85.2 \pm 4.33\%$  con dilutor Tris–Fructosa–Yema de huevo,  $84.2 \pm 1.44\%$  con dilutor Citrato–Glucosa–Yema de huevo y  $85.8 \pm 5.2\%$  con dilutor leche descremada. Observaron, también, que la motilidad disminuye al aumentar el tiempo de refrigeración a 5°C, obteniéndose valores de motilidad a las 48 horas post refrigeración de  $75.0 \pm 9.01\%$  con Tris–Fructosa–Yema de huevo,  $77.5 \pm 2.50\%$  con Citrato–Glucosa–Yema de huevo y de  $67.5 \pm 15.21\%$  con leche descremada (Ramírez et al. 2001).

## **Concentración espermática**

La concentración espermática está definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen, expresada normalmente en millones por ml de eyaculado (esp/ml). Los diferentes métodos utilizados para su cálculo varían en función de la rapidez y exactitud (Evans y Maxwell, 1990).

Son varios los métodos que permiten determinar la concentración espermática. Entre ellos, figuran el recuento de la cámara de Neubauer y el método del fotocolorímetro. Ambos métodos son precisos y, si bien el fotocolorímetro permite un recuento más rápido, su costo es más elevado que la cámara de Neubauer (Gibbons, 2004).

Debido a que se quiere aprovechar al máximo una muestra de semen de buena calidad, se procura dosificarlo (tener la cantidad óptima de espermatozoides en un volumen determinado) y así manejar varias muestras para inseminación. Por tanto, es necesario conocer el número de espermatozoides por mililitro de eyaculado ya que nos permitirá saber cuántas dosis se pueden preparar; en pocas palabras, cuántas veces puedo diluirlo (factor de dilución) (Evans y Maxwell, 1990).

Guillén (2001), evaluó las características seminales de carneros de la raza Blackbelly del INIA, obteniendo concentraciones de  $3.14 \times 10^9$  espermatozoides/ml. Así mismo, Huamán (2003), reportó concentraciones de 3.63, 3.316, 2.78 y  $2.67 \times 10^9$  esp/ml.

## **Morfología espermática**

La morfología espermática se refiere al estudio de la forma del espermatozoide y permite determinar las posibilidades que tiene una célula espermática para fertilizar. El objetivo de esta evaluación es eliminar aquellos espermatozoides no ideales para la reproducción (Madrid y Bohada, 1993). La presencia de altos porcentajes de formas anormales parece estar asociada con inmadurez sexual, procesos degenerativos y patologías (Ascue, 1985).

Las anomalías encontradas en los espermatozoides se clasifican en dos: anomalías primarias y secundarias. Las primeras ocurren durante el proceso de espermatogénesis y pueden ocurrir a nivel del acrosoma (pérdida del borde apical, con abultamiento, arrugado, incompleto, desdoblado), cabeza (piriforme, flagelado, lanceolado, irregular, angosta, cabeza doble, macrocéfalo, microcéfalo), cuello (fractura, retroacción, con presencia de gota citoplasmática) y cola (corta, doble, retorcida, con presencia de gota citoplasmática). Las anomalías secundarias ocurren durante el transporte de los espermatozoides desde el tubo seminífero y/o epidídimo hasta su salida por la uretra durante la eyaculación. En este tipo de anomalías tenemos cabezas sueltas, acrosoma desprendido, etc. (Evans y Maxwell, 1990).

La morfología espermática es una de las características más estudiadas en el análisis seminal (Madrid y Bohada, 1993). Su estudio ha utilizado tradicionalmente técnicas de

tinción entre las que destacan la eosina-nigrosina (Merino, 2003). La introducción de los sistemas de Análisis Espermáticos Asistidos por Computadora (CASA, por sus siglas en inglés), ha permitido realizar evaluaciones morfométricas objetivas y cuantitativas del semen de diversas especies (Casey et al. 1997).

Un eyaculado de carnero se considera normal cuando el porcentaje de formas anormales es inferior al 15%. Existen variaciones en la morfología espermática debido al estrés ambiental, factor individual, temperatura, estación del año, etc. (Gibbons, 2004). Merino (2003), trabajando con 3 carneros de 2 a 3 años de edad, reportó 12,8% de anormalidades. Así mismo, Brito et al. (2003), trabajando con el semen de carneros de las razas Rambouiller y Suffolk; y, utilizando frotis de semen teñido con los colorantes eosina y nigrosina, reportaron 15% de anormalidades.

## **Vitalidad**

La membrana celular de los espermatozoides representa una barrera al paso de tinciones al medio intracelular. Los espermatozoides vivos no dejan pasar ningún tipo de colorante a su medio intracelular, mientras que los muertos, los absorben. Este fenómeno biofísico permitió el desarrollo de técnicas orientadas a la diferenciación de espermatozoides vivos de muertos (Fernández et al. 1998).

Actualmente, existe toda una serie de técnicas destinadas a identificar espermatozoides vivos y muertos. Se han descritos numerosas tinciones basadas en la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática como por ejemplo la eosina-nigrosina (Colas, 1975) y azul de Tripán (Suttiyotin y Thwaites, 1992) de tal manera que si el espermatozoide está vivo, la membrana celular actúa como barrera impermeable impidiendo el paso del colorante a través de ella, permaneciendo la célula sin teñirse. Ozturkler et al. (2000), trabajando con 6 caneros de la raza Kivircik y utilizando una tinción a base de eosina y nigrosina, reportaron 77.45% de espermatozoides vivos en semen fresco.

## **Integridad de la membrana espermática**

Una de las propiedades bioquímicas más importantes de los espermatozoides es la capacidad de que las moléculas puedan ser transportadas a través de su membrana. Esto no solo es esencial para la motilidad espermática, sino también para la inducción de la reacción acrosómica y posiblemente otros eventos relacionados a la fertilización (Jeyendran et al., 1984).

La prueba de permeabilidad vía endosmosis o "*Hiposmotic-swelling test*" (HOST), consiste en colocar a los espermatozoides a un medio de presión hiposmótica más baja que la fisiológica, lo que causa la entrada de agua hacia el interior de la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo (Pérez-Llano et al. 1999). Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física funcionalmente dañada no experimentarían cambios en la forma del flagelo (Apéndice 5). Se considera endosmosis positiva cuando se aprecia como el flagelo del espermatozoide, en un medio hiposmótico (125mOsm/Kg), toma forma helicoidal y asciende dentro de la misma membrana celular. Esto se debe a un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimiento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen (Vazquez et al. 1997).

En condiciones fisiológicas normales, la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por tanto, la prueba hiposmótica es un indicador preciso porque permite distinguir el adecuado funcionamiento de la membrana plasmática (Tamuli y Watson, 1992).

Aisen (2004), indica que el porcentaje de endosmosis en semen fresco de ovino varía de 60% a 90% y en semen refrigerado es mayor al 60%. Además, sostiene que la endosmosis se correlaciona estrechamente con la fertilidad *in vitro*, siendo su valor para el ovino de 0.86.

En el Perú, Santiani et al. (2004), evaluaron un total de 16 muestras de semen puro de carneros en un medio hiposmótico (0.735g. de citrato de sodio dihidratado y 1.351g de fructosa en 100 ml de agua destilada) obteniendo respuestas de  $61.2 \pm 6.9\%$ ,  $97.7 \pm 1.0\%$  y 100% de espermatozoides con membrana intacta que reaccionaron positivo al HOST, para 30min, 60min y 120 min de tiempo de incubación, respectivamente. Sin embargo, la correlación con la motilidad espermática fue muy baja.

## **Diluyentes para semen**

Los diluyentes de semen permiten incrementar el volumen de los eyaculados para inseminar a un mayor número de hembras con un semen de alta calidad, que en el caso de monta natural, sería a una sola. Además, como el plasma seminal sólo otorga al espermatozoide una protección limitada contra los cambios bruscos de temperatura, el uso de diluyentes que contienen agentes protectores de la membrana celular durante el enfriamiento a 5°C (generalmente yema de huevo) y/o el congelamiento (generalmente glicerol) es de vital importancia. Los diluyentes seminales deben cubrir una serie de requisitos tales como pH, capacidad tampón, osmolaridad y fuerza iónica. Deben también contener una fuente que sirva de reserva para darle energía al espermatozoide, no deben deteriorarse durante el almacenamiento previo a su uso y, sobre todo, proporcionar a la célula espermática protección frente a efectos de baja temperatura (Cortés Gallego, 1997). La gran mayoría contiene tris(hidroximetil) aminometano (Tris) o citrato como buffers, glucosa o fructosa como fuente de energía y Penicilina y/o Estreptomicina como agentes anti microbianos (Bearden, 1980; D'Alessandro et al., 2001; Gibbons, 2004).

El uso de Tris en diluyentes para semen ovino fue descrito en algunas investigaciones a principio de los años setenta. Sus características principales son poseer una buena capacidad tampón, actividad diurética y osmótica, además de baja toxicidad en altas concentraciones. Existe una amplia gama de diluyentes desarrollados a través del tiempo, los cuales presentan diferentes composiciones y cualidades. De todos éstos, el diluyente Tris-glucosa-yema de huevo desarrollado por Salomon y Maxwell (2000), es hasta hoy el más recomendado para semen refrigerado y congelado de carnero. Hay diluyentes que se

utilizan para refrigerar, los cuales son soluciones acuosas tamponadas a las que se les añade una fuente de energía (glucosa, fructosa) y un crioprotector no penetrante, que es opcional dependiendo de la temperatura y tiempo de refrigeración (leche descremada, yema de huevo). Algunos diluyentes de refrigeración incorporan antioxidantes o agentes quelantes de manera experimental, observándose un aumento en el porcentaje de fertilización *in vitro* en los diluyentes que incorporan en su composición superoxidodismutasa (SOD) y catalasa (Hammerstedt, 1993).

Los diluyentes empleados en la conservación de células espermáticas deben cumplir una las siguientes condiciones mínimas (Paulenz et al. 2002):

Ser isotónico con el plasma seminal (320 mOsm/kg) cuando es utilizado en refrigeración e hiperosmótico (400 mOsm/Kg) en congelación.

Poseer un pK próximo a 7 y capacidad tampón con el fin de mantener el pH en la neutralidad, compensando la producción de ácido láctico durante la congelación.

Contener moléculas que protejan a los espermatozoides frente al frío. Estas se clasifican en función de su capacidad de atravesar la membrana plasmática en: sustancias crioprotectoras penetrantes y no penetrantes.

Contener en su constitución una fuente de energía, siendo la glucosa y fructosa las más utilizadas.

Estar libre de bacterias y contaminación, para lo cual debe contener antibióticos.

### **Triladyl®**

El diluyente Triladyl® es fabricado en Alemania por el laboratorio Minitube, es un concentrado para la preparación de un diluyente listo para el uso de un solo paso. Es uno de los diluyentes más utilizados para diluir y congelar semen de ovino en la actualidad (Carballo Guerrero, 2005).



Su composición está basada en Tris, agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructosa y por cada 100ml contiene los siguientes antibióticos: 5mg tilosina, 25mg gentamicina, 30mg espectinomicina y 15mg lincomicina.

Para su preparación se adicionan tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte del *Triladyl*®.

## **Capacitación Espermática**

En condiciones fisiológicas, los espermatozoides eyaculados de mamíferos no reúnen las condiciones adecuadas para fecundar el ovocito, debiendo experimentar una serie de cambios estructurales y fisiológicos antes de adquirir dicha capacidad. Este proceso ocurre *in vivo* en el tracto genital de la hembra y se conoce con el nombre de capacitación espermática (CE). Los cambios más importantes se dan a nivel de la membrana celular facilitando la penetración de las cubiertas del ovocito, a esto último se le denomina reacción acrosómica (RA). Además, el espermatozoide adquiere hipercinesis que es el batido vigoroso del flagelo y una mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza, características que definen lo que se conoce como hiperactivación (HA) (Langlais y Roberts, 1985; Parks y Ehrenwald, 1990) (Apéndice 6).

Es posible realizar la capacitación espermática *in vitro* utilizando medios que simulen las condiciones del tracto reproductor de la hembra. Sin embargo, se ha observado que la capacitación se realiza de manera más rápida *in vivo* que *in vitro*, posiblemente debido a las múltiples interacciones bioquímicas entre los espermatozoides y el tracto reproductor de la hembra (Lane et al. 1999).

## **Capacitación Espermática *in vivo***

Los tubos seminíferos dentro de los testículos son los encargados de la producción de los espermatozoides, los cuales pasan hacia la *rete testis* y después hacia los conductos eferentes que desembocan en la cabeza del epidídimo. La cabeza y el cuerpo del epidídimo

se encargan de iniciar la maduración, se adquiere la motilidad de los espermatozoides y en la cola se almacenan. Los espermatozoides pasan de la cola del epidídimo al conducto deferente, el cual actúa como pasaje de los mismos durante la eyaculación. Posteriormente, los espermatozoides siguen su recorrido por el ámpula del conducto deferente, por la uretra y posteriormente pasan por las glándulas bulbouretrales, las glándulas seminales y la próstata. Las glándulas seminales aportan plasma enriquecido con proteínas y carbohidratos y la próstata secreta un líquido viscoso que limpia y lubrica la uretra, a la vez que aumenta ligeramente el volumen del semen. Finalmente, los espermatozoides llegan al pene, siendo expulsados durante la eyaculación por la uretra peneana (Hafez, 2002).

En mamíferos, el semen fresco recién eyaculado es incapaz de fecundar al ovocito, adquiriendo esta competencia durante su recorrido dentro del aparato genital femenino; a este proceso se le denomina capacitación espermática (CE) (Austin, 1951; Chang, 1951; Langlais y Roberts, 1985; Parks y Ehrenwald, 1990). La CE permite al espermatozoide llegar a la zona pelúcida del ovocito donde este induce la reacción acrosómica y el espermatozoide, puede así, fecundar al ovocito (Cormier y Bailey; 2003).

Numerosos estudios han demostrado que el espermatozoide experimenta cambios estructurales y bioquímicos durante el proceso de la capacitación, como son cambios en la fluidez de la membrana (Harrison, 1996) incremento del calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) intracelular (Visconti et al., 1995), alcalinización citoplasmática (Parrish, 1989; Vredenburg-Wilberg y Parrish, 1995), activación de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y de  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  (Florman, 1994; Arnoult et al., 1996), cambio interno del pH y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Parrish et al., 1993). También se ha encontrado que, durante la capacitación espermática, hay un incremento en la fosforilación de proteínas tirosina quinasa, la cual está regulada vía AMP cíclico (cAMP) y el decremento de la relación colesterol: fosfolípidos en la membrana (Langlais y Roberts, 1985).

En el tracto reproductor femenino se encuentran lipoproteínas de alta densidad (HDL) localizadas en los folículos y en el fluido del oviducto (Brantmeier et al. 1987; Ehrenwald et al. 1990). Son estas lipoproteínas las que inducen la CE (Azzarini y Valledor, 1988). Ellas facilitan la salida de colesterol del espermatozoide lo cual ocurre durante las primeras etapas de la capacitación (Thérien et al. 1997). Se ha encontrado variación en la

concentración de HDL en los folículos y fluido oviductual durante el ciclo estral, siendo los niveles más altos durante el periodo de ovulación y los más bajos durante el resto del ciclo (Parks y Ehrenwald, 1990).

Lane et al. (1999), mencionan que la capacitación en bovinos comienza tan pronto los espermatozoides se mezclan con las secreciones de las vesículas seminales, las cuales producen las proteínas del plasma seminal bovino (BSP, por sus siglas en inglés). Estas inducen, inicialmente, la salida de colesterol del espermatozoide después de la interacción con los glicosaminoglicanos (GAGs) como la heparina o con las HDL en el oviducto.

### **Capacitación Espermática *in vitro***

Debido a la gran dificultad que presenta el estudio de la capacitación espermática de manera fisiológica en el tracto reproductor de la hembra, se ha conseguido inducir este proceso en el laboratorio a través del uso de medios de cultivo que simulan las condiciones del tracto reproductor femenino. A esto se le denomina capacitación *in vitro*.

Yanagimachi y Chang (1963) fueron los primeros en reportar que el espermatozoide maduro puede ser capacitado *in vitro*, siendo lo anterior de gran importancia, ya que el éxito de la fertilización *in vitro* depende de una adecuada capacitación del espermatozoide (Gadella et al., 2001).

Se han propuesto algunos sistemas para capacitar *in vitro* espermatozoides de carnero y de otras especies domésticas que utilizan diversas sustancias, siendo una de las más utilizadas la heparina (Merkies et al. 2000). Lo que se busca con estas sustancias es similitud con los inductores naturales de la capacitación presentes en el tracto genital de la hembra (Palma, 2001).

## Técnicas de Selección Espermática

La selección espermática es un mecanismo natural en todas las especies y está asociada al transporte de los espermatozoides en las vías del aparato reproductivo de la hembra. Constituye un proceso dinámico que busca mejorar la calidad del espermatozoide a fecundar al ovocito por medio de mecanismos físicos y químicos de selección, realizados en forma paulatina en los diferentes órganos reproductivos de la hembra. En este contexto, Nani y Jeyendran (2001), reportan que la mucosidad cervical permite el paso selectivo de espermatozoides móviles y con formas normales antes de que estos migren por la cervix.

Con el fin de descartar los espermatozoides muertos, elegir los espermatozoides con mayor motilidad progresiva y separarlos del líquido seminal y del diluyente; se llevan a cabo técnicas de selección espermática que permiten la recuperación y selección de espermatozoides móviles y de formas normales desde el eyaculado. Para ello, diferentes métodos de selección espermática han sido descritos en las diferentes especies, siendo los más utilizados: los lavados repetidos (Fukuda et al. 1990), *swim-up* (Parrish y Foote, 1987), el uso de gradientes (Bioelanski et al., 1992) y la filtración a través de fibra de vidrio (Stabbings y Wasik, 1991).

La técnica de *swim-up* fue desarrollada por Parrish et al. (1984) y se basa en la capacidad migratoria de los espermatozoides. Estos son incubados en el fondo de un tubo con medio de cultivo a 39°C por un periodo determinado, en el cual los espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea ascienden a través del medio. Así, el sobrenadante contiene la subpoblación de espermatozoides con mejores índices de motilidad (Cesari et al. 2006).

La técnica de selección espermática por gradientes de densidad selecciona células en base al principio de sedimentación. Con esta técnica, los espermatozoides presentan menos contaminación de plasma seminal respecto a los tratados con *swim up* (Shelden et al., 1988; Horvarh et al., 1989; Bjorndahl et al., 2005). Además, aumenta la concentración de espermatozoides móviles, los cuales están asociados al aumento a la tasa de fecundación

tanto en inseminación intrauterina (IIU) como en fecundación in vitro (FIV) (Van der Zwalm et al. 1991). La utilización de gradientes de densidad rinde buenas concentraciones de espermatozoides móviles, aún en caso de muestras oligo-astenozoospermicas. Además, con esta técnica, se ven espermatozoides de buena morfología, buen empaquetamiento de ADN, acrosoma intacto y con buena capacidad fecundante (Brandeis y Manuel, 1993; Prakash et al., 1998). Inicialmente, se utilizó el Percoll, partículas de sílica recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP), con el fin de separar el semen por centrifugación durante 30 a 40 minutos. Los espermatozoides con mayor motilidad quedarán suspendidos en un pellet, el que finalmente es extraído y lavado. Sin embargo, luego se cuestionó la esterilidad del Percoll y la posibilidad de que las partículas fueran irritantes a los tejidos cuando se utilizaba para (IIU). Por esta razón, se empezó a comercializar una preparación de partículas coloidales de sílica pero recubiertas con silano, en un medio isotónico tamponado, el cual ha demostrado bajos niveles de endotoxinas y cuya efectividad es comparable al Percoll (Munucey Berta, 2007). Existen distintas marcas de estas partículas coloidales tales como Isolate (Irvine Sc. Co.), SpermFilter (Cryos), Puresperm (Nidacon), Ovipure™ (Nidacon), Silselect (FertiPro), etc.

## **Técnicas de Selección por Gradientes de Densidad con Ovipure™**

Actualmente, está disponible un medio coloidal usado en la selección de espermatozoides de alta calidad en ovinos, comercialmente conocido como *Ovipure™*, el cual es fabricado por el Laboratorio Nidacon en Suiza (Khalifa et al., 2010).

Este medio está hecho a base de una solución iso-osmótica la cual contiene como coloide partículas de sílica con silano, formulado específicamente para uso con semen de ovino. El medio se basa en trisodio – citrato - dihidratado, fructosa y sodio-piruvato. La concentración de partículas de sílica cubiertas de silano en el medio coloidal está en una

escala del 80%. La osmolaridad media es de 300 mOsm/Kg y tiene un pH promedio de 6.8-7. El coloide es esterilizado mediante radiación gamma (Khalifa et al. 2010).

El número de estudios sobre el efecto de este coloide en gradientes de densidad en semen de ovino refrigerado y congelado es muy limitado y aún no se publican suficientes estudios evaluando el uso del mismo (Batista et al. 2011).

## **Refrigeración del Semen de Carnero**

El objeto de refrigerar el semen es el de reducir el metabolismo energético de los espermatozoides, prolongando así su viabilidad y capacidad fecundante en el tiempo. El semen de mamífero, en especial el de carnero y chivo, es sensible al enfriamiento rápido (*shock* frío), traduciéndose en un aumento del número de espermatozoides muertos, alteración de la distribución de lípidos de membrana y aumento del calcio intracelular. En caso de los espermatozoides de ovino, existe una distribución desigual de proteínas del citoesqueleto asociadas a la membrana, por lo que son más sensibles a los cambios de temperatura por refrigeración (Aisen, 2004).

Para la conservación *in vitro* del semen, hay que dar importancia especial a la forma que se efectúa el enfriamiento, el cual debe ser muy lento. Evans y Maxwell (1990) indicaron que el enfriamiento a 15°C y 5°C se debe realizar en un lapso de 1 a 1.5 horas y de 2 a 3 horas, respectivamente.

El método mayormente utilizado para conservar semen en forma líquida por períodos de tiempo mayores a 24 horas es mediante la reducción progresiva de la temperatura. La motilidad se detiene totalmente a los 5°C, pero se puede restituir si se eleva nuevamente la temperatura a los niveles normales, siempre y cuando no se hayan producido daños de tipo estructural causados por shock térmico (Vivianco, 1998). Las células deben ser protegidas contra las bajas temperaturas mediante la adición de compuestos orgánicos como la leche descremada o la yema de huevo (Vishwanathy Shannon, 2000) que aumentan

la resistencia de la membrana a los cambios de permeabilidad e impiden que los espermatozoides acumulen calcio al alterarse el sistema de intercambio iónico de la membrana (Bearden, 1980; Palomino et al., 2007).

Evaluaciones en el laboratorio han demostrado que el semen diluido y refrigerado a 5°C muestra una gran variabilidad en sobrevivencia y fertilidad en las siguientes 72 horas de conservación. Existen algunos diluyentes en los cuales los espermatozoides de carnero pueden conservarse a 4°C durante 8 a 15 días con una buena viabilidad y con fertilidad aceptable a los 8 días (Salomon y Maxwell, 2000) Así mismo, Paulenz et al. (2002), no observaron diferencia estadística en motilidad progresiva al monitorear semen diluido a 5°C durante 0, 6, 24 y 30 horas. Morrieret et al. (2002), obtuvieron resultados similares al probar la adición o no adición de glicerol en semen conservado a 5°C durante 0, 8, 16 y 24 horas. Ellos observaron que la adición del glicerol no afectaba la motilidad en los diferentes tiempos, manteniéndose esta ligeramente por debajo de la motilidad inicial ( $84 \pm 3.3\%$ ). Sin embargo, la conservación del semen a 5°C también puede acarrear consecuencias perjudiciales como la disminución del 40% de la actividad metabólica del  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  intracelular, lo cual provoca una marcada disfunción en el paso de algunos iones a través de la membrana celular, ocasionando una disminución en la sobrevivencia del espermatozoide (Vishwanathy Shannon 2000).

También, Bailey et al. (2002) demostraron que el proceso de refrigeración provoca un cambio estructural en la membrana plasmática del espermatozoide parecido a lo que sucede durante la capacitación. Así mismo, Fuller y Whittingham (1997), así como también Cormier et al. (1997), reportan que la capacitación puede ocurrir a los 5°C. Por otro lado, Salomón y Maxwell (2000) mencionan, que independientemente del diluyente, tasa de dilución, temperatura o condiciones de almacenaje; el deterioro del espermatozoide se debe al incremento en el tiempo de almacenaje y la reducción de su capacidad para controlar la entrada de iones calcio. Esto último está asociado con la capacitación, hiperactivación y reacción acrosómica. El descenso en fertilidad se considera entre un 10 y 30% por cada día transcurrido (Maxwell y Salomon, 1993; Bailey y Buhr, 1994; De Blas et al., 2002).

Para temas de fertilidad, Borque y Sánchez (1992) sostienen que para la inseminación con semen refrigerado por vía cervical se emplean dosis conteniendo 50 a  $200 \times 10^6$  esp/ml. Se sabe, además, que los porcentajes de fertilidad con semen refrigerado a 24, 48 y 72 horas son de 45-50, 25-30 y 15-20%, respectivamente. Esto en contraste con el porcentaje de fertilidad (75 a 80%) obtenido con semen fresco (Salomon y Maxwell, 2000).



# OBJETIVOS

## **Objetivo General**

Evaluar la calidad espermática de muestras de semen de ovino fresco y refrigerado por 24 horas seleccionados por gradiente de densidad.

## **Objetivos Específicos**

Analizar los parámetros espermáticos macroscópicos en muestras de semen fresco de ovinos.

Comparar los parámetros espermáticos microscópicos en muestras tratadas con gradientes de densidad y de muestras no tratadas a las cero horas de obtenidas.

Contrastar los parámetros espermáticos microscópicos entre muestras tratadas con gradientes de densidad y muestras no tratadas después de haber sido refrigeradas a 5°C por 24 horas.

# HIPÓTESIS

El semen ovino tratado por la técnica de gradiente de densidad presenta parámetros espermáticos de mejor calidad con respecto al semen no tratado.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Lugar de Estudio

El presente estudio se llevó a cabo en las instalaciones del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria la Molina, ubicado en el distrito de La Molina, provincia de Lima, departamento de Lima. Las coordenadas de esta institución son 12° 05' latitud sur y 76° 57' longitud oeste. La altitud es de 243.7 metros sobre el nivel del mar (msnm). La temperatura máxima y mínima anual promedio es 28.7°C y 14.6°C, respectivamente. La precipitación media anual es de 60 mm (Observatorio Meteorológico Alexander Von Humboldt – Universidad Nacional Agraria La Molina, 2006).

## Animales

Los animales utilizados fueron tres carneros adultos de 2 a 3 años de edad de la raza *Assaf x Corriedale* pertenecientes al Banco Nacional de Semen de la Universidad Agraria La Molina. Los animales se mantuvieron bajo un mismo régimen de alimentación, manejo y cuidado sanitario. Se utilizó una oveja de la raza *Assaf x Corriedale* como monta simulada.

Los animales presentaron un peso promedio de 80 kg y fueron alimentados con forraje verde picado, maíz chala picado y un suplementado concentrado para cubrir los requerimientos nutricionales de los animales. El reparto del forraje fue dos veces al día y el concentrado se proporcionó en las mañanas. Contaron con agua *ad libitum*.

Los carneros se mantuvieron juntos en un corral de 5m<sup>2</sup> durante la noche y sueltos en potreros con pastos cultivados durante el día. La hembra contó con un corral aislado. El tiempo promedio de permanencia de los animales bajo estas condiciones fue de 32 semanas: 8 semanas para el adiestramiento de los animales (mayo-junio del 2012) y 24 semanas para la parte experimental (julio – diciembre del 2012).

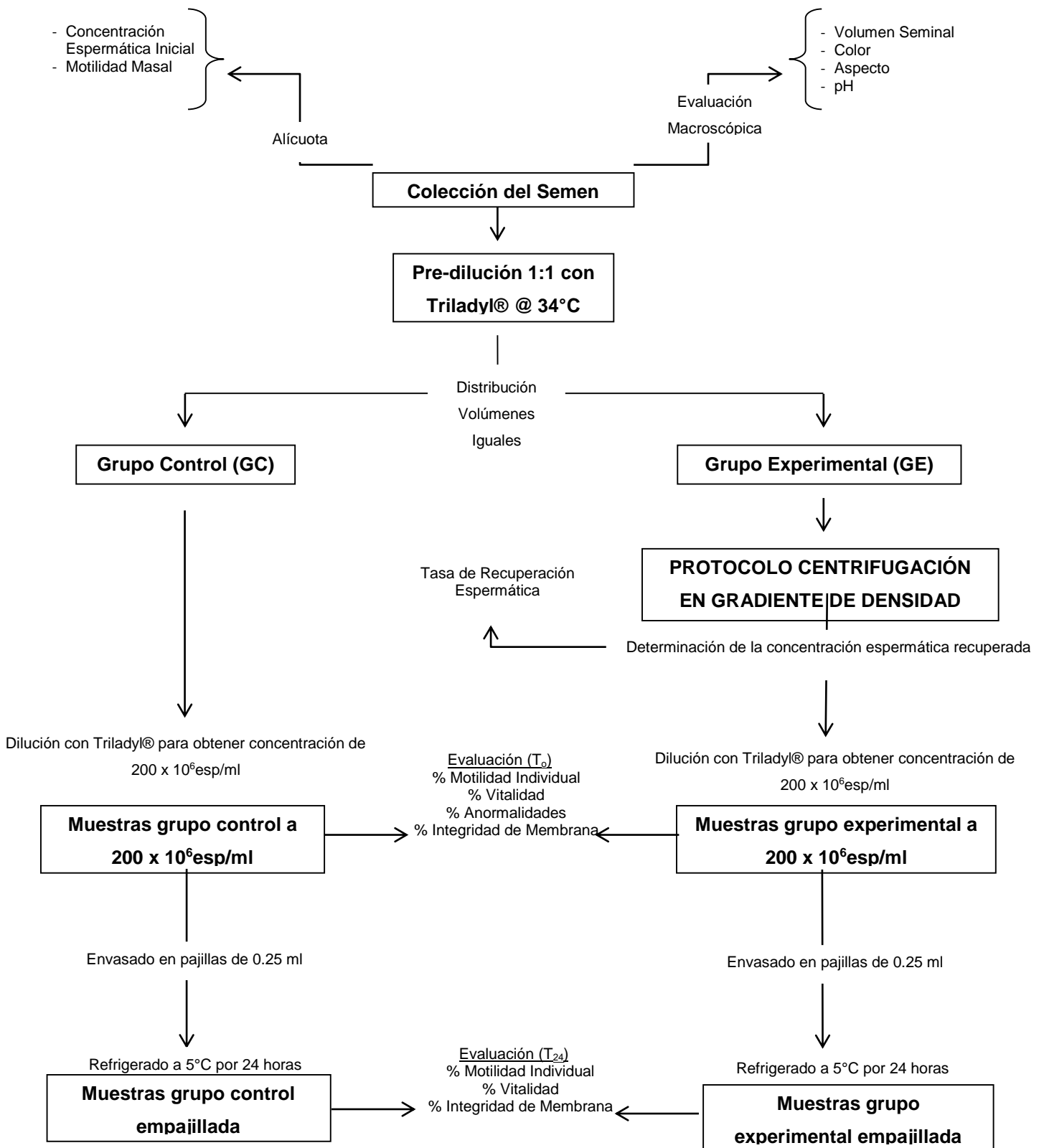
## **Diseño Procedimental**

El diseño procedimental del presente trabajo puede resumirse en los siguientes puntos:

- Colección y toma de muestra.
- Evaluación macroscópica.
- Determinación de la concentración espermática inicial y motilidad masal.
- Preparación del diluyente y pre-dilución.
- División de los grupos de estudio: control y experimental.
- Aplicación de la técnica de gradiente de densidad
- Determinación de la tasa de recuperación espermática.
- Dilución de las muestras de ambos grupos a la concentración deseada.
- Evaluación microscópica en tiempo cero.
- Empajillado de muestras.
- Refrigeración.
- Evaluación microscópica de las muestras refrigeradas por 24 horas.

A continuación, se presenta un esquema que detalla la secuencia en la que se trabajaron los puntos mencionados.

## Esquema General del Diseño Procedimental



## **Colección y toma de muestra**

Los tres carneros pasaron por una etapa de adiestramiento de dos meses, con el fin de que se adecúen al método de obtención de semen escogido para el presente estudio. Una vez terminada esta etapa, se procedió a coleccionar las muestras que se utilizaron para la parte experimental.

La toma de muestras del semen de carnero se realizó en el brete de colección ubicado en las cercanías del laboratorio de Procesamiento de Semen, utilizando para ello, el método de vagina artificial y una hembra sujeta a un brete de la siguiente manera:

Los carneros fueron trasladados desde su corral al área de extracción de semen, se les limpió con cuidado el prepucio y se permitió que efectúen montas falsas sobre la oveja para estimular su libido.

Una vez obtenida la muestra, el tubo colector fue retirado de la vagina artificial y protegido de los rayos solares con una funda.

La frecuencia de colección fue una vez por semana, obteniéndose dos eyaculados por cada carnero.

El intervalo de tiempo entre la toma de la primera y segunda muestra para cada carnero fue de 15 minutos.

Para la etapa experimental, se consideraron solamente muestras de semen que cumplieran con los valores normales de los parámetros espermáticos según los criterios del Laboratorio de Procesamiento de Semen del Banco Nacional de Semen de la UNALM (Apéndice 2).

Se utilizaron un total de 102 muestras que correspondieron a 34 eyaculados por carnero.

## **Evaluación Macroscópica**

Los parámetros seminales de volumen, aspecto, color y pH fueron evaluados en el área de colección del semen.

Volumen: Se evaluó visualmente utilizando el tubo colector de la vagina artificial. Para esto, el tubo presenta graduaciones en mililitros.

Color: Si el semen presentó una coloración blanquecina - amarillenta, se consideró de buena calidad a excelente. Si presentó una coloración blanquecina translúcida, se consideró de media a baja calidad.

Aspecto: Se midió por el mayor o menor grado de opacidad que presentó la muestra de semen variando desde cremosa hasta acuosa.

pH: Se determinó a través de una banda indicadora de pH colorimétrica cuyo rango era de 5.0 a 10.0.

## **Determinación de la concentración espermática y la motilidad masal**

Concentración espermática inicial: La concentración espermática (CE) se determinó mediante el uso de una cámara de Neubauer. Este dispositivo consiste en dos sub-cámaras, una superior y otra inferior. La muestra a evaluar fue diluida 1/400 (10µl de muestra con 3990µl de agua destilada) y homogenizada. Esta fue colocada por duplicado en las sub-

cámara con la ayuda de una micropipeta. Se dejó sedimentar por 10 minutos y se procedió a contabilizar los espermatozoides dentro de los campos definidos en las sub-cámaras (cuadrantes), mediante el uso de un microscopio óptico a 400x. Los cuadrantes observados fueron los de las esquinas y el centro. El número total de espermatozoides contados dentro de los 5 cuadrantes mencionados fue multiplicado por el factor de dilución y por una constante (Mesa Ortiz, 2012). La fórmula utilizada fue:

$$CE = NE \times NC \times FD \times Y$$

Donde:

CE = Concentración espermática (esp/ml)

NE = Número de espermatozoides contados

NC = Número de cuadrantes utilizados en el conteo (5 cuadrantes)

FD = Factor de Dilución (400)

Y = Constante ( $1 \times 10^4$ )

Se calculó el promedio de las lecturas de ambas sub-cámaras y la concentración final de espermatozoides fue expresada en millones por mililitro ( $\times 10^6$ esp/ml).

**Motilidad Masal:** Se evaluó mediante la valoración del nivel de formación y progresión de ondas de la masa espermática en movimiento en una escala de 0 a 5 (Apéndice 4). Se colocó una gota (10  $\mu$ l) de semen fresco en un portaobjeto temperado a 37°C y se observó utilizando un microscopio óptico a 100x.



## **Preparación del diluyente y pre-dilución**

### Preparación del diluyente Triladyl®

Para hacer las diluciones de las muestras, se utilizó el diluyente Triladyl® preparado de la siguiente manera:

#### Proporción 1:3:1

Una parte de concentrado de Triladyl® (20%)

Tres partes de agua destilada (60%)

Una parte de yema de huevo (20%)

#### Para 20ml de diluyente:

Concentrado de Triladyl® = 4ml

Agua destilada = 12ml

Yema de huevo = 4ml

Se preparó una solución madre en una probeta. Se agregó 4 ml del concentrado Triladyl® a 12 ml de agua destilada y se mezcló con una bagueta. El día en que se utilizaba la solución, se agregó 4 ml de yema de huevo a la solución madre y se mezcló hasta obtener una solución homogénea.

### Pre-dilución de las muestras

Las muestras recién colectadas fueron pre-diluidas en el mismo tubo colector con el diluyente Triladyl® en la misma proporción (1:1) del semen con la finalidad de evitar cambios bruscos de temperatura y presión osmótica. El diluyente se agregó por las paredes del tubo colector utilizando una pipeta estéril, homogenizando la muestra suavemente.

Las muestras pre-diluidas se mantuvieron en una bandeja con agua a 34°C de temperatura dentro de un contenedor térmico y llevadas al laboratorio.

### **División de los grupos de estudio: control y experimental**

Las muestras pre-diluidas fueron separadas en volúmenes iguales para obtener los dos grupos de estudio: el grupo control y el grupo experimental.

### **Aplicación de la técnica de gradiente de densidad**

Las muestras pre-diluidas 1:1 con diluyente Triladyl® y que fueron destinadas para el grupo experimental se trataron según el protocolo establecido por Nidacon (Khalifa et al., 2010) para el uso de su producto Ovipure™. Dicho protocolo indica que para una concentración espermática inicial mayor a  $2000 \times 10^6$  esp/ml, se debe hacer una dilución conformada por 1 parte de semen y 4 partes de diluyente. Como ya se había hecho una pre-dilución 1:1 de semen con Triladyl®, simplemente se completó las 3 partes faltantes de Triladyl®. Las muestras ya diluidas 1:4 fueron incubadas a temperatura del laboratorio (20°C) por 10 minutos antes de ser centrifugadas con Ovipure™.

Los pasos de la centrifugación con Ovipure™ (Apéndice 7) se detallan a continuación:

Se transfirió 4ml de Ovipure™ a un tubo cónico de centrifugación estéril.

Se depositó 1ml de la muestra diluida 1:4 en la parte superior de la columna.

Centrifugación a 300g por 20 minutos.

Se extrajo el sobrenadante, excepto 0.75ml de la parte más baja.

Se transfirió el sedimento (pellet) a un nuevo tubo cónico estéril.

Se agregó 5.25ml de medio de lavado al tubo con el sedimento (pellet).

Centrifugación a 500g por 10 minutos.

Se extrajo el sobrenadante.

El medio de lavado tuvo como finalidad eliminar restos de plasma seminal en el pellet. Su composición se basó en Tris, fructosa y ácido cítrico.

Después de realizada la centrifugación, se determinó el volumen del pellet y la concentración espermática. Para hallar esta última, se utilizó una cámara de Neubauer (letra a del punto 5.3.3). Para determinar el volumen aproximado del pellet, se utilizó una micropipeta de rango 100 – 1000µl.

## **Determinación de la tasa de recuperación espermática**

Se determinó la tasa de recuperación espermática de las muestras tratadas por la técnica de gradiente de densidad. Esta se halló mediante la siguiente fórmula:

$$Trecuperacion = \frac{Cf}{Co} \times 100\%$$

Donde:

Trecuperación = Tasa de recuperación espermática (%)

Cf = Concentración espermática del pellet (esp/ml)

Co = Concentración espermática inicial de la muestra (esp/ml)

## **Dilución de las muestras de ambos grupos a la concentración deseada**

Grupo control: En el laboratorio, se procedió a completar la dilución con Trilady1® para obtener una concentración de  $200 \times 10^6$  esp/ml en las muestras del grupo control. Se utilizó la fórmula:

$$V_{final\ dilucion} = \frac{V_{eyaculado} \times C1}{C2}$$

Donde:

$V_{\text{finaldilución}} = \text{Volumen de Triladyl® por agregar} + V_{\text{pre-dilución}}$

$V_{\text{pre-dilución}} = \text{Volumen del eyaculado} + \text{Volumen de Triladyl® agregado en pre-dilución}$

$V_{\text{eyaculado}} = \text{Volumen del eyaculado}$

$C1 = \text{Concentración espermática del eyaculado inicial (esp/ml)}$

$C2 = \text{Concentración espermática deseada (200 x 10}^6\text{esp/ml)}$

Grupo experimental: Una vez hallados el volumen y la concentración espermática del pellet, se procedió a re-suspenderlo en un determinado volumen de Triladyl® para obtener una concentración final de  $200 \times 10^6$  esp/ml. Para hacer la dilución, se utilizó la siguiente fórmula:

$$V_{\text{finaldilucion}} = \frac{V_{\text{pellet}} \times C1}{C2}$$

Donde:

$V_{\text{finaldilución}} = \text{Volumen de Triladyl® por agregar} + V_{\text{pellet}}$

$V_{\text{pellet}} = \text{Volumen del pellet}$

$C1 = \text{Concentración espermática del pellet (esp/ml)}$

$C2 = \text{Concentración espermática deseada (200 x 10}^6\text{esp/ml)}$

## Evaluaciones Microscópicas en tiempo cero

Motilidad Individual: Para su evaluación, se colocó 10 µl de muestra en un portaobjeto templado a 37°C en una platina térmica y se cubrió con una lámina cubreobjetos a igual temperatura. Inmediatamente, se observó al microscopio con un aumento de 400x. Se realizaron 3 conteos por muestra y en cada uno se contabilizaron un total de 200 espermatozoides. Luego, se halló el valor de la Motilidad Individual (MI) para cada uno de estos conteos. Los valores hallados se promediaron para hallar Motilidad Individual de una determinada muestra. Su valor se expresó en valores porcentuales.

$$MI = \frac{A + B}{A + B + C + D} \times 100\%$$

Donde:

MI = Motilidad Individual (%)

A = Motilidad Individual progresiva

B = Motilidad Individual lenta

C = Motilidad Individual *in situ*

D = Inmóviles

A + B + C + D = N° total de espermatozoides contabilizados (200 esp.)

Vitalidad: Para el conteo de los espermatozoides vivos se utilizó las tinciones supra vitales de Eosina y Nigrosina, ambas al 2%. Se colocó una gota de 10 µl de muestra a un extremo de una lámina porta objeto pre calentada a 37°C y dos gotas de 5 µl de cada colorante. En primer lugar, se homogenizó la gota de la muestra con la gota de Eosina durante 20 segundos para que el colorante penetre en los espermatozoides. Luego, la mezcla obtenida se combinó con la Nigrosina que sirvió de contraste. Se realizó el frotis y se dejó secar a temperatura ambiente. Inmediatamente, se observó al microscopio con un aumento de 400x. Se identificaron como células vivas aquellas que no absorbieron el colorante (no teñidas), mientras que las que sí lo hicieron (teñidas) fueron consideradas muertas.

Se realizaron 3 conteos por muestra y en cada uno se contabilizaron un total de 200 espermatozoides. Luego, se halló el valor de la Vitalidad (V) para cada uno de estos conteos. Los valores hallados se promediaron para hallar la Vitalidad de una determinada muestra. Su valor se expresó en valores porcentuales.

$$V = \frac{A}{A + B} \times 100\%$$

Donde:

V = Vitalidad (%)

A = Número de espermatozoides sin teñir

B = Número de espermatozoides teñidos

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (200 esp.)

Anormalidades Morfológicas: Para su evaluación, se utilizó la misma lámina utilizada para evaluar la Vitalidad y con la misma cantidad de aumentos, 400x. Se realizaron 3 conteos por muestra y en cada uno se contabilizaron un total de 200 espermatozoides. Luego, se halló el valor de Anormalidad (Anor) para cada uno de estos conteos. Los valores hallados se promediaron para hallar el valor de Anormalidades de una determinada muestra. Su valor se expresó en valores porcentuales.

$$Anor = \frac{A}{A + B} \times 100\%$$

Donde:

Anor = Anormalidades morfológicas (%)

A = Número de espermatozoides anormales

B = Número de espermatozoides normales

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (200 esp.)

Espermatozoides con Membrana Intacta: Se determinó mediante el test de endósmosis según la metodología de Pérez-Llano B et al. (1999). Se realizó una dilución 1:10 de la muestra (20 µl) en una solución hiposmótica de citrato de sodio y fructosa a 125 mOsm/litro (180 µl). Se homogenizó la mezcla y fue incubada en baño maría a 38°C durante 60 minutos. Para terminar la reacción, se añadió lentamente y por las paredes del tubo contenedor de la mezcla, 200 µl de metanol al 99% y se le dejó actuar por 5 minutos. Se tomó 10 µl de la nueva mezcla, se le colocó al extremo de una lámina porta objeto, se hizo un frotis en la lámina y se dejó secar a temperatura ambiente.



Se realizaron 3 conteos a 400x por muestra y en cada uno se contabilizaron un total de 200 espermatozoides. Se consideró endósmosis positiva (espermatozoides con membrana intacta) a aquellos en los que se apreció cualquiera de estas cinco características: flagelo torcionado helicoidalmente, flagelo enrollado, flagelo ascendido, cabeza hinchada o cola hinchada.

Se halló el valor de Integridad de Membrana (Int.Memb.) para cada uno de estos conteos. Los valores hallados se promediaron para hallar el valor de Integridad de Membrana de una determinada muestra. Su valor se expresó en valores porcentuales.

$$Int.Memb. = \frac{A}{A + B} \times 100\%$$

Donde:

Int.Memb, = Integridad de membrana (%)

A = Número de espermatozoides con endósmosis positiva

B = Número de espermatozoides con endósmosis negativa

A + B = N° total de espermatozoides contabilizados (200 esp.)

## **Preparación y Envasado en Pajillas**

Una vez que se terminó de evaluar los parámetros de las muestras del grupo control y experimental, se procedió a colocar las diluciones en pajillas (Cassou IMV Technologies,

Francia) de 0.25 ml, que son utilizadas para almacenar semen de ovino en refrigeración, congelación y para inseminación (FAO, 1991).

Como las muestras de ambos grupos fueron llevadas a una concentración de  $200 \times 10^6$  esp/ml, en cada pajilla hubo  $50 \times 10^6$  esp. A este valor se le denominó dosis.

Se indicó el grupo al que pertenecía cada pajilla y la fecha. En uno de sus extremos, tenían un tapón conformado por doble algodón que servía como límite de aspiración.

Las muestras de semen fueron colocadas en un contenedor especial que permitía que varias pajillas sean llenadas a la vez. Luego, las pajillas se ubicaban de manera perpendicular al contenedor de tal manera que un extremo entraba en contacto con la muestra y el otro con el peine de aspiración (Apéndice 8). Este peine era conectado a una bomba al vacío, que al ser activada, aspiraba la muestra llenando la pajilla.

Para el sellado de las pajillas, se les introdujo una aguja por un extremo para formar una burbuja de aire. Se vertió alcohol polivinílico en polvo sobre una superficie de vidrio (Apéndice 9) y las pajillas fueron golpeadas suavemente sobre esta superficie por el extremo donde se introdujo la aguja, permitiendo que el alcohol cubra el espacio vacío. Se procuró que el polvo no entre en contacto con la muestra.

Una vez verificado que todas las pajillas han sido selladas correctamente, se precedió a retirar el exceso de alcohol polivinílico con la ayuda de un papel toalla. Las pajillas selladas se colocaron horizontalmente en bandejas de agua a temperatura de laboratorio (20°C).

## **Refrigeración de las muestras**

Antes de refrigerar, se descendió la temperatura del agua de la bandeja (la cual contenía las pajillas) en forma gradual para evitar un *shock* térmico en los espermatozoides. Para ello, se colocó, lentamente, cubos de hielo en la bandeja procurando así que la temperatura

descendiese, aproximadamente, 2°C cada 3 minutos hasta alcanzar una temperatura final de 5°C. Para monitorear el descenso de la temperatura, se utilizó un termómetro de mercurio.

Una vez alcanzados los 5°C en la bandeja, las pajillas estuvieron listas para ser refrigeradas por 24 horas también a 5°C.

Transcurrido este tiempo, las pajillas fueron retiradas del refrigerador y agitadas para homogenizar la muestra. Se cortó la pajilla por el extremo sellado con alcohol polivinílico utilizando un cortador de pajillas; se desecharon las primeras 3 gotas de muestra; la cuarta gota se vertió en un portaobjeto templado a 37°C sobre una platina térmica y se procedió a la evaluación.

### **Evaluación microscópica de las muestras refrigeradas por 24 horas.**

Se evaluó la motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana de las muestras del grupo control y experimental que fueron refrigeradas por 24 horas a 5°C. La metodología de evaluación siguió los mismos procedimientos descritos en el punto 5.3.9.

### **Análisis Estadístico**

Las pruebas fueron realizadas utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 20. Se determinaron las medidas de tendencia central para todos los parámetros evaluados.

Se aplicó un test de normalidad para los datos numéricos.

Los datos porcentuales se transformaron según la siguiente fórmula para acercarlos a una distribución normal.

$$Y = \arcsin \sqrt{\frac{x}{100}}$$

Donde:

Y = Valor transformado

x = Valor porcentual

Se utilizó la prueba t-student para muestras pareadas para comparar los parámetros evaluados en las muestras correspondientes al grupo control y experimental antes de refrigerar ( $T_0$ ) y después de 24 horas de refrigeración ( $T_{24}$ ).

# RESULTADOS

## **Características Macroscópicas y Microscópicas de los eyaculados**

Para cada eyaculado obtenido de cada carnero, se evaluaron las características macroscópicas de volumen, pH, aspecto y color. También se determinó la concentración inicial y la motilidad masal.

En la Tabla 1 se detalla el número de eyaculados, promedio, desviación estándar y rango de los parámetros de volumen, pH, y concentración inicial.

Con respecto a la motilidad masal, en la Tabla 2 podemos ver la frecuencia con que las muestras fueron calificadas dentro de los valores establecidos según el Apéndice 4. Como se puede observar, el 100% de las muestras han sido calificadas dentro de los valores 3, 4, y 5.

El aspecto de las muestras fue cremoso y el color blanquecino - amarillento.

Los parámetros macroscópicos y microscópicos evaluados en la totalidad de las muestras obtenidas (102) estuvieron dentro de los valores de inclusión, permitiendo considerar dichas muestras como idóneas para su posterior uso dentro del presente trabajo.

## **Determinación de la tasa de recuperación espermática**

Se determinó la tasa de recuperación espermática de las muestras que fueron tratadas por la técnica de centrifugación en gradiente de densidad. La concentración espermática recuperada promedio de las muestras experimentales fue de  $1.09 \times 10^9 \pm 3.46 \times 10^8$  esp/ml.

En la Tabla 3 se puede observar la tasa de recuperación espermática promedio por carnero y por la totalidad de muestras. Se observó una recuperación cercana, en todos los carneros, al 30%.

## **Parámetros microscópicos de las muestras del grupo control y grupo experimental en tiempo cero**

Se evaluaron los parámetros microscópicos de motilidad individual, vitalidad, anomalías e integridad de membrana en las muestras del grupo control y el grupo experimental en el tiempo cero.

### **Motilidad Individual**

En la Tabla 4 y Gráfica 1 se presentan los valores promedio correspondientes al parámetro de motilidad individual para las muestras del grupo control y experimental obtenidas de cada carnero. Para cada carnero, se evaluaron 34 muestras. Se encontró un aumento en la motilidad individual ( $p < 0.05$ ) entre los valores obtenidos en el grupo experimental con respecto a los obtenidos en el grupo control para los 3 carneros.

Para la totalidad de muestras, la motilidad individual presentó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental ( $92.07 \pm 1.81\%$ ) con respecto a los del grupo control ( $85.74 \pm 1.75\%$ ).

## **Vitalidad**

Los valores promedio correspondientes al parámetro de vitalidad para las muestras del grupo control y experimental obtenidas de cada carnero se observan en la Tabla 5 y Gráfica 2. Para cada carnero, se evaluaron 34 muestras. Se encontró un aumento significativo en la vitalidad ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental con respecto a los obtenidos en el grupo control para los carneros I y III.

Para la totalidad de muestras, la vitalidad presentó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental ( $78.42 \pm 5.13\%$ ) con respecto a los del grupo control ( $75.19 \pm 4.58\%$ ).

## **Anormalidades**

En la Tabla 6 y Gráfica 3 se presentan los valores promedio correspondientes al parámetro de anomalías para las muestras del grupo control y experimental obtenidas de cada carnero. Para cada carnero, se evaluaron 34 muestras. Se encontró una disminución significativa en el porcentaje de anomalías ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el

grupo experimental con respecto a los obtenidos en el grupo control para los carneros I y III. Para el carnero II, la disminución no fue significativa ( $p=0.05$ ).

Para la totalidad de muestras, el porcentaje de anomalías presentó una disminución significativa ( $p<0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental ( $8.41 \pm 1.33\%$ ) con respecto a los del grupo control ( $9.94 \pm 1.73\%$ ).

## **Integridad de Membrana**

Se evaluaron las 34 muestras obtenidas de cada carnero. Se encontró un aumento en el porcentaje de integridad de membrana ( $p<0.05$ ) entre los valores obtenidos en el grupo experimental con respecto a los obtenidos en el grupo control para los 3 carneros, tal y como se puede observar en la Tabla 7 y Gráfica 4.

Para la totalidad de muestras, la integridad de membrana presentó un aumento significativo ( $p<0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental ( $78.55 \pm 4.34\%$ ) con respecto a los del grupo control ( $73.36 \pm 4.49\%$ ).

## **Parámetros microscópicos de las muestras del grupo control y grupo experimental después de 24 horas de refrigeración**

Se evaluaron los parámetros microscópicos de motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana en las muestras del grupo control y el grupo experimental después de que estas fueran empajilladas y refrigeradas por 24 horas ( $T_{24}$ ) a  $5^{\circ}\text{C}$ .



## **Motilidad Individual**

En la Tabla 8 y Gráfica 5 se presentan los valores promedio correspondientes al parámetro de motilidad individual para las muestras del grupo control y experimental obtenidas de cada carnero. Para cada carnero, se evaluaron 34 muestras. Se encontró un aumento en la motilidad individual ( $p < 0.05$ ) entre los valores obtenidos en el grupo experimental con respecto a los obtenidos en el grupo control para los 3 carneros.

Para la totalidad de muestras, la motilidad individual presentó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental ( $86.94 \pm 3.14\%$ ) con respecto a los del grupo control ( $82.43 \pm 2.25\%$ ).

## **Vitalidad**

Los valores promedio correspondientes al parámetro de vitalidad para las muestras del grupo control y experimental obtenidas de cada carnero se observan en la Tabla 9 y Gráfica 6. Para cada carnero, se evaluaron 34 muestras. Se encontró un aumento significativo en la Vitalidad ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental con respecto a los obtenidos en el grupo control para los 3 carneros.

Para la totalidad de muestras, la vitalidad presentó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental ( $70.82 \pm 4.32\%$ ) con respecto a los del grupo control ( $68.82 \pm 4.15\%$ ).

## **Integridad de Membrana**

Se evaluaron las 34 muestras obtenidas de cada carnero. Se encontró un aumento en el porcentaje de integridad de membrana ( $p < 0.05$ ) entre los valores obtenidos en el grupo

experimental con respecto a los obtenidos en el grupo control para los 3 carneros, tal y como se puede observar en la Tabla 10 y Gráfica 7.

Para la totalidad de muestras, la integridad de membrana presentó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los valores obtenidos en el grupo experimental ( $70.87 \pm 3.12\%$ ) con respecto a los del grupo control ( $67.98 \pm 4.42\%$ ).

# DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar y comparar la calidad espermática de muestras de semen de ovino tratadas por la técnica de gradiente de densidad con respecto a muestras no tratadas. La evaluación de los parámetros microscópicos se realizó en dos tiempos: cuando se terminó de tratar las muestras del grupo experimental con la técnica de gradiente de densidad (tiempo cero) y después de haberlas refrigerado por 24 horas a 5°C. Se hizo la evaluación de las muestras tratadas y no tratadas a la vez para ambos tiempos.

Como se muestra en la Tabla 1, los eyaculados colectados se caracterizan por presentar similitudes entre los carneros, especialmente en cuanto a volumen, pH y concentración espermática.

El volumen seminal de todas las muestras obtenidas se encontró dentro del rango de 0.5 y 2ml propuesto por Hafez (1996). Quispe (1998) reportó un volumen promedio de 1.09 ml en carneros de la misma raza que los utilizados en el presente estudio. Este valor es congruente con la media de la totalidad de eyaculados obtenidos en este trabajo. Además, obtuvo para las razas Blackbelly, Finnsheep y Hampshire, volúmenes de eyaculado de 1.46, 1.07 y 1.14 ml, respectivamente.

El pH obtenido en todas las muestras estuvo dentro de lo normal (Aisen, 2004), así como dentro de los valores reportados en ovinos de la sierra central del Perú (Ascue, 1985).

La concentración espermática se halló sobre los  $2000 \times 10^6$  esp/ml, que es lo considerado normal por Cole (1997). La media de la concentración espermática fue mayor a la reportada por Guillén (2001), quien obtuvo una media de  $3140 \times 10^6$  esp/ml; pero, menor a la reportada por Evans y Maxwell (1990), quien obtuvo valores entre  $3900 \times 10^6$  y  $6000 \times 10^6$  esp/ml. Esta último puede deberse a diferencias en la salud de los carneros utilizados, edad, nutrición, factores medioambientales, manejo, estación en la cual se hizo la colección, etc. (Melling y Alder, 2000).

El desarrollo de técnicas de inseminación artificial en ovinos se ha visto comprometida negativamente debido a que las tasas de preñez obtenidas son bajas, a pesar de que en la industria reproductiva ovina se preparan millones dosis para inseminación anualmente (Grasa, 2004). El procesamiento de semen para inseminación artificial en ganado consiste principalmente en tratar la muestra con un tipo de diluyente, sea para su criopreservación o su conservación líquida. Sin embargo, sólo el uso de diluyentes no permite garantizar una buena calidad seminal, por lo que se ha sugerido encontrar técnicas adecuadas capaces de seleccionar a los espermatozoides de mejores características (Morrel, 2006).

La técnica de gradiente de densidad se utiliza para separar diversos tipos celulares. Se basa en el principio que, bajo centrifugación, las células se movilizarán hacia algún punto de la gradiente donde la densidad sea similar a su densidad en particular (Morrel, 2006). Esta técnica permite seleccionar los diversos elementos que conforman una muestra seminal como lo son los leucocitos, debris celular, bacterias, espermatozoides, etc. La técnica mejora la calidad de las preparaciones seminales a utilizarse en una inseminación artificial. Permite separar a los espermatozoides con morfología normal y ADN intacto de la población total; además, remueve debris celular, especies reactivas de oxígeno, patógenos, etc. (Martí et al., 2006). El presente estudio ha demostrado que las muestras seminales obtenidas en carneros presentan mejoras en los parámetros seminales más importantes cuando estas han sido tratadas por la técnica de gradiente de densidad. Esto se observó tanto en muestras frescas como en muestras que fueron refrigeradas por 24 horas a 5°C.

La motilidad es el parámetro microscópico más estudiado y al que mayor importancia se presta durante las evaluaciones de calidad seminal en carneros (Guillén, 2001). Los valores obtenidos de motilidad individual en semen fresco (tiempo cero) en el presente estudio, son similares a los obtenidos por Cabrera y Pantoja (2008), quienes reportaron una motilidad promedio de  $86.0 \pm 2.4\%$  utilizando un diluyente similar. Sin embargo, otros autores han reportado valores de motilidad individual menores (78.93%) con el mismo diluyente (Brito et al., 2011).

La motilidad individual de las muestras tratadas y refrigeradas por 24 horas se ve incrementada con respecto al grupo control. El valor obtenido para este último coincide con lo reportado por Cabrera et al. (2010) que obtuvo una motilidad individual promedio de

84.55 ± 3.01% en carneros de la raza Assaf y de 83.75 ± 3.27% en carneros de la raza Blackbelly. Es importante resaltar, que tanto en el grupo control como en el experimental, la motilidad individual se mantuvo por encima del 80%, lo esperado en una muestra fresca.

La información de muestras tratadas por la técnica de gradiente de densidad y que luego fueron refrigeradas es muy escasa. Son más comunes los estudios donde las muestras son primero refrigeradas o congeladas y luego tratadas con la técnica de gradiente de densidad. Utilizando solo diluyentes se ha observado que la motilidad puede disminuir hasta el 60% (Cabrera et al. 2010) en muestras que fueron congeladas. Este valor es alto comparado con otros estudios donde obtuvieron valores de hasta 16% (Trejo et al., 1984; Mathur, 1989). Esta drástica disminución en los valores de motilidad individual ha provocado que se desarrollen técnicas que contrarresten este fenómeno. El uso de diluyentes mejorados ha sido una de ellas (Cabrera et al. 2010), pero la tendencia actual es el uso de técnicas de selección espermática (Munuce y Berta, 2007). Por ejemplo, García-Álvarez et al. (2010) encontraron que el parámetro de motilidad individual mejora significativamente utilizando la técnica de gradiente de densidad en semen de ovino congelado. La misma ha sido utilizada con bastante éxito en humanos (Morrel, 2006), perros (Dorado et al. 2011) y bovinos (Maxwell, 2007), etc.

Por lo expuesto sobre la motilidad individual, el presente estudio sugiere que la técnica de gradiente de densidad selecciona a aquellos espermatozoides con mejor motilidad en una muestra fresca. Además, después de 24 horas de refrigeración, esta diferencia se mantiene. Se sugiere que la técnica de gradiente de densidad selecciona a los espermatozoides que resisten mejor los cambios de temperatura producidos por la refrigeración. Es así que es válido pensar que, antes de someter a los espermatozoides a cualquier estrés térmico, es preferible seleccionar aquellos que podrán soportar mejor dichas condiciones. Esta simple diferencia podría llevar a mejoras en las tasas de fertilidad. También se sugiere que, idealmente, no se trabaje congelando las muestras seminales pues la motilidad se ve seriamente afectada. Esto concuerda con estudios que reportan resultados de fertilidad bajos e inconsistentes cuando se utilizó semen congelado (Azzarini y Valledor, 1988; Tervit et al., 1994; Cueto y Gibons, 1996).

La vitalidad, tanto a tiempo cero como después de 24 horas de refrigeración, se encontró aumentada en el grupo experimental con respecto al grupo control. Cabe resaltar que no se encontró diferencia significativa entre el grupo control y experimental para el Carnero II a tiempo cero, pero sí a las 24 horas,

Se obtuvo un porcentaje de integridad de membrana promedio de  $73.36 \pm 4.49$  % de las muestras de semen fresco diluido del grupo control. Este valor es mayor al obtenido por Aguado et al. (1998), que fue de 55.6% trabajando con carneros de la raza Manchega, pero menor a los obtenidos por Santiani et al. (2004) y Ávila (2009), que obtuvieron valores de 97.7%, y 86%, respectivamente. Además, el porcentaje de integridad de membrana de las muestras refrigeradas del grupo control fue mayor al obtenido por Aguado et al. (1998) (54.8%), pero menor al obtenido por Ávila (2009) (79.04%). Para ambas situaciones, las diferencias obtenidas pueden deberse a varios factores: raza del carnero utilizado, diluyente, método de evaluación, etc.

El porcentaje de anormalidades solo fue evaluado al tiempo cero debido a que los espermatozoides no cambian su estructura visible una vez fuera del aparato reproductor masculino. La técnica de gradiente permitió seleccionar una subpoblación de espermatozoides con un menor porcentaje de anormalidades. Esto se debe a que la mayoría de anormalidades, primarias o secundarias, afectan la motilidad individual (Bonet, 1995).

Las bases moleculares de la selección por gradiente de densidad también están siendo ampliamente estudiadas. Por ejemplo, conocer el estatus mitocondrial es crucial debido a la gran cantidad de energía que necesitan los espermatozoides para realizar su función fecundante (Kasai, 2002). Se sabe que el proceso de congelación y calentamiento de una muestra seminal reduce el número de células con un alto potencial de membrana mitocondrial (Marco-Jiménez, 2006). Sin embargo, se ha observado que en chivos el uso de un producto parecido al *Ovipure*, *CapriPure* (Nidacon), permitió encontrar un mayor porcentaje de espermatozoides con alto potencial de membrana (Batista et al., 2011). Se ha observado que la fluidez de membrana citoplasmática también se ve aumentada en aquellos espermatozoides seleccionados por gradiente. García-Álvarez et al. (2010) midieron los niveles del marcador de fluidez Merocyanina 540/YO-PRO-1, encontrando que este se

encuentra aumentado en las muestras tratadas. Observaron una correlación entre este marcador y la fertilidad in vivo ( $r=0.370$ ,  $p=0.019$ ) en carneros.

En cuanto a la integridad del ADN de los espermatozoides seleccionados por esta técnica, todo indica que presentan menor porcentaje de fragmentación. Sin embargo, no todos los estudios concluyen lo mismo (García-Álvarez et al., 2010) y en carneros la información es bastante limitada.

Estudios han demostrado que las tasas de fertilidad fueron mayores cuando se utilizó semen refrigerado en vez de semen congelado (Barbas et al., 2006). Los bajos resultados de fertilidad obtenidos después de la inseminación con semen congelado están relacionados con la reducida tasa de recuperación espermática que se consigue tras el proceso congelación-descongelación (Saacke, 1982). La fertilidad con semen congelado es de un 20% a un 2% inferior que con semen refrigerado (Fiser, 1987). Resultados similares se han referido para la raza Latxa, en la cual las tasas de gestación obtenidas tras la inseminación con semen congelado (32%) se sitúan un 18% por debajo de las aportadas al aplicar dosis refrigeradas (Lope-Brea, 1995). En otras experiencias realizadas por Abdelhakeam et al. (1991), estas diferencias de fertilidad entre semen congelado (33%) y refrigerado (83%) son del 50% en algunos casos.

Sin embargo, no hay muchos estudios en ovinos en donde el semen haya sido tratado con alguna técnica de selección espermática antes de ser refrigerado o congelado. Este hecho y el que el semen de ovino refrigerado tiene un tiempo de vida efectiva relativamente corto (24 horas) comparado con el de otras especies, hacen primordial que se realicen estudios en donde una muestra para inseminación artificial sea de la mejor calidad gracias a una buena técnica de selección espermática.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que la técnica de gradiente de densidad permite seleccionar subpoblaciones de espermatozoides con mejores parámetros microscópicos comparados con muestras no tratadas. Además, se ha observado que después de 24 horas, se conserva esta diferencia, haciendo de la muestra refrigerada y tratada por la técnica, una herramienta para mejorar las tasas de preñez en carneros.

Se necesitarían estudios de fertilidad para poder evaluar si con el semen tratado mediante el gradiente de densidad, se obtienen mejores tasas de preñez y si los resultados son iguales o mejores que utilizando semen congelado.



# CONCLUSIONES

Las muestras frescas tratadas por técnica de gradientes de densidad presentaron mejores valores de motilidad individual, vitalidad, integridad de membrana y reducido número de anormalidades.

Las muestras refrigeradas por 24 horas y que fueron previamente tratadas presentaron mejores valores de motilidad individual, vitalidad e integridad de membrana.

La técnica de gradiente de densidad ha demostrado ser una técnica óptima para la selección de espermatozoides con mejores parámetros microscópicos.

La técnica en mención podría ser utilizada en muestras frescas y muestras refrigeradas para mejorar las tasas de fertilidad en ovinos.

# RECOMENDACIONES

Se recomienda confirmar los resultados de este estudio utilizando un mayor número de carneros y en un periodo mayor de tiempo.

Es necesario hacer estudios de tasas de preñez con las muestras tratadas por gradientes de densidad tanto con muestras frescas como con muestras refrigeradas.

Posteriores estudios deben ir acompañados de evaluación de parámetros moleculares que ayuden a explicar qué otros parámetros se ven afectados (positiva o negativamente) utilizando la técnica de selección espermática por gradiente de densidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdelhakeam A, Graham EF, Vazquez IA. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Criobiology* 1991; 28 (1): 36 - 42.

Aisen EG. Recolección y evaluación de semen. En: Aisen EG, director. *Reproducción Ovina y Caprina*. 1era ed. Buenos Aires: Inter-Médica; 2004.

Aguado MJ, García-Cervigón M, Manso A, Pérez-Guzmán MD, Garde J, Montoro V. Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino Manchengo mantenido durante 24 horas en refrigeración. En: *XXIII Jornadas Científicas de la SEOC*. Vitoria; 1998. p. 521 - 524.

Andaur M, Santiani A, Sepúlveda N. Concentraciones plásmaticas de testosterona máxima en carneros con respuesta a la aplicación de GnRH. En: *II Reunión Anual de la Sociedad de Andrología y Gametología de Chile*. Temuco; 2004.

Arnoult C, Zeng Y, Florman HM. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. *J Cell Biol*. 1996; 134: 637 - 645.

Arthur G, Noakes D, Pearson H. *Reproducción y Obstetricia Veterinaria*. 6ta ed. Madrid: McGraw-Hill; 1991.

Ascue RS. Espermatograma en carneros reproductores de diferentes edades en la zona altoandina – Pasco, Perú (tesis de Licenciatura). Facultad de Biología. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Pasco, Perú. 1985

Austin CR. Observation on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Austr. J. Sc.* 1951; b4: 581 - 596.

Ávila Anglas M. Efecto de dos dilutores en la conservación de la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides en semen refrigerado de carnero (tesis de Licenciatura). Banco Nacional de Semen - Universidad Nacional Agraria La Molina. La Molina, Lima, Perú. 2009.

Azzarini M, Valledor F. Inseminación intrauterina o cervical con semen congelado o fresco en ovejas en celo natural. *Producción Ovina* 1998;1:1-8.

Bailey J, Morrier A, Cormier N. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in faro species. En *Amino Acids: Meat, Milk and More! Improving Animal Production with Reproductive Physiology*. Quebec; Canadian Society of Animal Science; 2002. p. 86 - 95.

Bailey JL, Buhr MM. Cryopreservation alters the  $Ca^{+2}$  flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 1994; 74: 45 - 51.

Batista AM, Silva SV, Soares AT, Guerra MMP. Comparison of CapriPure™ and Percoll® density gradients for sperm separation of frozen-thawed goat spermatozoa. *AnimReprod* 2011; 8: 81 - 84.

Bearden JH. *Reproducción Animal Aplicada*. 1era ed. México. El Manual Moderno; 1980.

Bearden, JH y Fuquay J. *Reproducción animal aplicada*. 1era ed. México. El Manual Moderno; 1982. p.135 - 250.

Bioelanski C, Dulrec C, Hare WCD. Failure to remove bovine diarrhea (BvDv) from bull Semen by swim-up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. *Reprod Dom Anim* 1992; 27: 303 - 306.

Bjorndahl L, Mohammadi M, Pourian M, Soderlund I, Kvist U. Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *J Androl* 2005; 26: 170 - 173.

Boland M, Al-Kamalia A, Crosby T, Haynes B, Howles C, Kelleher D and Gordona I. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams *Anim. Reprod. Sci.* 1985; 9: 241 - 252.

Bonet S, Briz E, Pinart E, Camps R y Fradera A. Determinación de la motilidad, la concentración y la morfología del espermatozoa eyaculado de un verraco estéril. *SCIENTIA gerundensis*.1995; 20: 29 - 37.

Borque M, Sánchez A. Variaciones estacionales de los niveles de fructosa, ácido cítrico y proteínas totales en eyaculados de moruecos de raza Manchega. *Invest Agr Prod SanidAnim.* 1992; 7 (39): 235 - 240.

Brandeis V, Manuel MT. Effect of four methods of sperm preparation on the motile concentration, morphology, and acrosome status of recovered sperm from normal semen samples. *J of Assisted Repro and Genet.* 1993; 10: 409 - 416.

Brantmeier SA, Grimmer RR, Ax RL. Concentrations of high density lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J. Dairy Sci.* 1987; 70: 2145 - 2149.

Brito LF, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP. Comparisson of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rateo. *Theriogenology.* 2003; 60 (8): 1539 - 1551.

Bywater B, Rowlands W. Cría, explotación y enfermedades de las ovejas. España: Acribia; 1970.

Cabrera P, Pantoja C. Influencia de los dilutores tris y ovine freezing sobre la integridad de la membrana citoplasmática durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ml. *Rev. Investig. Vet.* 2008; 19 (2): 152 - 159.

Cabrera P, Orellana J, Pantoja C. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. *Rev. Investig. Vet.* 2010; 21 (2): 154 - 160.

Carballo Guerrero D. Comparación de dos diluyentes comerciales para criopreservar semen de bovino bajo condiciones de campo en el trópico húmedo. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 2005.

Casey PJ, Gravance CG, Davis RO, Chabt DD, Liu IKM. 1997. Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology.* 1997; 47: 575 - 582.

Cesari A, Kaiser G, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés M, Alberio R. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology.* 2006; 66: 1185 - 1193.

Cole HH, Cupps P. *Reproduction in domestic animals.* 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia. Academic Press. 1997. p. 249 - 254.

Chang M. Fertilizing capacity of spermatozoa deposits into the fallopian tubes. *Nature.* 1951; 168: 697 - 698.

Colas G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal Reproduction Fertility.* 1997; 42: 277 - 285.

Cormier N, Bailey JL. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biol Reprod.* 2003; 69 (1): 177 - 185.

Cormier N, Sirard MA, Bailey JL. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by criopreservación. *J. Androl.* 1997; 18: 461 - 467.

Cortés Gallego S. Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino (tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense. Madrid, España. 1997.

Cueto M, Gibons A. Inseminación artificial intrauterina en ovejas Merino. En: XIV Reunión Latinoamericana de ProdAnim. *Rev Arg Prod Anim.* 1996; 15: 1008 - 1010.

D'Alessandro AG, Martemucci AG, Colonna MA, Bellitti A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology.* 2001; 55: 1159.

De Blas G, Michaut M, Treviño CL, Tomes CR, Yunes R, Darszon A, Mayorga LS. The intraacrosomal calcium pool plays a direct role in the acrosomalexocytosis. *J. Biol. Chem.* 2002; 51: 49326 - 49331.

Díaz Ramírez, Rosario Isabel. Sector ovinos en el Perú con perspectivas al 2015. Lima-Perú. Ministerio De Agricultura. 2011.

Dorado J, Alcaráz L, Duarte N, Portero JM, Acha D, Hidalgo M. Changes in the structures of motile sperm subpopulations in dog spermatozoa after both cryopreservation and centrifugation on PureSperm® gradient. *Anim Reprod Sci.* 2011; 125 (1-4): 211 - 8.

Ehrenwald E, Foote RH, Parks JE. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod. Dev.* 1990; 25: 195 - 204.

Evans G, Maxwell W. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. United Kingdom. Butterworth. 1990.

FAO. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. Rome. Animal Production and Health Paper N° 83; 1991.

FAO. El ganado y el medio ambiente. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor. Producción y Sanidad Animal. 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/environment.html>

Fernández Abella D, Villegas N, Bellagamba M. Comparación de la fertilidad obtenida con semen conservado a 5° C utilizando diferentes diluyentes y métodos de inseminación. *Producción Ovina*. 1998; 11: 51 - 62.

Brito FI, Valencia MJ, Balcázar SA, Angulo MR, Mejía VO. Congelación de semen de carnero en pellets con los diluyentes Tris-glucosa-yema de huevo o Lactosa-yema de huevo. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 2011; 8 (2).

Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull RW. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 1987; 28 (5): 599 - 607.

Florman HD. Sequential focal and global elevations of sperm intracellular Ca<sup>2+</sup> are initiated by zonapellucida during acrosomal exocytosis. *Dev Biol*. 1994; 165: 152 - 164.

Fukuda Y, Ichikawa M, Naito K, Toyoda Y. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. *Biol Reprod*. 1990; 42 (1): 114 - 119.

Fuller, S. J., y D. G. Wittingham. Capacitation-like changes occur in mouse spermatozoa cooled to low temperatures. *Mol. Reprod. Dev*. 1997; 46: 313 -324.

Gadella BM, Rath R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*. 2001; 68: 249 - 265.

García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Ramón M, del Olmo E, Montoro V, Dominguez-Rebolledo AE, Bisbal A, Jiménez-Rabadán P, Pérez-Guzmán MD, Soler AJ. Analysis of selected sperm by density gradient centrifugation might aid in the estimation of in vivo fertility of thawed ram spermatozoa. *Theriogenology*. 2010; 74 (6): 979 - 988.

Gibbons A, Cueto M, Wolff M, Arrigo J, García J. Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. *Comunicación técnica PA 200*. INTA. EEA Bariloche, Chile. 2004.

Grasa P, Pérez-PÉR, Baguena O, Forcada F, Abecia A, Cebrián- Pérez J, Muiño-Blanco T. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. *J Androl*. 2004; 25: 982 - 990.

Guillén H. Evaluación de las características seminales en carneros Blackbelly (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 2001.

Hafez E, Jainudeen M, Rosnina Y. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez E y Hafez B. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales Domésticos. 7° edición. México. Interamericana-McGraw Hill; 2002: 33 - 55.

Hafez, ESE. Studies on the breeding season and reproduction of the ewe. II. The breeding season on one locality. J. Agric. Sci. 1952; 42: 199 - 231.

Hafez ESE. Reproducción e Inseminación Artificial de Animales. 1° Edición. México. Interamericana-McGraw Hill; 1996.

Hafez ESE. Evaluación seminal. En: Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7° edición. México. Interamericana-McGraw Hill; 2002: 75 - 385.

Hammerstedt RH. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of effect a design of storage preservation systems. Reproduction and Fertility Development. 1993; 5: 675 - 690.

Harrison RA. Capacitation mechanisms and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. Reprod Fertil Dev. 1996; 8: 581 - 594.

Horvarh P, Bohrer M, Shelden R, Kemmann E. The relationship of sperm parameters to cycle fecundity insemination. Fertil Steril. 1998; 52 (2): 288 -294.

Huamán Fuertes. Fertilidad de carneros Blackbelly por monta natural e inseminación artificial con semen refrigerado (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 2003.

Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fertil. 1984; 70: 219 - 228.

Julián Garde Lope-Brea. Congelación de semen en la especie ovina: características biológicas de las dosis descongeladas. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Castilla – La Mancha. España. 1995.

Julián Garde Lope-Brea. Problemática de la inseminación artificial en la especie ovina. En: XIX Jornadas Científicas de la S.E.O.C. España. 1995.

Barbas JP, Serra C, Marques CC, Baptista MC, Mascarenhas RD, CavacoGonçalves S, Vasques MI, Horta AEM. Fertility in Saloia Sheep Breed after Cervical AI with Refrigerated and Frozen Semen: Ram Variation. Reproduction in Domestic Animals. 2006; 41 (4): 327.



Kasai T, Ogawa K, Mizuno K, Nagai S, Uchida Y, Ohta S, Fujie M, Suzuki K, Hirata S, Hoshi K. Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and fertility potential. *Asian J Androl.* 2002; 4: 97 -103.

Khalifa TAA, Lymberopoulis AG, Nilang AM. Development of an ovine selection (Ovipure™ – Nidacon) Kit. *Reproduction in Domestic Animals.* 2010; 45 (3): 92 - 93.

Killeen ID, Caffrey GJ, Holt N. **Fertility of ewes following intra-uterine insemination with the aid of a laparoscope.** In: *Proc. Aus. Soc. Reprod. Biol. Annu.* 1982; Conf. Sydney, N.S.W, Abstr. N°. 104.

Lane M, Thérien I, Moreau R, Manjunath P. Heparin and high- density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.* 1999; 60: 169 - 175.

Langlais J, Roberts KD. A molecular membrane model of sperm capacitation and the crosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 1985; 12: 183 - 224.

Levay PF, Fourie F, Bezuidenhout C, Koch. Effectiveness of various sperm processing methods in removing seminal plasma from insemination media. *Hum Reprod.* 1995; 10: 2056 - 2060.

Madrid MB, Bohada E. Características de un buen reproductor bovino. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Zulia Maracaibo, Venezuela. FONAIAP Divulga. N° 44. 1993.

Marco-Jiménez F, Viudes-de-Castro MP, Balasch S, Mocé E, Silvestre MA, Gomez EA, Vicente JS. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. *Cryobiology.* 2006; 52: 295 - 304.

Martí E, Pérez-PéR, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Comparative Study of Four Different Sperm Washing Methods Using Apoptotic Markers in Ram Spermatozoa. *J Androl.* 2006; 27 (6): 746 - 53.

Mathur AK, Srivastava RS, Ani LJ, Kalra DB. Pellet freezing of ram semen. *Indian J. Anim. Sci.* 1989; 59: 1529 - 1531.

Maxwell WM, Evans G, Rhodes SL, Hillard MA, Bindon BM. Fertility of superovulated ewes after uterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprd Fert Dev.* 1993; 5: 613 - 638.

Maxwell WM, Parrilla I, Caballero I, Garcia E, Roca J, Martinez EA, Vazquez JM, Rath D. Retained functional integrity of bull spermatozoa after double freezing and

thawing using PureSperm density gradient centrifugation. *Reprod Domest Anim.* 2007; 42 (5): 489 - 894.

Maxwell, WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: review. *Reprod. Fertil. Dev.* 1993; 5: 613 - 638.

Melling M, Alder M. *Práctica ovina y caprina.* Buenos Aires. Intermédica, 2000.

Merino GRA. Estudios preliminares en capacitación in-vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados (tesis de Licenciatura). Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Austral de Chile. Chile. 2003.

Merkies K, Larsson B, Zhang B, Buhr M, Rodriguez-Martinez H. Relationship Between Heparin Binding To Spermatozoa And The Fertility Of Dairy Bulls. *Theriogenology.* 2000; 54: 1249 - 1258.

Mesa Ortiz A. Motilidad Individual y Viabilidad de espermatozoides caprinos a diferentes temperaturas de mantenimiento en semen diluido (tesis de Licenciatura). Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 2012.

Mickelsen WD, Paisly LG, Dahmen JJ. Seasonal variation in scrotal circumference, sperm quality, and sexual ability in rams. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982; 181: 376 - 380.

Miller C, Amman, R. Effects of pulsatile injection of GnRH into 6-14 weeks olds Holstein BULLS. *J Anim Sci.* 1986; 62: 1332 - 1339.

MINAG. Boletín anual de información estadística. Lima, Perú. 2008.

MINAG-DGIA. Boletín anual de información estadística. Lima, Perú. 2004.

Morrel JW. Update on Semen Technologies for Animal Breeding. *Reprod Dom Anim.* 2006; 41: 63 - 67.

Morrier A, Castonguay F, Bailey JL. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 2002; 82: 347 - 356.

Mortimer D. Sperm transport in the female genital tract. En: Grudzinskas JG, Yovich JL. *Gametes - The spermatozoon.* Cambridge University Press; 1995. p. 157 - 174.

Munuce MJ, Berta CL. Técnicas de Selección Espermática. *Reproducción.* 2007; 22: 180 - 130.

Nani JM, Jeyendran RS. Sperm processing: glass wool column filtration. *Arch Androl.* 2001; 47 (1): 15 - 21.

- O' Donnell L, Meachem S, Stanton P, Mclachlan R. Endocrine regulation of spermatogenesis. 3° ed. St Louis, USA: Academic Press; 2006.
- American Sheep Industry Association, Inc. Sheep Production Handbook. 7° ed. USA: ADS/Nightwing Publishing; 2002.
- Observatorio Meteorológico Alexander Von Humboldt. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 2006.
- Padrón R, Fernández G, Gallardo M. Interpretación del análisis seminal. Rev Cubana Endocrinol. 1998; 9 (1): 81 - 90.
- Palma GA. Biotecnología de la reproducción. 1° ed. Argentina: Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); 2001. p. 246 - 248.
- Palomino JM, Cervantes M, Rodríguez A, Cisneros F, Huanca W. Efecto de dos dilutores y tiempo de refrigeración sobre la motilidad individual de semen refrigerado de caprinos. APPA – ALPA. Cuzco, Perú. 2007.
- Parks JE, Ehrenwald E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. En: Fertilization in Mammals Sereno Symp. Norwell, MA. 1990. p. 155 - 167.
- Parrish JJ, Foote RH. Quantification of bovine sperm separation by a swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. J Androl. 1987; 8 (4): 259 - 266.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either Swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. Theriogenology. 1995; 44: 859 - 869.
- Parrish JJ, Parrish JL, First NL. Effect of swim up separation and heparin pretreatment of frozen thawed spermatozoa on in vitro fertilization of bovine oocytes. Biol Reprod. 1984; 30 (1): 112.
- Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Handrow RR, Sims MM, First NL. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. Biol. Reprod. 1989; 40: 1020 - 1025.
- Parrish JJ, Vrendenburgh WL, Lavin CA. Increases in bovine sperm intracellular calcium (Cai) and pH (pHi) during capacitation. Biol Reprod. 1993; 48 (1): 106.
- Paulenz H, Söderquist R, Pérez-Pe, Andersen K. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. Theriogenology. 2002; 57: 823 - 836.

Pérez-Llano B, González JL, Clemente MJ, García-Casado P. El test de endosmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albeitar*. 1999; 30: 16 -17.

Pérez y Pérez F. *Reproducción Animal: Inseminación Artificial y Trasplante de Embriones*. Barcelona, España. Edit. Científico Médica; 1985.

Prakash P, Leykin L, Chen Z, Toth T, Sayegh R, Schiff I. Preparation by differential gradient centrifugation is better than swim-up in selecting sperm with normal morphology (strict criteria). *Fertil Steril*. 1998; 69: 722 - 726.

Quispe PE. Efecto de dos dilutores, tiempo de equilibrio y raza sobre la motilidad de semen descongelado de ovino (tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 1998

Ramírez C, Gallegos A, Gutiérrez R. Efecto de tres dilutores y diferentes tiempos de refrigeración en la motilidad individual y el pH del semen refrigerado en ovinos Blackbelly (tesis de Licenciatura). INIA. Lima, Perú. 2001

Rho GJ, Hahnel AC, Betteridge KJ. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology*. 2001; 56 (3): 503 - 516.

Saacke RG. Components of semen quality. *J Anim Sci*. 1982; 55 Suppl 2: 1-13.

Salamon S, Maxwell W. Storage of ram semen. *Anim Reprod. Sci*. 2002; 62: 77 - 111.

Santiani A, Sandoval R, Coronado L. Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hiposmótico. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 2004

Schanbacher BD, Lunstra DD. Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *J. Anim. Sci*. 1976; 43: 644 - 650.

Sharpe M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E, NEIL J. *The Physiology of Reproduction*. New York, USA: Raven Press Ltd, 1994. p. 1363 -1434.

Shelden R, Kemmann E, Bohrer M, Pasquale S. Multiple gestation is associated with the use of high sperm numbers in the intrauterine insemination specimen in women undergoing gonadotropin stimulation *Fertil Steril*. 1988; 49 (4): 607 - 610.

Sorensen A. Evaluación de la aptitud reproductiva. En: Sorensen A. *Reproducción animal, principios básicos y prácticos*. 1° ed. Argentina: McGraw-Hill; 1982. p. 124 - 143.

Stabbings B, Wasik CP. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization. *Theriogenology*. 1991; 35: 276.

Sutovsky P, Manandhar G. Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis. En: De Jonge C. and Barrat C. *The Sperm Cell*. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2006. p. 1-30.

Suttiyotin P, Thwaites CJ. Comparison of a swim-up technique with Hamilton Thorn Motility Analyser for measurement of sperm velocity and motility. *Reprod Fertil Dev*. 1992; 4 (2): 153 - 160.

Tamuli MK, Watson PF. Effects of temperature of incubation on the development of resistance to cold stress in boar spermatozoa incubated for up 24 hrs. *Proc. 12<sup>th</sup> ICAR Congress*. The Hague. 1992. p. 1484 - 1486.

Tervit HR, Gold PG, James RW, Frazer MD. The inseminations of sheep with fresh or frozen semen. *Proc N Soc Anim Prod*. 1994; 44: 11 - 13.

Thérien I, Soubeyrand S, Manjunath P. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. *Biol. Reprod*. 1997; 57: 1080 - 1088.

Trejo A, Soto R, Neria B, Peña M. Inseminación artificial en ovinos con semen congelado. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México*. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F. 1984. P. 322 - 324.

Van der Zwalm P, Bertin-Segal G, Geerts L, Debauche C, Schoysman R. Sperm morphology and IVF pregnancy rate: comparison between Percoll gradient centrifugation and swim-up procedures. *Hum Reprod*. 1001; 6 (3): 401 - 404.

Vazquez JM, Martinez EA, Martinez P, Garcia-Artiga C, Roca J. Hypoosmotic Swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology*. 1997; 47: 913 - 922.

Vivianco MW. Inseminación artificial en ovinos. *Memorias del Seminario Internacional Aplicaciones de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos*. Chapingo, México. 1988.

Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa, I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development*. 1995; 121: 1129 - 1137.

Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62: 23 - 53.

Vredenburg-Wilberg WL, Parrish JJ. Intracellular pH of bovine sperm increases during capacitation. *Mol Reprod Dev.* 1995; 40: 490 - 502.

WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3<sup>rd</sup>. Cambridge, UK: Ed. Cambridge; 1992.

**Yanagimachi R**, Chang MC. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature.* 1963; 200: 281 - 282.

Zhang XD, Chen MY, Gao Y, Han W, Liu DY, Huang GN. The effects of different sperm preparation methods and incubation time on the sperm DNA fragmentation. *Hum Fertil (Camb).* 2011; 14 (3): 187 - 91.

## ANEXOS

### Tablas

**Tabla 1.** El número de eyaculados evaluados por carnero fue de 34, haciendo un total de 102 muestras evaluadas. Los valores promedio de volumen, pH y concentración inicial se presentan junto a sus respectivas desviaciones estándar. Entre paréntesis se encuentran los valores mínimos y máximos de dichos parámetros.

	<b>Carnero I</b>	<b>Carnero II</b>	<b>Carnero III</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Número de eyaculados</b>	34	34	34	102
<b>Volumen (ml)</b>	1.14 ± 0.32 (0.5 – 1.8)	1.24 ± 0.35 (0.6 – 2.1)	0.97 ± 0.29 (0.6 – 1.8)	1.12 ± 0.34 (0.5 – 2.1)
<b>pH</b>	6.75 ± 0.25 (6.5 – 7.0)	6.73 ± 0.24 (6.5 – 7.0)	6.71 ± 0.25 (6.5 – 7.0)	6.73 ± 0.25 (6.5 – 7.0)
<b>Concentración Inicial (x 10<sup>9</sup>esp/ml)</b>	3.58 ± 0.56 (2.31 – 4.35)	3.56 ± 0.44 (2.65 – 4.62)	3.48 ± 0.59 (2.22 – 4.72)	3.54 ± 0.53 (2.22 – 4.72)

**Tabla 2.** Análisis de frecuencia de los valores de Motilidad Masal para la totalidad de eyaculados. En Apéndice 4 se explica el significado de los valores del 0 al 5.

		<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>	<b>Porcentaje Acumulativo</b>
<b>Valor</b>	0	0	0%	0%
	1	0	0%	0%
	2	0	0%	0%
	3	5	4.9%	4.9%
	4	51	50.0%	54.9%
	5	46	45.1%	100%
<b>Total</b>		102	100%	

**Tabla 3.** Tasa de recuperación espermática por carnero y por la totalidad de muestras evaluadas. Los valores van acompañados de su respectiva desviación estándar.

	<b>Carnero I</b>	<b>Carnero II</b>	<b>Carnero III</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Número de Muestras Evaluadas</b>	34	34	34	102
<b>Tasa de Recuperación Espermática (%)</b>	29.20 ± 8.72	34.22 ± 11.77	31.09 ± 11.62	31.50 ± 10.89



**Tabla 4.** Motilidad Individual por carnero en tiempo cero. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de motilidad individual en las muestras del grupo experimental con respecto al grupo control para cada carnero ( $p < 0.05$  entre a y b, c y d, e y f).

<b>Motilidad Individual (%) en el tiempo cero (T<sub>0</sub>)</b>		
	<b>Control (C)</b>	<b>Experimental (E)</b>
<b>Carnero I</b>	85.89 ± 1.56 <sup>a</sup>	92.23 ± 1.68 <sup>b</sup>
<b>Carnero II</b>	85.77 ± 1.60 <sup>c</sup>	92.19 ± 1.82 <sup>d</sup>
<b>Carnero III</b>	85.54 ± 2.08 <sup>e</sup>	91.80 ± 1.95 <sup>f</sup>

**Tabla 5.** Vitalidad por carnero en tiempo cero. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de vitalidad en las muestras del grupo experimental con respecto al control para los carneros I y III ( $p < 0.05$  entre a y b, c y d).

<b>Vitalidad (%) en el tiempo cero (T<sub>0</sub>)</b>		
	<b>Control (C)</b>	<b>Experimental (E)</b>
<b>Carnero I</b>	75.86 ± 4.50 <sup>a</sup>	80.08 ± 2.62 <sup>b</sup>
<b>Carnero II</b>	75.61 ± 4.43	76.87 ± 5.24
<b>Carnero III</b>	74.11 ± 4.75 <sup>c</sup>	78.29 ± 6.40 <sup>d</sup>

**Tabla 6.** Anormalidades por carnero en tiempo cero. Se observó una disminución significativa en los valores promedio de anormalidades en las muestras del grupo experimental con respecto al control para los carneros I y III. ( $p < 0.05$  entre a y b, c y d). La disminución de anormalidades en el carnero II no fue significativa ( $p = 0.05$ ).

<b>Anormalidades (%) en el tiempo cero (<math>T_0</math>)</b>		
	<b>Control (C)</b>	<b>Experimental (E)</b>
<b>Carnero I</b>	$9.69 \pm 1.59^a$	$7.92 \pm 1.42^b$
<b>Carnero II</b>	$9.92 \pm 1.84$	$8.75 \pm 1.36$
<b>Carnero III</b>	$10.21 \pm 1.76^c$	$8.56 \pm 1.07^d$

**Tabla 7.** Integridad de Membrana por carnero en tiempo cero. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de integridad de Membrana en las muestras del grupo experimental con respecto al grupo control para cada carnero ( $p < 0.05$  entre a y b, c y d, e y f).

<b>Integridad de Membrana (%) en el tiempo cero (<math>T_0</math>)</b>		
	<b>Control (C)</b>	<b>Experimental (E)</b>
<b>Carnero I</b>	$73.41 \pm 4.80^a$	$79.24 \pm 3.71^b$
<b>Carnero II</b>	$74.08 \pm 4.69^c$	$77.75 \pm 4.91^d$
<b>Carnero III</b>	$72.60 \pm 3.93^e$	$78.68 \pm 4.34^f$

**Tabla 8.** Motilidad Individual por carnero después de 24 horas de refrigeración. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de motilidad individual en las muestras del grupo experimental con respecto al grupo control para cada carnero ( $p < 0.05$  entre a y b, c y d, e y f).

<b>Motilidad Individual (%) después de 24 horas de refrigeración (T<sub>24</sub>)</b>		
	<b>Control (C)</b>	<b>Experimental (E)</b>
<b>Carnero I</b>	82.14 ± 2.40 <sup>a</sup>	87.43 ± 3.17 <sup>b</sup>
<b>Carnero II</b>	82.74 ± 2.29 <sup>c</sup>	86.30 ± 3.16 <sup>d</sup>
<b>Carnero III</b>	82.43 ± 2.09 <sup>e</sup>	87.08 ± 3.08 <sup>f</sup>

**Tabla 9.** Vitalidad por carnero después de 24 horas de refrigeración. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de vitalidad en las muestras del grupo experimental con respecto al control para los 3 carneros ( $p < 0.05$  entre a y b, c y d, e y f).

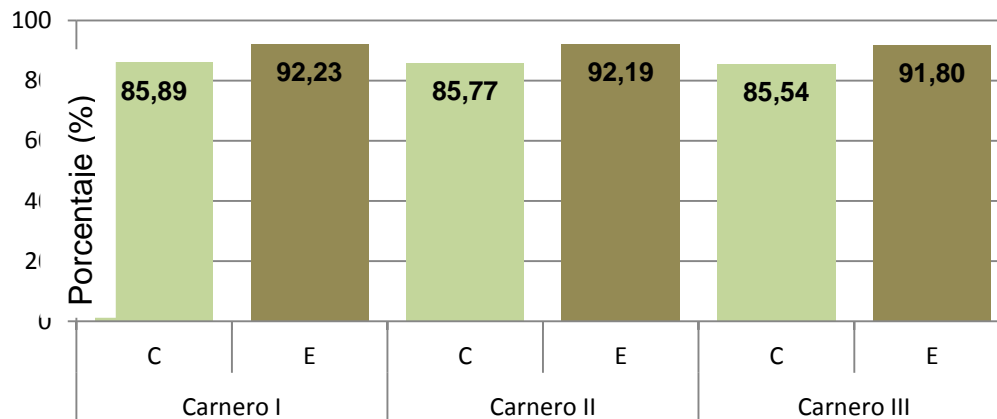
<b>Vitalidad (%) después de 24 horas de refrigeración (T<sub>24</sub>)</b>		
	<b>Control (C)</b>	<b>Experimental (E)</b>
<b>Carnero I</b>	70.34 ± 3.42 <sup>a</sup>	73.60 ± 3.35 <sup>b</sup>
<b>Carnero II</b>	67.85 ± 4.93 <sup>c</sup>	70.58 ± 4.24 <sup>d</sup>
<b>Carnero III</b>	68.27 ± 3.63 <sup>e</sup>	69.53 ± 3.66 <sup>f</sup>

**Tabla 10.** Integridad de Membrana por carnero después de 24 horas de refrigeración. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de integridad de Membrana en las muestras del grupo experimental con respecto al grupo control para cada carnero ( $p < 0.05$  entre a y b, c y d, e y f).

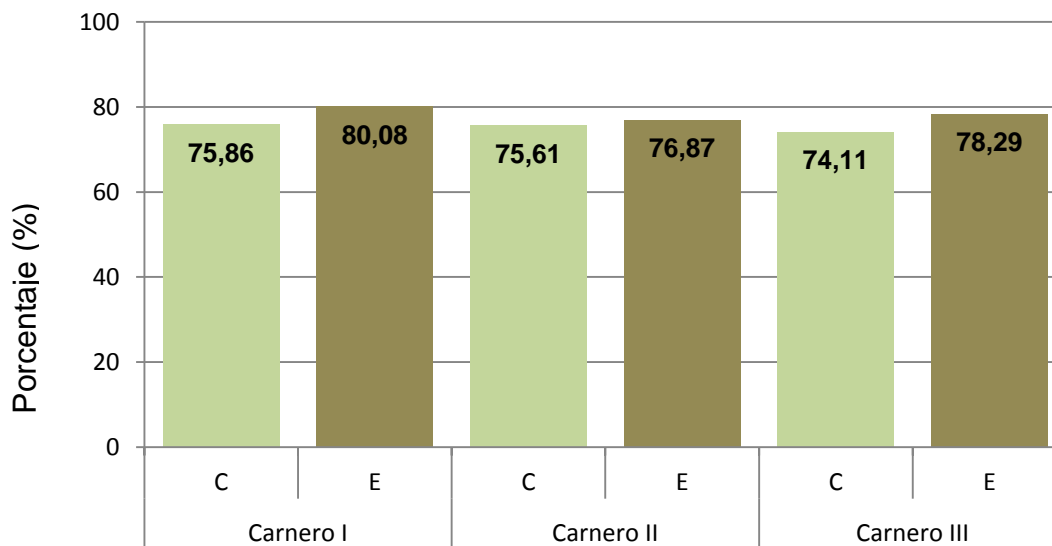
<b>Integridad de Membrana (%) después de 24 horas de refrigeración (T<sub>24</sub>)</b>		
	<b>Control (C)</b>	<b>Experimental (E)</b>
<b>Carnero I</b>	70.42 ± 4.31 <sup>a</sup>	72.11 ± 3.60 <sup>b</sup>
<b>Carnero II</b>	65.48 ± 3.96 <sup>c</sup>	70.09 ± 2.43 <sup>d</sup>
<b>Carnero III</b>	68.02 ± 3.62 <sup>e</sup>	70.42 ± 2.90 <sup>f</sup>

## Gráficas

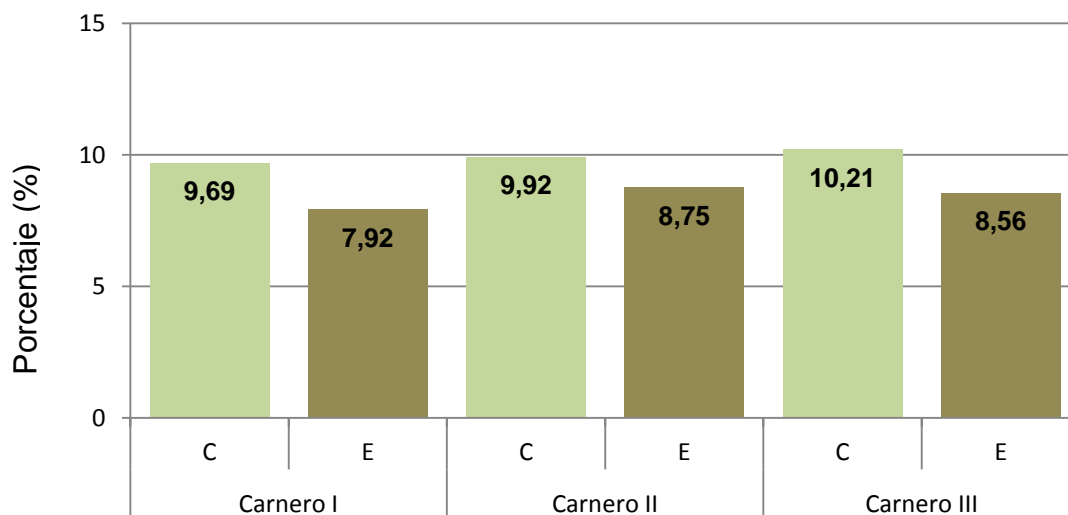
**Gráfica 1.** Motilidad Individual por carnero en tiempo cero. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de motilidad individual en las muestras del grupo experimental (E) con respecto al grupo control (C) para cada carnero.



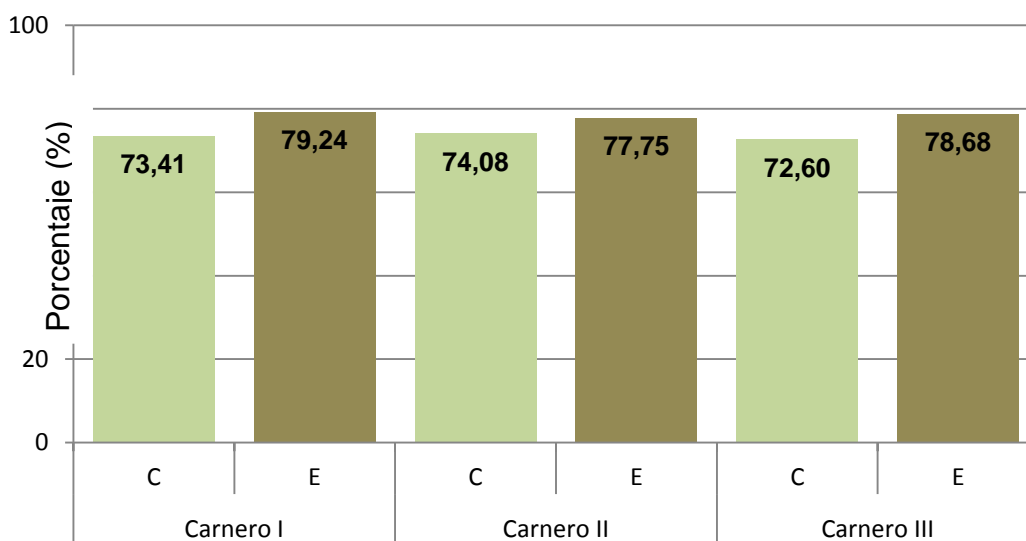
**Gráfica 2.** Vitalidad por carnero en tiempo cero. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de vitalidad en las muestras del grupo experimental (E) con respecto al control (C) para los carneros I y III.



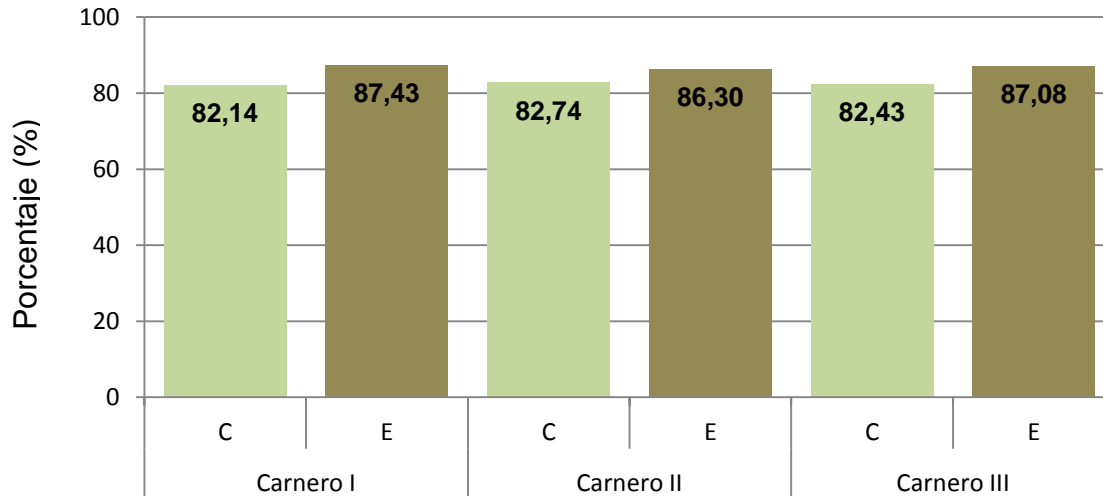
**Gráfica 3.** Anormalidades por carnero en tiempo cero. Se observó una disminución significativa en los valores promedio de anormalidades en las muestras del grupo experimental (E) con respecto al control (C) para los carneros I y III.



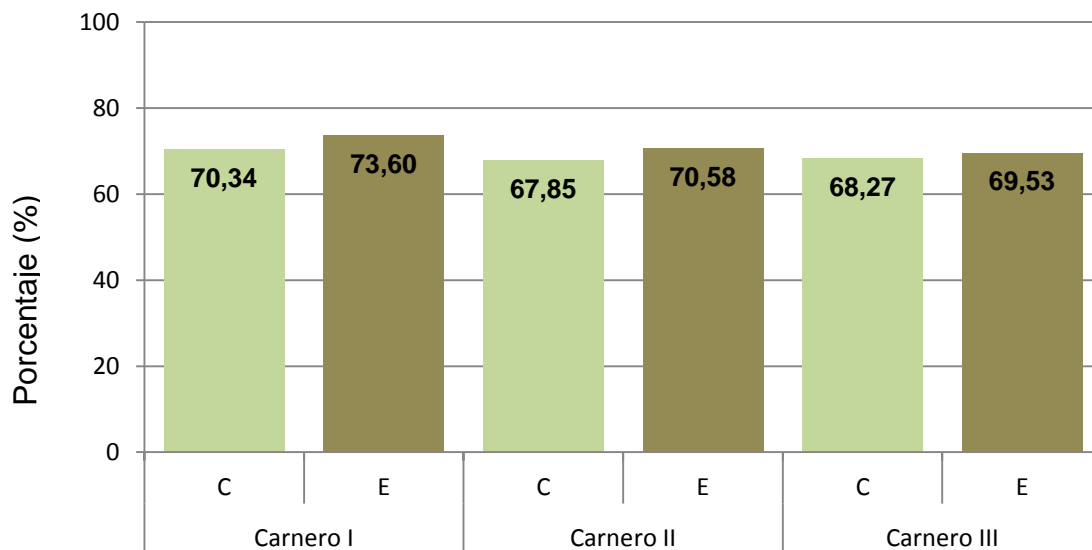
**Gráfica 4.** Integridad de Membrana por carnero en tiempo cero. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de integridad de membrana en las muestras del grupo experimental (E) con respecto al grupo control (C) para cada carnero.



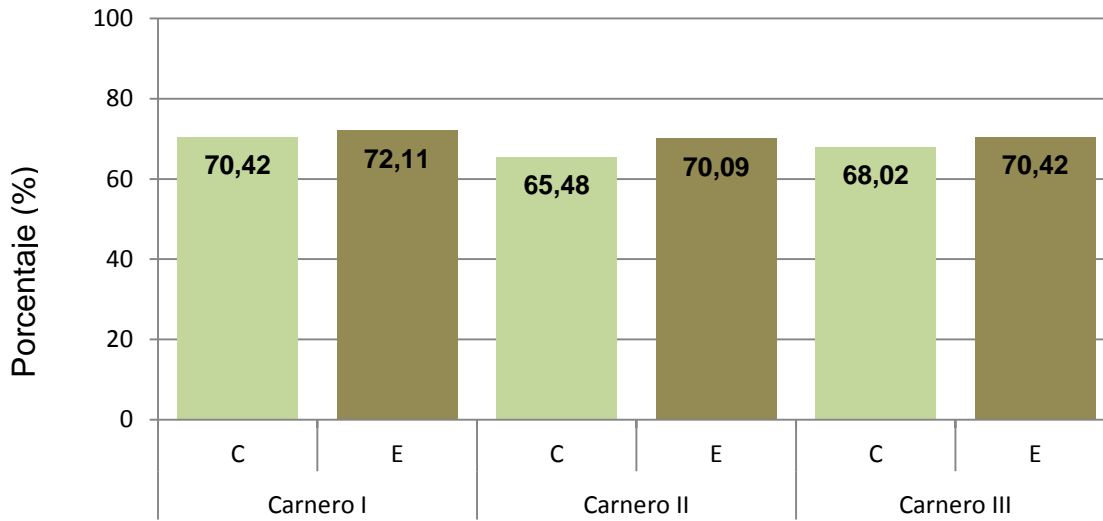
**Gráfica 5.** Motilidad Individual por carnero después de 24 horas de refrigeración. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de motilidad individual en las muestras del grupo experimental (E) con respecto al grupo control (C) para cada carnero.



**Gráfica 6.** Vitalidad por carnero después de 24 horas de refrigeración. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de vitalidad en las muestras del grupo experimental con respecto al control para los 3 carneros.



**Gráfica 7.** Integridad de Membrana por carnero después de 24 horas de refrigeración. Se observó un aumento significativo en los valores promedio de integridad de Membrana en las muestras del grupo experimental con respecto al grupo control para cada carnero





# Preparación del Diluyente

Triladyl®

Preparación del diluyente Triladyl® según Laboratorio de Procesamiento de Semen del banco Nacional de Semen de la UNALM:

Proporción 1:3:1

Una parte de concentrado de Triladyl® (20%)

Tres partes de agua destilada (60%)

Una parte de yema de huevo (20%)

Preparación para 20ml

Concentrado de Triladyl® = 4ml

Agua destilada = 12ml

Yema de huevo = 4ml

Procedimiento

Preparación de solución madre

Agregar 4ml de Triladyl® a una probeta de 25ml

Agregar 12ml de agua destilada

Realizar la mezcla con una bagueta

Yema de huevo

Separar 4ml de yema de huevo

Agregar a la solución madre la yema de huevo

Con una bagueta mezclar y homogenizar

Composición de la gradiente Ovipure™

Sílica recubierta de silano

Fructosa

PVA

Agua estéril

Piruvato

Características de la gradiente Ovipure™

pH: 6.8 - 7.0

Osmolaridad (mOsm/kg H<sub>2</sub>O): 295-305

La gradiente esta químicamente definida y libre de ingredientes de origen animal vegetal

La composición química del medio esta basado trisodio – citrato - dihidratado, fructosa y sodio - piruvato

La concentración de partículas de silica cubiertas de silano en un medio coloidal es de 80%

La osmolaridad media y el pH es de 300 mOsm/Kg y 6.8-7.0, respectivamente

La gradiente es esterilizada por radiación gama

Composición de la solución hiposmótica (125 mOsm/Kg)

Fructosa = 0.112g

Citrato de Na (g) = 0.05g

Agua destilada = 10ml

Componentes del medio de lavado

Tris = 1.817g

Fructosa = 0.25g

Ácido cítrico = 0.995g

Agua bidestilada = 50ml

Composición de la tinción Eosina al 2%

Eosina = 0.2g

Citrato de sodio dihidratado = 0.3g

Agua bidestilada = 10ml

Composición de la tinción Nigrosina al 2%

Nigrosina = 0.2g

Citrato de sodio dihidratado = 0.3g

Agua bidestilada = 10ml

Valor nutritivo (%) del alimento concentrado

Materia seca = 87.4

NDT = 68.5

Proteína = 14

Fibra cruda = 17.5

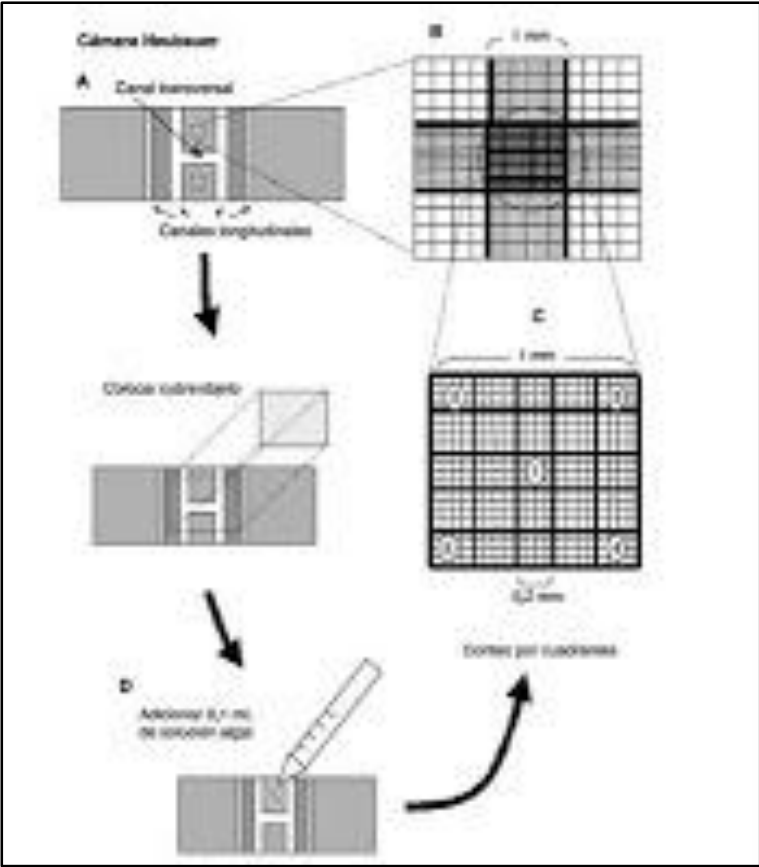
Calcio total = 0.5

Fósforo total = 0.85

Sodio = 0.05

Su valor energético total fue de 1.3 Mcal/kg

Esquema de cámara de Neubauer



## Figuras complementarias

**Figura 1.** Corrales de los carneros



**Figura 2.** Oveja sujeta al brete de colección



**Figura 3.** Vaginas artificiales utilizadas para la obtención de semen



**Figura 4.** Tubo colector conectado a la vagina artificial



**Figura 5.** Diluyente Triladyl® preparado para diluir



**Figura 6.** Materiales utilizados para la toma de muestra





**Figura 7.** Medio de gradiente Ovipure y Medio de Lavado



**Figura 8.** Lavado, aislamiento y obtención de la yema de huevo



**Figura 9.** Componentes del diluyente final Triladyl®



**Figura 10.** Preparación de la vagina artificial



**Figura 11.** Carnero montando a la hembra listo para colocar vagina artificial



**Figura 12.** Vaginas artificiales con sus respectivos tubos y protegidas con fundas para la obtención del semen.



**Figura 13.** Primera centrifugación de la muestra con la gradiente donde se observa la separación del plasma seminal (banda superior) con la suspensión de espermatozoides anormales, senescentes, muertos, detritus (banda media) y el pellet donde se hallan los espermatozoides motiles.



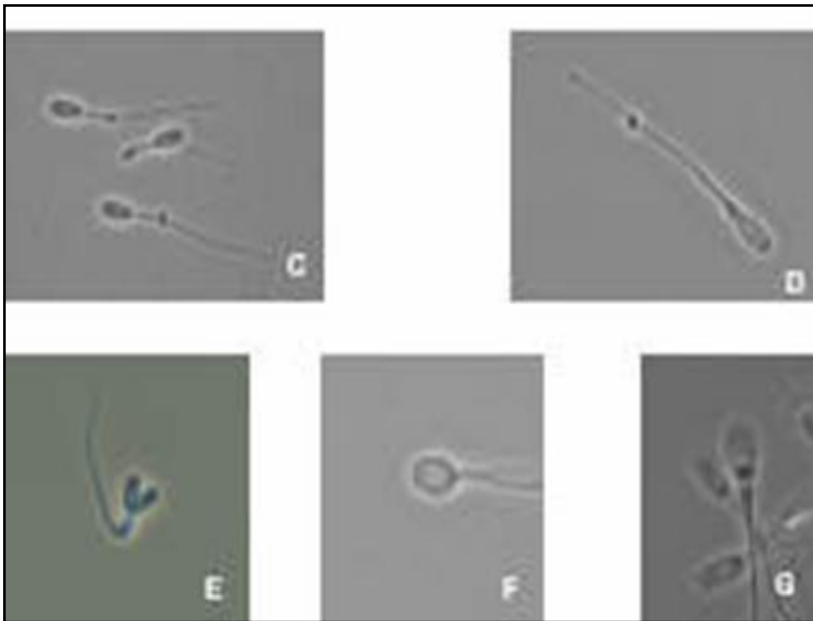
**Figura 14.** Segunda centrifugación del pellet con el medio de lavado dónde se observa la recuperación final del pellet.



**Figura 15.** Tinción con eosina y nigrosina para evaluar vitalidad. Los espermatozoides teñidos son muertos y los no teñidos son vivos.



**Figura 16.** Morfo anomalías de los espermatozoides



- C. Espermatozoides con cola en látigo
- D. Doble porción intermedia
- E. Espermatozoide con dos cabezas
- F. Cabeza espermática de forma redondeada
- G. Espermatozoide macrocefálico

**Figura 17.** Espermatozoides reaccionados en un medio hiposmótico. Se observa el flagelo torcido helicoidalmente, flagelo enrollado, flagelo ascendido, cabeza hinchada y la cola hinchada lo cual es indicativo de que sus membranas han estado intactas,



# APÉNDICE

## Apéndice 1. Esquema representativo de vagina artificial.

Las partes que constituyen una vagina artificial son:

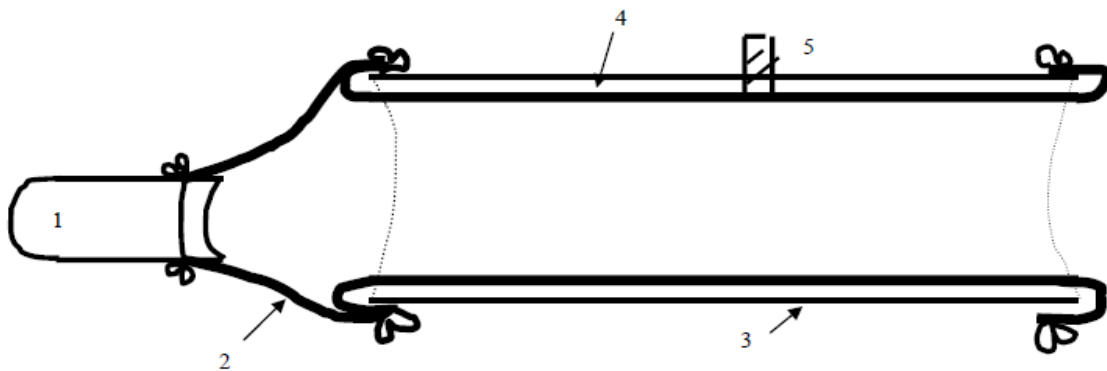
Cuerpo rígido (de metal o caucho) que incluye una válvula de doble espita a través de la cual se añade agua y aire.

Funda, de pared delgada que forma una cámara al doblarse hacia el exterior.

Tubocónico intermediario, que sirve de unión entre el cuerpo rígido y el tubo colector.

Tubo colector, situado al final del tubo cónico y generalmente de 10 ml de capacidad, graduado en 0,1 ml.

Camisa o funda, encargada de mantener la temperatura y proteger el semen frente a la luz.



**Apéndice 2.** Valores normales de los parámetros espermáticos según los criterios del Laboratorio de Procesamiento de Semen del Banco Nacional de Semen de la UNALM.

<b>Característica</b>	<b>Valor Normal</b>
Color	Blanquecino - Amarillento
Aspecto	Cre moso
Volumen	≥ 0.5 ml
pH	6.2 – 7.3
Motilidad Masal	3 - 5
Motilidad Individual	≥ 80%
Concentración Espermática	≥ 2 x 10 <sup>9</sup> spz/ml
Células Normales	≥ 85%
Vitalidad	≥ 70%
Membrana Intacta	≥ 60%



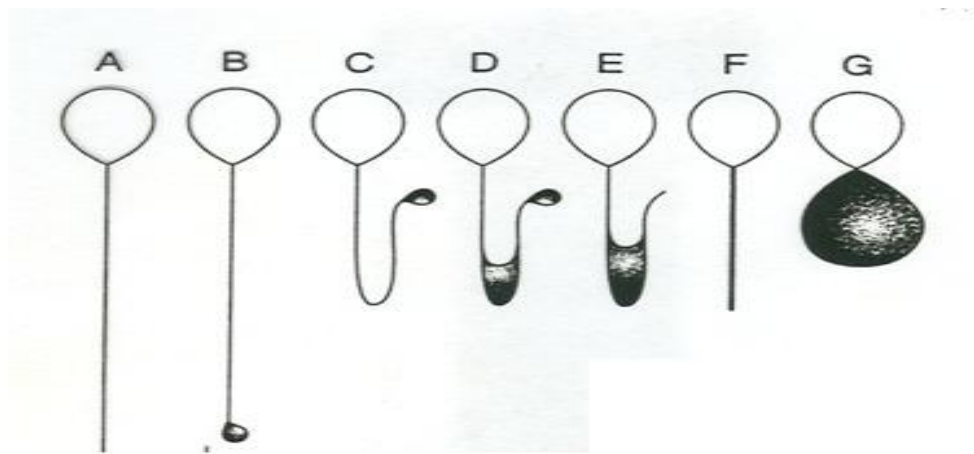
### **Apéndice 3.** Concentración del semen de carnero valorado por su aspecto.

<b>Valor</b>	<b>Consistencia</b>	<b>Número de espermatozoides promedio (x 10<sup>6</sup>) por ml</b>
5	Creмоса espesa	5
4	Creмоса	4
3	Creмоса tenue	3
2	Lechosa	2
1	Nebulosa	0.7
0	Acuosa	Insuficiente

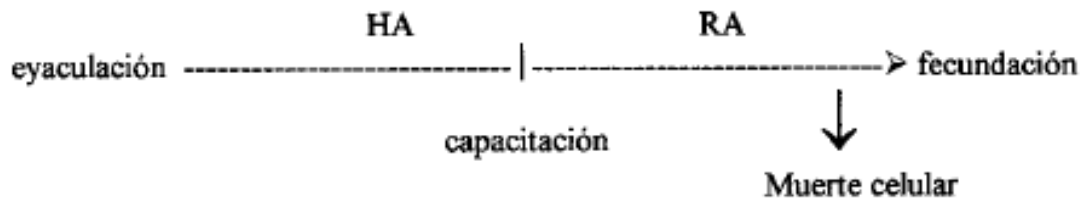
**Apéndice 4.** Valoración de la motilidad en masa microscópica. Para ser aceptable, una muestra de semen debe mostrar por lo menos, un modelo de ondas tipo tres.

Valor	Descripción
0	Todos los espermatozoides carecen de movimiento
1	10% de espermatozoides muestran signos de vida
2	Hay movimiento visible sin ondas en un 20-40% de espermatozoides
3	Ondas pequeñas con movimientos lentos. 45-65% de células activas
4	Movimientos vigorosos pero ondas no muy rápidas. 70-85% de células activas
5	Movimientos de ondas rápidos. 90% a más de actividad celular.

**Apéndice 5.** Diferentes grados de reacción en espermatozoides expuestos al test hiposmótico. A: Espermatozoides con membrana alterada, dañada. B, C, D, E, F y G. Espermatozoides con integridad funcional de membrana intacta.

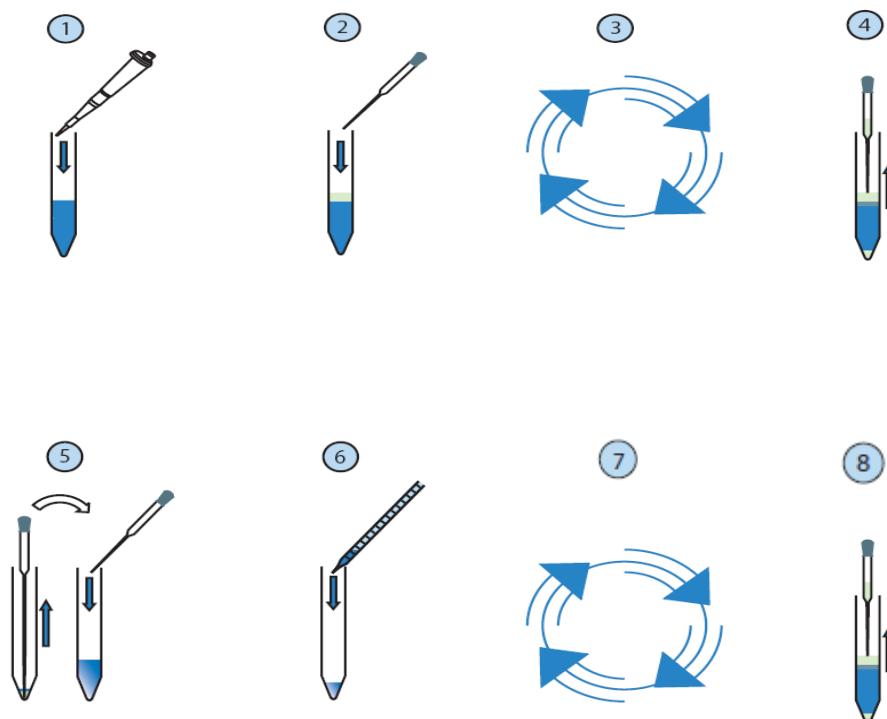


**Apéndice 6.** La capacitación espermática se correlaciona a cambios cinéticos y estructurales conocidos como



hiperactivación (HA) y reacción acrosomal (RA), respectivamente. La finalidad final es la fecundación. Los espermatozoides que no alcanzaron a fecundar, morirán y serán reabsorbidos.

## Apéndice 7. Los pasos de la técnica de gradiente de densidad con Ovipure™.



Transferir 4 ml de Ovipure™ a un tubo cónico de centrifugación estéril.

Depositar 1ml de la muestra diluida 1:4 en la parte superior de la columna.

Centrifugar a 300g por 20 minutos.

Extraer el sobrenadante, excepto 0.75ml de la parte más baja.

Transferir el sedimento (pellet) a un nuevo tubo cónico estéril.

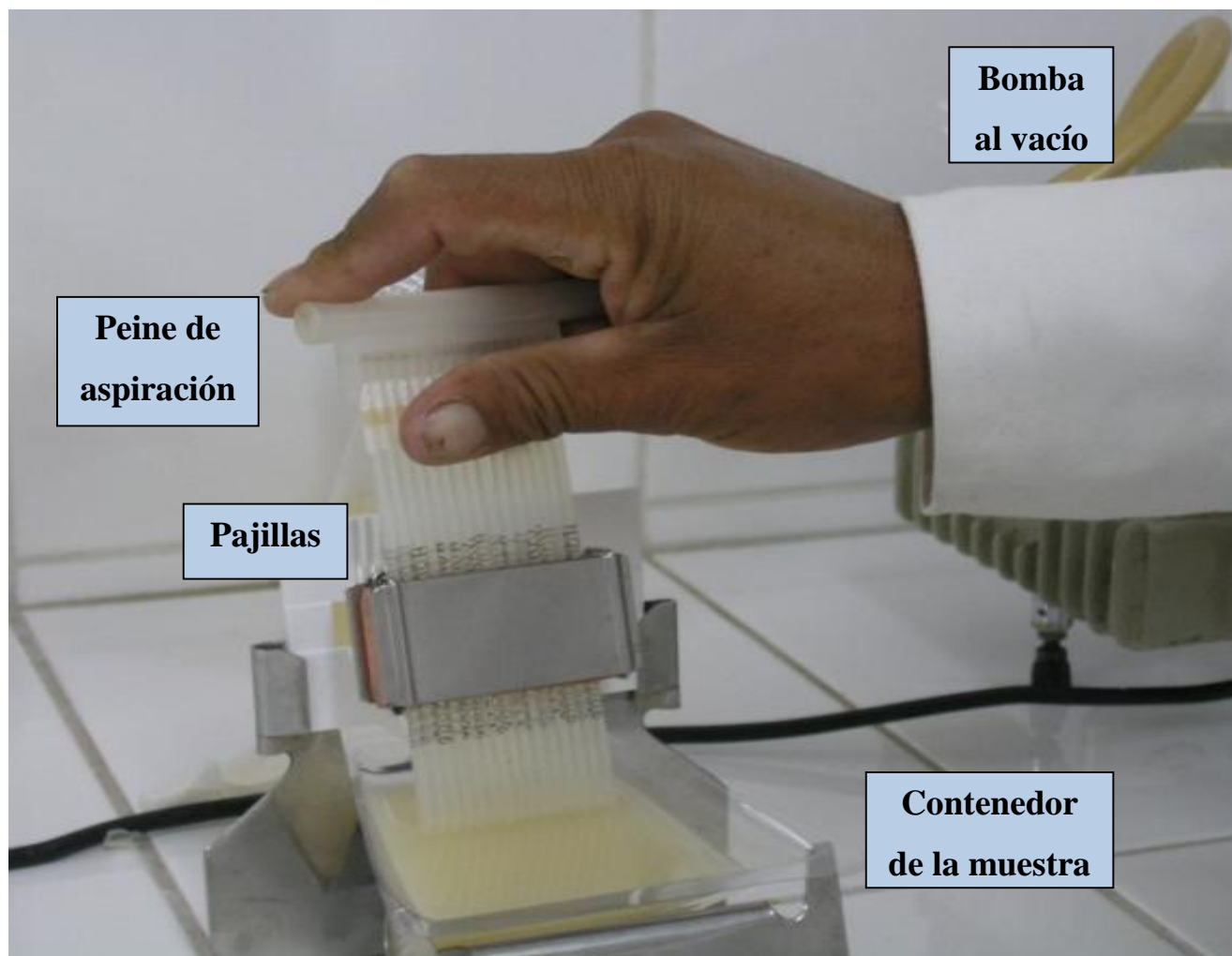
Agregar 5.25ml de medio de lavado al tubo con el sedimento (pellet).

Centrifugar a 500g por 10 minutos.

Extraer el sobrenadante y re-suspender el pellet con el diluyente a la concentración deseada.

## Apéndice 8. Esquema del sistema para el llenado de pajillas

La muestra era colocada en un contenedor. Luego, las pajillas se colocaban de manera perpendicular permitiendo que un extremo entre en contacto con la muestra. Por el otro extremo de la pajilla, se insertaba un peine de aspiración, que estaba conectado a una bomba al vacío. Cuando la bomba era activada, las pajillas eran llenadas,



## Apéndice 9. Sellado de pajillas

Las pajillas fueron selladas por el extremo donde se formó la burbuja de aire con la ayuda de alcohol polivinílico en polvo.



**Alcohol  
Polivinílico**

## **Apéndice 10.** Composición del Triladyl®

Tris

Ácido cítrico

Azúcar

Tampones

Glicerina

Antibióticos

Agua de extrema pureza

Tilosina 5,7 mg

Gentamicina 28,6 mg

Espectinomicina 34,3 mg