



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
Campus Loma Bonita

LICENCIATURA EN ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA VITAMINA E ADICIONADA AL DILUTOR
SOBRE LA INTEGRIDAD ACROSOMAL POSTCONGELAMIENTO
DEL SEMEN OVINO**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN ZOOTECNIA

PRESENTA:

JOSÉ ADÁN PONCE LEÓN

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GLADIS MORALES TERÁN

LOMA BONITA, OAXACA, MEXICO, 2023



Universidad del Papaloapan

FECHA:	08 de Febrero del 2023
AREA:	Vice-Rectoría Académica
OFICIO NÚMERO:	UNPA/VRA/044/2023
ASUNTO:	Autorización de Impresión de tesis.

**C. JOSE ADAN PONCE LEON
P R E S E N T E:**

En base al artículo 120 del reglamento de alumnos, por medio de la presente se aprueba la impresión de la tesis titulada **“Evaluación de la vitamina E adicionada al dilutor sobre la integridad acrosomal postcongelamiento del semen ovino”** así como la programación del examen profesional bajo la dirección de la Dra. Gladis Morales Terán.

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,
terra ubérrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



MC. HÉCTOR LOPEZ ARJONA
Vice-Rector Académico.

VICE-RECTORIA
ACADEMICA



C.e.p. Dra. Tania Zúñiga Marroquín Jefa de Carrera de la Lic. En Zootecnia
C.e.p. L.P. Yesenia Barrientos Arenal. Jefa del Departamento de Servicios Escolares
C.e.p. Dra. Gladis Morales Terán. Directora de Tesis.
C.e.p. Archivo.



Universidad del Papaloapan

Licenciatura en Zootecnia

Oficio número JCLZ/16/2023

Asunto: Registro de protocolo de tesis
Loma Bonita, Oaxaca a 7 de febrero del 2023

M.E. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe del Departamento de Servicios Escolares
PRESENTE

Mediante la presente, le informo que esta jefatura, con el visto bueno de la Vice-rectoría Académica, ha designado a los siguientes profesores como sinodales del examen profesional del egresado **C. José Adán Ponce León**, quien defenderá su trabajo de tesis titulado **"Evaluación de la vitamina E adicionada al dilutor sobre la integridad acrosomal postcongelamiento del semen ovino"**, para obtener el título de **Licenciado en Zootecnia**.

Titulares:

Presidente: Dr. Miguel Ángel Sánchez Hernández
Secretario: Dr. Cecilio Ubaldo Aguilar Martínez
Vocal: Dra. Gladis Morales Terán

Suplentes:

Dr. Wilber Hernández Montiel
Dr. José Abad Zavaleta

Sin más por el momento, le envié un cordial saludo.



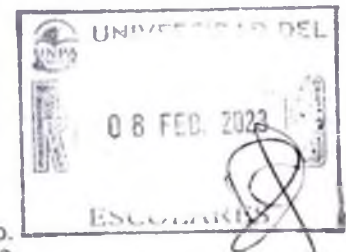
LICENCIATURA
EN ZOOTECNIA

Dra. Tania Zúñiga Marroquín
Jefa de Carrera de Lic. en Zootecnia

Atentamente

Vo. Bo.

M.C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico



C.c.p.: M.C. Hector López Arjona. Vicerector académico. Para su conocimiento
C.c.p: Archivo



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Campus Loma Bonita

LA PRESENTE TESIS TITULADA “**EVALUACIÓN DE LA VITAMINA E ADICIONADA AL DILUTOR SOBRE LA INTEGRIDAD ACROSOMAL POSTCONGELAMIENTO DEL SEMEN OVINO**” PRESENTADA POR EL PASANTE **JOSÉ ADÁN PONCE LEÓN**, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA **DRA. GLADIS MORALES TERÁN**, HA SIDO REVISADA Y ACEPTADA POR EL JURADO REVISOR, COMO UN REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN ZOOTECNIA.

JURADO EXAMINADOR

DRA. GLADIS MORALES TERÁN

DIRECTOR

DR. MIGUEL ÁNGEL SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

REVISOR

DR. CECILIO UBALDO AGUILAR MARTÍNEZ

REVISOR

LOMA BONITA, OAXACA, MÉXICO, 2023

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de estar en este punto de mi vida.

A mis padres, por su apoyo incondicional.

A mis hermanos, por su apoyo y motivación.

A mi familia, Laura, Faty y Leo por apoyarme a culminar esta meta.

A mis compañeros de la escuela, por haber creado un buen grupo generación 2011-2016.

A mis amistades, Victorio, Efraín, Alejandro, Ángel, Lencho, saúl, alvarado.

AGRADECIMENTOS

A la Universidad del Papaloapan *campus* Loma Bonita, por brindarme la oportunidad de culminar este proceso.

A PRODEP-SEP, por financiar el proyecto “Sincronización e inducción de la ovulación durante el anestro postparto en ovejas Pelibuey mediante el efecto macho en el trópico” (SEP-PROME/10.3.5/13/6702/).

A la Dra. Gladis Morales Terán, por su apoyo en mi crecimiento personal e institucional en todo momento.

Al comité de revisión de tesis, por brindarme su asesoría y las correcciones pertinentes, ayudando a mejorar este trabajo.

A los directivos institucionales, por darme la oportunidad de culminar este proceso.

A mis profesores, por haberme inculcado el camino hacia el conocimiento y aprendizaje.

ÍNDICE

	PÁGINAS
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivo general	4
2.2. Objetivos específicos	4
3. HIPÓTESIS	5
4. REVISIÓN DE LITERATURA	6
4.1. Historia de la ovinocultura en México.....	6
4.2. Importancia del semental en la explotación ovina	7
4.3. Valoración de los sementales ovinos	8
4.4. Recolección de semen	9
4.4.1. Electroeyaculación (EE).....	9
4.4.2. Vagina artificial	10
4.5. Evaluación del semen	10
4.5.1. Examen macroscópico	10
4.5.1.1. Volumen del eyaculado	11
4.5.1.2. Color y aspecto del eyaculado.....	11
4.5.2. Examen microscópico	12

4.5.2.1. Movilidad espermática	12
4.5.2.1.1. Motilidad masal	12
4.5.2.1.2. Motilidad individual progresiva.....	13
4.5.2.2. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos.....	13
4.5.2.3. Morfología espermática	14
4.5.2.3.1. Anormalidades primarias	14
4.5.2.3.2. Anormalidades secundarias	15
4.5.2.4. Concentración espermática	16
4.6. Dilución del semen	19
4.6.1. Componentes de los diluyentes	20
4.6.2. Tipos de diluyentes	20
4.6.2.1. Diluyentes no comerciales	21
4.6.2.2. Diluyentes basados en citrato, azúcar (monosacáridos) y diluidos en leche	21
4.6.2.3. Diluyentes basados en di o trisacáridos (lactosa, sacarosa o rafinosa) y bufferes orgánicos (tris) u otros componentes	21
4.6.2.4. Agentes protectores para los diluyentes (yema de huevo, glicerol y otros)	22
4.7. Conservación del semen ovino	23
4.7.1. Congelamiento de semen	24
4.8. Descongelamiento del semen	24
4.8.1. Daño acrosomal en semen descongelado	25
4.9. Radicales libres y antioxidantes en el semen ovino	26
4.9.1. Radicales libres	26
4.9.2. Antioxidantes	26

4.9.2.1. Vitamina E como antioxidante	27
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1. Localización del experimento	29
5.2. Animales que se utilizaron.....	29
5.3. Manejo de la alimentación	29
5.4. Manejo sanitario	30
5.5. Recolección de semen	30
5.6. Evaluación de semen fresco	31
5.7. Tratamientos en estudio	32
5.8. Dilución del semen	33
5.9. Descenso de la temperatura del semen	34
5.10. Congelado del semen	34
5.11. Descongelamiento de pajillas	35
5.12. Evaluación de la motilidad y daño acrosomal del semen congelado con el colorante Eosina-Nigrosina	36
5.13. Evaluación de pajillas descongeladas con el colorante Spermac triple tinción	36
5.14. Variables evaluadas	37
5.15. Análisis estadístico de la información.....	39
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1. Características macro y microscópicas del semen fresco.....	40
6.2. Motilidad masal e individual en semen diluido y enfriado a 5 °C en ovinos Pelibuey.....	43
6.3. Motilidad masal e individual en el semen descongelado de ovinos Pelibuey.....	44

6.4. Motilidad masal y motilidad individual entre los procesos de dilución, enfriado y descongelado del semen ovino de la raza Pelibuey.....	45
6.5. Motilidad masal e individual al adicionar vitamina E al dilutor Triladyl.....	47
6.6. Integridad del acrosoma después del descongelado del semen.	50
6.7. Eficiencia del colorante en la integridad estructural de la membrana de semen ovino.....	52
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
7.1. Conclusiones.....	54
7.2. Recomendaciones.....	55
8. LITERATURA CITADA	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Color y concentración del eyaculado en el carnero	11
2	Morfología espermática del semen en el carnero.....	15
3	Concentración del semen de carnero valorada mediante la consistencia	16
4	Ingredientes de los dilutores para conservar semen ovino	32
5	Evaluación macroscópica y microscópica de semen fresco en ovinos Pelibuey	40
6	Evaluación de la motilidad masal e individual del semen diluido y enfriado de carneros ovinos de la raza Pelibuey, utilizando el dilutor Triladyl sin adición de Vitamina E	43
7	Motilidad masal e individual en el semen descongelado de carneros de la raza Pelibuey	45
8	Promedio total de motilidad masal e individual en los procesos de dilución, enfriado y descongelado con el dilutor Triladyl y Triladyl+vit E en carneros de la raza Pelibuey.....	48
9	Promedio de la motilidad masal y motilidad individual en la dilución, enfriado y descongelado del semen al adicionar	

	vitamina E al dilutor Triladyl por efecto de la edad en carneros de la raza Pelibuey.....	49
10	Evaluación del porcentaje de integridad del acrosoma y motilidad individual en el semen descongelado por efecto de la edad de carneros Pelibuey.	50
11	Evaluación del porcentaje de integridad del acrosoma y motilidad individual del semen descongelado por adición de vitamina E al dilutor Triladyl en carneros Pelibuey en Loma Bonita, Oaxaca.....	51
12	Evaluación de la integridad del acrosoma en tinción Eosina-Nigrosina (EN) y triple tinción (TT; Spermac) en el semen descongelado de carneros Pelibuey en Loma Bonita, Oaxaca... ..	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Motilidad masal a la dilución, enfriado y descongelado del semen de carneros Pelibuey. C2= Carnero 2, C8= Carnero 8, MSD= Motilidad masal después de la dilución a 36 °C, MSE= Motilidad masal al enfriado a 5 °C, MSDS= Motilidad masal después del descongelado.....	46
2	Motilidad individual a la dilución, enfriado y descongelado del semen de carneros Pelibuey. C2= Carnero 2, C8= Carnero 8, MID= Motilidad individual después de la dilución, MIE= Motilidad individual después del enfriado, MIDS= Motilidad individual después del descongelado.....	47

RESUMEN

El objetivo fue evaluar la adición de la vitamina E en el dilutor Triladyl® y su efecto en la integridad acrosomal del semen ovino descongelado de la raza Pelibuey. El experimento se realizó en la Posta Zootécnica de la Universidad del Papaloapan *campus* Loma Bonita. Se usaron dos carneros de la raza Pelibuey de 1 y 2 años de edad, con un peso corporal promedio de 60 kg y una condición corporal (CC) de 3.5-4 (en escala de 1-5). Se realizaron 20 colectas de semen por carnero. El semen se dividió en dos porciones iguales que fueron asignadas a dos tratamientos: el tratamiento 1 (T1) consistió en el dilutor Triladyl® adicionado con vitamina E y el tratamiento 2 (T2) o testigo con dilutor Triladyl®. Las formas de conservación del semen fueron semen fresco (a 37 °C), enfriado (5 °C) y congelado (-196 °C). Las variables estudiadas en el semen fresco, diluido, enfriado y descongelado fueron: color y volumen del eyaculado, motilidad masal, motilidad individual. En el semen descongelado se estudiaron los espermatozoides vivos y muertos, concentración espermática, y porcentaje de integridad acrosomal. Las variables se analizaron mediante un análisis de varianza y las diferencias entre medias por la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2X2. En el semen fresco se observó que la edad de los carneros afectó la concentración espermática ($p < 0.05$). La dilución, enfriado y descongelado del semen afectan en la motilidad masal e individual del semen ovino ($P < 0.05$). En conclusión, la adición de vitamina E al dilutor Triladyl influyó en el porcentaje de la integridad acrosomal y motilidad individual en el semen descongelado.

Palabras clave: semen, carnero, vitamina E, congelación, características seminales.

ABSTRACT

The aim to evaluate the addition of vitamin E in the Triladyl® extender and its effect on the acrosomal integrity of Pelibuey ram semen. The experiment was carried out at the Posta Zootecnica of the Papaloapan University campus Loma Bonita, Oaxaca. Using two Pelibuey rams of 1 and 2 years old, with an average body weight of 60 kg and a body condition score (CC) of 3.5-4 (on scale of 1-5) were used. Twenty semen collections per ram were made, the semen collected was divided into two equal portions that were assigned to two treatments, treatment 1 (T1) was based on the Triladyl® dilutor and vitamin E, and treatment 2 (T2) or control with Triladyl® dilutor. The forms of semen conservation were fresh semen (at 37 °C), chilled (5 °C) and frozen (-196 °C). The variables studied in fresh, diluted, cooled and thawed semen were: color and volume of the ejaculate, mass motility, individual motility. Live and dead spermatozoa, sperm concentration, and percentage of acrosomal integrity were studied in thawed semen. The variables were analyzed by an analysis of variance and the differences between means by Tukey's test ($p \leq 0.05$). A completely randomized design with a 2X2 factorial arrangement was used. In the fresh semen it was observed that the age of the rams affected the sperm concentration ($p < 0.05$). The dilution, cooling and thawing of semen affect the mass and individual motility of sheep semen ($p < 0.05$). In conclusion, the addition of vitamin E to the Triladyl extender influenced the percentage of acrosomal integrity and individual motility in thawed semen.

Keywords: semen, ram, vitamin E, freezing, semen characteristics

1. INTRODUCCIÓN

El carnero tiene gran importancia en el éxito de una explotación ovina ya que recae en él, gran parte de la mejora genética del rebaño. Barrios (2007), mencionó que un semental hereda más del 70 % de sus características al rebaño. Sin embargo, en algunos casos la precaria situación económica de los criadores de ovinos impide la adquisición de reproductores, optando por la inseminación artificial con semen congelado como una alternativa de solución. Pese a ello, debe tomarse en cuenta que los resultados de fertilidad del semen criopreservado, dependen tanto de las características originales del semen fresco, de los dilutores, de la técnica de criopreservación y de la eficiencia en el proceso de inseminación artificial (Stornelli *et al.*, 2005).

Los resultados de fertilidad obtenidos en diversos trabajos con semen congelado, han reportado ser inferiores a los del semen fresco (Watson, 2000; Cabrera *et al.*, 2010) debido a que el semen criopreservado tiene una menor capacidad fecundante que el semen fresco (Salamon y Maxwell, 1995). Factores como el choque por frío, velocidad de enfriamiento, composición de los dilutores y estrés osmótico, que acontecen durante el proceso de congelación, son responsables de la disminución de la fertilidad con el uso de semen congelado (Stornelli *et al.*, 2005).

Lo anterior se debe a que, los espermatozoides son muy susceptibles a bajas temperaturas, lo que ocasiona cambios en la estructura y función celular relacionada con el choque por frío, incluyendo cambios en el acrosoma, mitocondrias y membrana celular, estructuras importantes para la sobrevivencia y funcionalidad después de la descongelación (Ollero *et al.*, 1996).

Uno de los factores que más influye en la viabilidad del semen congelado son los dilutores. Estas sustancias se utilizan en la reproducción de los animales para obtener más dosis (pajillas) por eyaculado (Hafez, 2000). Los dilutores no solo ayudan a aumentar el volumen del eyaculado, también protegen a los espermatozoides para resistir las bajas temperaturas durante el enfriamiento, congelación, descongelamiento. Además, extienden el tiempo de vida de los espermatozoides (Hafez, 2002).

Los dilutores se pueden dividir en caseros (hechizos) y comerciales. Entre los dilutores caseros, el más utilizado es el denominado Tris-yema de huevo. Este dilutor es muy reconocido por su actividad crioprotectora aún después de la descongelación de las pajillas. Autores como Salamon y Viser (1972) observaron que cuando se utiliza el diluyente a base de Tris-glucosa-yema de huevo en el semen, se obtienen resultados en motilidad espermática de 40.5 % al descongelar y fertilidad del 35-38.6 % a la inseminación cervical (Viser y Salamon, 1974).

Entre los dilutores comerciales, destacan el Triladyl®, Triladyl® CSS y Biladyl®, los cuales contienen TRIS, ácido cítrico, azúcar, tampones, glicerina, agua purísima y antibióticos, de acuerdo a la Directiva 88/407 de la Union Europea (UE) (Tilosina, Gentamicina, Estreptomycin, Espectomicina, Lincomicina) Triladyl® CSS no contienen antibióticos (Minitube, 2008).

A pesar de que los dilutores caseros y comerciales ayudan a proteger la membrana acrosomal, al momento de descongelar el semen se obtienen altos índices de daño en el acrosoma (40-50 %). En trabajos previos se ha determinado que el uso de

antioxidantes disminuye el daño acrosomal (Wang *et al.*, 1997; Saleh y Agarwal, 2002; Santiani, 2003; Morani *et al.*, 2004), el cual se relaciona con disminución en la motilidad espermática y la muerte celular (Gillan *et al.*, 1997; Watson, 2000). En este sentido, al agregar antioxidantes al medio de dilución, podrá prevenirse la desestabilización temprana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación y permitirá al espermatozoide criopreservado tener una mayor capacidad fecundante (Ruíz, 2005).

La vitamina E es uno de los antioxidantes más utilizados, cuya función es disminuir la peroxidación lipídica ocasionada por los radicales libres (Membrillo-Ortega *et al.*, 2011). Lo anterior previene la propagación de los mismos en las lipoproteínas plasmáticas y de la membrana espermática (Ross *et al.*, 2010). Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el uso de la vitamina E en el dilutor comercial Triladyl en la integridad acrosomal postcongelamiento del semen ovino.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la adición de la vitamina E al diluyente Triladyl® como antioxidante en la integridad acrosomal, efecto del carnero, características microscópicas, así como la comparación de dos tinciones postcongelamiento del semen ovino.

2.2. Objetivos específicos

Evaluar las características macroscópicas y microscópicas del semen fresco en ovinos Pelibuey.

Determinar el efecto de la edad del carnero en la motilidad masal y motilidad individual en los procesos de dilución, enfriado y descongelado del semen al adicionar vitamina E al dilutor Triladyl.

Analizar características microscópicas del semen ovino utilizando el dilutor Triladyl con vitamina E, durante el enfriado de 30 °C a 5 °C.

Establecer el porcentaje de motilidad masal e integridad acrosomal después del descongelado del semen, considerando la adición de vitamina E al dilutor y edad del carnero.

Comparar el porcentaje de la integridad acrosomal con las tinciones (triple tinción "Spermac" y Eosina/Nigrosina) después del descongelado del semen de carnero.

3. HIPÓTESIS

Al añadir vitamina E al dilutor durante la criopreservación se mejora la motilidad masal y disminuye el daño en la integridad acrosomal del semen ovino descongelado.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Historia de la ovinocultura en México

Las razas ovinas que existen en México, provienen de razas españolas (Lacha, Churra, Manchega, etc.), y sus cruces con diversas razas que han ingresado al país. Las primeras ovejas fueron embarcadas en los puertos de Cádiz y Sevilla (Medrano, 2000). De 1521 a 1821 en México, se introdujeron ovinos provenientes de España; actualmente a este cruce de razas se le denomina ganado autóctono (Perezgrovas, 1998).

En un principio, la ovinocultura en México se desarrolló libremente en espacios abiertos, debido a que las condiciones del clima y amplias praderas le favorecían. A pesar de las muchas razas de ovinos introducidos, ya sea para carne, lana o leche, en la actualidad, el ovino criollo es la base de la ovinocultura nacional. Estos ovinos son el resultado del cruzamiento entre las razas españolas y algunas especializadas en carne (Hampshire, Suffolk, Dorset, Corriedale), de esta forma ganan peso sin perder rusticidad (Romero, 2005).

Actualmente, la población ovina en México es de 8,725,882 cabezas. Los tres estados con el mayor número de cabezas son el Estado de México (1,355,113), Hidalgo (1,128,198) y Veracruz (714,021) (SIAP, 2021). El estado de Oaxaca no figura entre los principales estados productores de carne de ovino a nivel nacional, ya que representa el 4.5 % del inventario nacional ovino, reflejado en 394,301 cabezas de ovinos (SIAP, 2021).

El alto número de cabezas ovinas presentes en México no se satisface la demanda de consumo interno, llegando a importar casi 60 % del consumo nacional de otros países (Australia 61 %, Nueva Zelanda 23 %, Estados Unidos de Norteamérica 1 % y Chile 4 %) (SIAP, 2021).

El ganado criollo, representa la mayor parte del inventario nacional, mientras que las razas bien definidas, corresponden a un pequeño porcentaje disperso entre más de 5,000 productores. La mayoría de los productores ovinos, son de zonas rurales, dedicados al autoconsumo, con rebaños que no superan los 80 animales. Poco más del 34 % del total de ovinocultores viven específicamente de esta actividad (Medrano, 2000). Para los sistemas rurales es muy común o característico el pastoreo diurno y el encierro por las noches, con prácticas de reproducción y alimentación mínimas. En su mayoría únicamente utilizan desparasitantes comerciales como medidas de sanidad, la mano de obra es familiar y nula participación técnica especializada (Medrano, 2000).

4.2. Importancia del semental en la explotación ovina

En una explotación, el 50 % de la producción de corderos recae en los sementales. Se considera que, por cada periodo, a un semental se le asignan de 30 a 50 hembras. Por lo tanto, los sementales tienen mucha más importancia que las hembras dentro de un rebaño (Melling, 2000).

La elección correcta de un semental, dentro de la explotación, es una actividad que requiere de mucha atención. De esta elección no solo depende parte de la

productividad del rebaño, sino también asegurar que las futuras generaciones tengan las características deseables (De la Cruz, 2019).

Para seleccionar un semental, se deben de tener en cuenta los objetivos de la explotación, tanto productivos, como reproductivos, genéticos, etc. El semental que se elija deberá tener un mejor nivel que la población actual, en cuanto a las características que se buscan (De la Cruz, 2019).

4.3. Valoración de sementales ovinos

Las evaluaciones en los sementales, deben de realizarse como una rutina cada que se inicia la temporada de empadre, y no solo cuando se escogerá un nuevo semental. Las valoraciones consisten en diferentes pruebas donde se busca detectar los defectos y padecimientos mediante la vista, la palpación e inclusive pruebas de laboratorio. Para ello existen evaluaciones externas y andrológicas (Hafez, 2002).

Valoraciones externas. Comienza desde la observación de como camina el animal, el tipo racial que presenta (color específico, cuernos, etc.), cojeras o debilidades en las patas, forma en que desempeña su trabajo, color de mucosas que indicaran si tiene anemia, palpación de ganglios linfáticos; en los testículos presencia de inflamación, forma y textura, así como su desplazamiento en la bolsa escrotal (Hafez, 2002).

Valoraciones andrológicas. Son pruebas que se realizan en el laboratorio como el análisis al microscopio. Consisten en observar la coloración y textura del

semen, su volumen, la motilidad, morfología y concentración. Es importante realizar dichas pruebas antes de iniciar el empadre (Duran, 2009).

4.4. Recolección de semen

Dentro de un programa de inseminación artificial la recolección del semen correcta es de suma importancia. Esto implica preparar a los machos para ello a intervalos óptimos de tiempo, entrenamiento sexual y técnicas correctas (Salamon *et al.*, 1990; Hafez, 2002). La preparación de un macho se lleva por lo regular de dos a tres semanas. Los métodos mediante los cuales se recolecta semen en el carnero o semental ovino, son dos: la electroeyaculación (EE) y la vagina artificial (AV) (Hafez, 2002).

4.4.1. Electroeyaculación (EE). Consiste en introducir una sonda eléctrica bipolar previamente lubricada a una profundidad de 15-20 cm del recto del animal. Posteriormente, se administra estimulación eléctrica de bajo voltaje (10-15 volts) durante 2 a 4 segundos, en intervalos de 10 a 20 segundos hasta que ocurra la eyaculación. En este método la concentración y volumen de eyaculado es muy variable. Asimismo, la contaminación con orina es uno de los problemas más frecuentes y es una práctica muy estresante para el carnero. Por ello, solo debe utilizarse en casos extremos, como en machos no adiestrados a la colecta de semen con vagina artificial o por lesiones que imposibilitan al macho a montar (Hafez, 2002; Duran, 2009).

4.4.2. Vagina artificial. Es un artefacto que trata de imitar la vagina de la hembra (Salamon *et al.*, 1990). Este artefacto está constituido por un tubo rígido de 20 a 25 cm de longitud y 5 a 7 de diámetro con una funda de caucho, es necesario lubricar el entreforro y que la temperatura esté entre 42 y 46 °C (Hafez, 2002; Duran, 2009). La vagina artificial provee la temperatura y presión adecuada y estimula el pene del macho, para que ocurra la eyaculación (Salamon *et al.*, 1990). Aunque, representa el método preferido para la recolección de semen en rumiantes, es necesario entrenar al carnero. La mayoría de los animales quedan entrenados en una semana.

4.5. Evaluación del semen

Ninguna prueba por si sola puede predecir con exactitud la fertilidad de una muestra de espermatozoides. El examen de diversas características físicas del semen puede determinar con mayor precisión el potencial de fertilidad (Hafez, 2002). Las pruebas que evalúan el semen se clasifican en macroscópicas y microscópicas. Mediante ellas, se determina si un semental es apto para seleccionarse como reproductor.

4.5.1. Examen macroscópico. Consiste en determinar las características apreciables a la vista del evaluador al considerar los criterios para cada variable (Avalos *et al.*, 2018). Las variables macroscópicas son: el volumen del eyaculado, apariencia y color.

4.5.1.1. Volumen del eyaculado. El volumen del semen varía de acuerdo al método de recolección utilizado. Resultan mayores volúmenes con el electroeyaculador comparado con la vagina artificial, pero demerita en la concentración espermática. Si las muestras se recolectan tres o más veces al día o durante periodos extensos, el volumen disminuye. El volumen es de 0.5 a 2.0 mL en animales maduros, y de 0.5 a 0.7 mL en animales jóvenes (Hafez, 2002). Para medir el volumen del eyaculado, este se recupera en un tubo graduado (Avalos *et al.*, 2009).

4.5.1.2. Color y aspecto del eyaculado. Una vez verificado el volumen del eyaculado, al mismo tiempo se observa el color y aspecto del eyaculado, que va desde acuoso hasta cremoso, y puede ser un indicador de la concentración espermática (Cuadro 1) (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014). El semen del carnero debe ser de color lechoso o crema pálido, el color rosa indica sangre, mientras que el semen gris sugiere contaminación o infección del tracto reproductivo (Hafez, 2002; Duran, 2009).

Cuadro 1. Color y concentración del eyaculado en el carnero.

Aspecto del eyaculado	Concentración espermática aproximada (x10 ⁶ células espermáticas)
Cremoso	≥ 3000
Lechoso	2000-3000
Opalescente	1000-2000
Acuoso	< 1000

Fuente: (Trejo, 2001).

4.5.2. Examen microscópico. El examen microscópico del semen debe efectuarse en los siguientes 15 minutos después de su recolección, con el objetivo de determinar con el mínimo error la movilidad espermática, que puede variar rápidamente por el choque frío, el pH, la morfología espermática y la presencia de elementos extraños, como células epiteliales, leucocitos, grumos de pus, suciedades y otros (Godoy y Rojas, 2011).

En el examen microscópico del semen se evalúa la motilidad masal, motilidad individual progresiva, espermatozoides vivos y muertos, morfología y concentración espermática.

4.5.2.1. Movilidad espermática. Es el examen más importante dentro de la calidad del semen. Se realiza a una temperatura de 35 a 38 °C. Debe evitarse que el semen sufra variaciones de más de 4 °C de temperatura desde la extracción hasta el examen. El movimiento general de los espermatozoides es rectilíneo (Duran, 2009). Las pruebas de movilidad espermática se dividen en motilidad masal y motilidad individual.

4.5.2.1.1. Motilidad masal. En la motilidad masal, se observan remolinos formados por el conjunto de espermatozoides y se clasifican subjetivamente por su intensidad. La clasificación va de 0 a 5, en donde 0 es la ausencia total de movimiento y 5 los remolinos sumamente enérgicos (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014). Para realizar la prueba de motilidad masal, se coloca una gota de semen puro sobre un portaobjetos mantenido a 35 °C, se observa al microscopio con objetivo de 10x.

4.5.2.1.2. Motilidad progresiva individual. La motilidad progresiva individual se refiere a la velocidad con que se desplaza el espermatozoide hacia adelante para llegar al sitio de fecundación. Para calificar esta prueba se da un porcentaje, donde 100 % es un movimiento sumamente veloz y 0 es la ausencia de movimiento (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014). Esta evaluación, se realiza con el semen diluido con una solución isotónica mantenida de 37 a 40 °C. Se debe diluir una gota de semen puro (10 µL) en una gota de citrato de sodio al 2.9 % (10 µL), sobre un portaobjetos mantenido a 35 °C.

4.5.2.2. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muerto, se utiliza la tinción eosina-nigrosina, ya que el colorante es absorbido exclusivamente por células muertas (Durán del Campo, 1993).

La solución de eosina-nigrosina, se prepara con 1 g de eosina más 5 g de nigrosina mezclados en 100 mL de citrato de sodio al 3 % (di-hidratado). Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, se deposita una gota de semen (10 µL) y 10 µL de tintura de eosina-nigrosina en un portaobjetos (37 °C). La mezcla homogeniza rápidamente. Inmediatamente se toca la gota con otro portaobjetos, deslizándolo sobre la superficie del primero para realizar un frotis delgado. La preparación se debe secar con rapidez sobre una flama. Hecho el frotis, se observa al microscopio en un objetivo de 10x y se determina dentro de un campo visual el porcentaje de espermatozoides vivos, los cuales no se colorearán internamente (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014).

4.5.2.3. Morfología espermática. Un espermatozoide debe tener sus tres fracciones bien definidas: cabeza, fracción media y cola (Duran, 2009). Todas las eyaculaciones contienen algunos espermatozoides anormales. Cuando hay 20 % o más de espermatozoides anormales, es necesario cuestionar la fertilidad del carnero. La morfología de los espermatozoides se examina mediante tinción de eosina-nigrosina, mostrando las siguientes categorías:

- a) Sin cola,
- b) Cabezas anormales,
- c) Formación anormal de la cola,
- d) Formación anormal de la cola con inclusión citoplasmica proximal, y
- e) Formaciones anormales de la cola con inclusión distal.

4.5.2.3.1. Anormalidades primarias. Cabeza: piriforme, redondeada, microcabeza, doble, macrocabeza, diadema (inclusiones oscuras como un collar a nivel del segmento ecuatorial).

Pieza media: doble, hinchada, doblada, abaxial, incompleta.

Cola: Enrollada sobre la cabeza.

Se originan mientras los espermatozoides están dentro del epitelio seminífero de los testículos, principalmente se deben a la inmadurez de los espermatozoides, aunque existen otros factores como la variación de temperatura que puede llegar a propiciar estas anormalidades primarias.

4.5.2.3.2. Anormalidades secundarias. Se conoce como anormalidades secundarias cuando existe la presencia de otras células en el semen del macho, por ejemplo: eritrocitos, células epiteliales de la uretra, leucocitos, células epiteliales ciliadas del epidídimo y células espermáticas primarias (Duran, 2009). Se originan durante el pasaje por el epidídimo o mal manejo del eyaculado (Garde *et al.*, 1992).

Cuadro 2. Morfología espermática del semen en el carnero.

Morfología mínima recomendada: 70 % de células normales	
Anormalidades espermáticas primarias	Anormalidades espermáticas secundarias
<ul style="list-style-type: none"> • Subdesarrollados • Cabeza o colas dobles • Defectos acrosomales • Microcéfalos • Macrocéfalos • Cabezas angostas • Defecto cráter/diadema • Cabezas pequeñas anormales • Cabezas sueltas anormales • Piezas medias anormales • Gotas citoplasmáticas proximales • Flagelos plegados o enrollados • Flagelo accesorios 	<ul style="list-style-type: none"> • Gotas citoplasmáticas, mediales y distales • Flagelo doblado simple • Terminación del flagelo plegado <p>Otras células</p> <ul style="list-style-type: none"> • Células epiteliales • Eritrocitos • Células precursoras de esperma • Células redondas • Glóbulos blancos

Fuente: (Hafez, 2002).

4.5.2.4. 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) (Evans y Maxwell, 1990). Las concentraciones de células espermáticas en el eyaculado varían de acuerdo a la especie, en el caso del ovino es de 3.5×10^9 a 6.0×10^9 espermatozoides/mL (Hafez, 2002).

La concentración espermática puede evaluarse por tres métodos, varían en función de la rapidez y exactitud (Evans y Maxwell, 1990), los cuales son:

- 1) Por medio de la apariencia y consistencia del eyaculado (Cuadro 3).
- 2) Determinación por el método de espectofotometría.
- 3) Determinación por la cámara de Neubauer o hematocitometro (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014).

Cuadro 3. Concentración del semen de carnero valorada mediante la consistencia.

Puntuación	Consistencia	Media	Rango
5	Creмоса espesa	5.0	4.5 – 6.0
4	Creмоса	4.0	3.5 – 4.5
3	Creмоса diluida	3.0	2.5 – 3.5
2	Lechosa	2.0	1.0 – 2.5
1	Brumosa	0.7	0.3 – 1
0	Transparente	Insignificante	

Fuente: (Hafez, 2002).

El método según apariencia y consistencia, es una evaluación visual, es subjetivo y se necesita mucha experiencia para realizarlo (Ruther, 2006). Este método es

rápido, pero no preciso. La consistencia del semen está relacionada con la proporción de espermatozoides en el plasma seminal. De acuerdo con el Cuadro 3, las muestras de semen de consistencia cremosa contienen alta proporción de espermatozoides, a diferencia de las muestras transparentes (Evans y Maxwell, 1990).

La determinación por el método de espectrofotometría, mide la densidad espermática, al pasaje de un haz de luz en la muestra de semen y registra la cantidad de luz absorbida por la misma (absorbancia) (Cueto *et al.*, 2016). Es un método rápido y preciso, aunque su costo es elevado comparado con la cámara de Neubauer. El aparato está acompañado de una tabla confeccionada a partir de la curva de turbidez y de la espermática, medida en una cámara cuenta glóbulos.

En la determinación de la concentración espermática por medio de la cámara de Neubauer (hemocitómetro). Se usa una pipeta, la cual es llenada hasta la marca de 0.5 μL de semen y se diluye en un tubo con 2 mL solución salina al 0.3 %. Posteriormente, el tubo se agita horizontalmente de manera suave y se carga una micropipeta con 10 μL de la mezcla. Se coloca la punta de la micropipeta en el borde del cubreobjetos y se deja que la cámara de Neubauer se cargue por capilaridad. Se realiza el recuento bajo un objetivo de 40x del microscopio óptico, previo a ello hay que dejar reposar al menos un minuto antes de iniciar el recuento (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014). Se cuenta cinco cuadros de la cámara de Neubauer, de preferencia los cuatro de las esquinas y el del centro. La fórmula que se aplica es la siguiente:

$$\text{Espermatozoides por mL} = \frac{n \times 400 \times 10 \times 200 \times 1000}{80}$$

Donde:

n = Número de espermas en 80 cuadros pequeños

400 = Número de cuadros pequeños en 1 mm³

10 = 0.10 mm de profundidad de la cámara

200 = Dilución empleada 1:200

1000 = Factor de transformación de mm³ a cm³

80= Número de cuadros pequeños contados

O la siguiente fórmula:

$$CE = X \times 5 \times 10 \times 200 \times 1000$$

CE: Concentración de espermatozoides.

X: Número de espermatozoides contados en los cinco cuadrantes.

5: Número de cuadrantes.

10: Cantidad en 1 mm³ ya que la profundidad de la cámara es de 0.10 mm.

200: Según la dilución realizada para el conteo.

1000: Para obtener la concentración en mililitros.

4.6. Dilución del semen

El semen debe ser diluido para aumentar el volumen y así incrementar el número de hembras a ser inseminadas y el rendimiento reproductivo del semental (Godoy y Rojas, 2011), la motilidad y concentración dictan la proporción a la que se diluye el semen. Pueden utilizarse diluyentes naturales o sintéticos, es importante que la temperatura del diluyente y del semen sea la misma (30 °C) cuando se realiza la dilución (Hafez, 2002).

La dilución del semen se debe realizar tan pronto como se pueda una vez recolectado y analizado de forma rutinaria. Se debe igualar la temperatura del semen y del diluyente, por lo tanto, se colocan en un baño María a 30 °C. La adición del diluyente frío al semen puede ocasionar choque por frío provocando la reducción de la fertilidad. La dilución se realiza pipeteando una cantidad adecuada del diluyente y adicionándola lentamente al tubo donde se encuentre el semen, nunca al revés porque se reduciría la motilidad por alguna alteración en el semen. Después de adicionar el diluyente se agita de manera suave y se examina al microscopio para comprobar la motilidad de los espermatozoides (Buitrago y Pérez, 2008).

El grado de dilución dependerá del número de espermatozoides y volumen requerido para la inseminación. Los volúmenes recomendados para la inseminación son los siguientes:

- a) Inseminación vaginal de 0.25-0.50 mL y dosis de 150 a 400 millones de espermatozoides con semen fresco diluido.

- b) Inseminación cervical de 0.25-0.50 mL y dosis de 100, 150 y 300 millones de espermatozoides con semen fresco, enfriado y refrigerado, respectivamente.
- c) Inseminación transcervical de 0.25-0.50 mL y dosis de 80 a 150 millones de espermatozoides con semen congelado (Cueto *et al.*, 2016).
- d) Inseminación intrauterina de 0.25 mL y dosis de 40 a 50 millones de espermatozoides por mL con semen congelado.

4.6.1. Componentes de los diluyentes. Los dilutores de semen están compuestos por diferentes sustancias que cumplen las siguientes funciones (Hafez, 2000):

- a) Proveer nutrientes como fuente de energía
- b) Proteger a los espermatozoides del efecto dañino del enfriamiento
- c) Mantener un adecuado equilibrio del pH
- d) Mantener una adecuada presión osmótica y balance electrolítico
- e) Inhibir el crecimiento bacteriano
- f) Incrementar el volumen del semen para que pueda ser usado para múltiples inseminaciones y,
- g) Proteger a los espermatozoides durante el congelamiento.

4.6.2. Tipos de diluyentes. Para diluir el semen antes del congelamiento se pueden utilizar diluyentes no comerciales y diluyentes comerciales (Cueto *et al.*, 2016).

Para elaborar los diluyentes no comerciales se tienen que adquirir cada uno de los ingredientes y pesarse con precisión en el laboratorio. Los diluyentes comerciales, se adquieren casi listos para su uso y los resultados son más consistentes.

4.6.2.1. Diluyentes no comerciales. Los diluyentes más ampliamente utilizados son elaborados a base de leche descremada deshidratada reconstituida y de glucosa (0.5 M), o a base de Tris-Glucosa-Ácido cítrico-Yema de huevo (Salamon y Ritar, 1982).

4.6.2.2. Diluyentes basados en citrato, azúcar (monosacáridos) y diluidos en leche. La combinación de buffer citrato con azúcar, sirven para proveer un medio isotónico para semen fresco o refrigerado (Salamon y Maxwell, 1995b). La leche ha sido utilizada como parte del diluyente para semen ovino, porque se ha observado que, el semen conserva la capacidad de fertilización por 14 a 16 horas a 15 °C, obteniendo de un 65 a 75 % de pariciones en ovejas (De Lucas y Arbiza, 2004). A este diluyente también se le agregan antibióticos (penicilina, estreptomycin y sulfanilamidas) y otras sustancias en forma rutinaria.

4.6.2.3. Diluyentes basados en di o trisacáridos (lactosa, sacarosa o rafinosa) y bufferes orgánicos (tris) u otros componentes. Los di o trisacáridos, no pueden ser metabolizados por el espermatozoide, proporcionan una acción crioprotectora, principalmente como una molécula relativamente grande que contribuye a mantener un balance osmótico y actúa como sustituto de electrolitos. No son capaces de penetrar la membrana espermática y probablemente disminuyen los efectos de la concentración de solutos durante la congelación y descongelación. Asimismo, proporcionan mejores resultados cuando se agregan al semen antes de la congelación y no están presentes en la primera fracción del diluyente (López, 2014).

4.6.2.4. Agentes protectores para los diluyentes (yema de huevo, glicerol y otros). Los agentes crioprotectores más utilizados en el proceso de congelamiento de semen son la yema de huevo y el glicerol (Salamon y Maxwell, 1995b).

En la actualidad existen en el mercado varios diluyentes comerciales listos para ser utilizados en la congelación de semen de ovino. Entre algunos de ellos, se tiene a: Triladyl, Biladyl, Andromed, Bioexcell, Biociphos, entre otros, con resultados óptimos y constantes tasas de fertilidad (Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014).

Triladyl. Es un dilutor comercial fabricado en Alemania, por el laboratorio Minitube. Este es un concentrado para la preparación de un diluyente lito para el uso de un solo paso, que está basado en Tris (Hidroxi-metil-aminometano, un amortiguador sintético) y además contiene agua bidestilada, glicerol, ácido cítrico, fructosa y por cada 100 mL contiene los siguientes antibióticos: 5 mg tilosina, 25 mg gentamicina, 30 mg espectinomicina y 15 mg lincomicina. Para su preparación se adicionan tres partes de agua bidestilada, una parte de yema de huevo y una parte del concentrado comercial (Minitube, 1993).

Biladyl. Es fabricado en Alemania por la misma empresa que produce el Triladyl. Es un dilutor que se prepara en dos pasos, está constituido por una fracción “A”, “B” (con glicerol) y una última “C” con antibióticos (Minitube, 2008).

Andromed. Es un diluyente a base de lecitina de soya. Pertenece a la nueva generación de medios para diluir semen. Está libre de ingredientes de origen animal

y fue hecho para la congelación de semen bovino. Este diluyente ha sido probado en bovinos, se ha logrado tasas de no retorno hasta por 2.6 % mayores que los diluyentes convencionales preparados a base de yema de huevo. Posee 67.85 % y 70.45 % tasa de retorno con los preparados a base de yema de huevo y los que no contienen yema de huevo, respectivamente (Minitube, 2008). En ovinos existen poca información con este diluyente.

4.7. Conservación del semen ovino

El procesamiento del semen enfriándolo a 5 °C es similar, ya sea que se use congelado o sin congelar. El semen se colecta a la temperatura corporal. Después de la obtención debe mantenerse tibio (30 °C) antes de la dilución, para evitar el choque por frío. Esto se logra colocando el semen y diluyente en un baño de agua que se mantiene a 30 °C. Luego se extrae una parte del semen y lo demás puede mezclarse con el diluyente, se recomienda mantener la temperatura por unos 30 minutos. Posteriormente la mezcla se enfría gradualmente hasta llegar a 5 °C. Normalmente se lleva alrededor de una hora para llevar la temperatura de 30 a 5 °C (Hafez, 2002), es decir para el proceso de enfriado del semen tarda aproximadamente una hora.

El semen puede utilizarse como semen fresco, semen enfriado y semen congelado.

Semen fresco. El semen fresco sin diluir y mantenido a temperatura ambiente se conserva algunas horas (1.5-2 h). Si la muestra se conserva en un baño María a 30 °C, el semen fresco y diluido puede mantener su viabilidad hasta 24 horas tras la obtención.

Semen enfriado. El semen diluido es enfriado a 15 °C, siguiendo una curva de enfriamiento a razón de 2 °C cada 3 minutos aproximadamente. De esta forma el semen puede conservarse por un periodo de 8 horas (Cueto *et al.*, 2016).

Semen refrigerado. El semen enfriado a 5 °C prolonga su vida útil durante varios días e incluso una semana. Se debe mezclar con un diluyente que contenga un componente que proteja a los espermatozoides del choque por frío, como la yema de huevo.

Semen congelado. La congelación del semen a -196 °C permite la conservación del semen por tiempo indefinido.

4.7.1. Congelamiento de semen. El semen de carnero puede ser congelado en comprimidos (pellets) o en pajillas con diluyente a base de leche, yema-lactosa o yema-tris. El semen colectado se enfría a 5 °C, se le agrega 5 mL de glicerol para preparar 100 mL de diluyente (Cueto *et al.*, 2016). Se deja reposar por 2 horas, antes de congelarlo en forma de pellets de 0.1 a 0.4 mL en hielo seco o en pajillas (0.25 o 0.5 mL). El almacenamiento se realiza en nitrógeno líquido a -196 °C (Hafez, 2002).

4.8. Descongelamiento del semen

El descongelamiento del semen se realiza a una temperatura de 36 °C, si el semen fue congelado en pastillas, su descongelamiento puede llevarse a cabo en tubos de hemólisis secos mantenidos a 36 °C en baño termostático. Después se agitan durante un minuto dentro del baño para asegurar un descongelamiento homogéneo.

Si el congelamiento se realizó en pajuelas estas serán sumergidas en baño termostático a 36 °C, moviéndolas con una pinza durante 15 segundos bajo el agua (Duran, 2009).

4.8.1. Integridad acrosomal en semen descongelado. El acrosoma está ubicado en la cabeza del espermatozoide. Es un organelo membranoso que contiene distintas enzimas hidrolíticas. Determinar si existe o no daño en la membrana acrosomal al momento de utilizar el semen es un parámetro muy importante ya que al romperse la membrana el acrosoma queda expuesto a la membrana plasmática, disminuyendo los niveles de fertilidad (Patrat *et al.*, 2000). Esto se debe a que los espermatozoides son muy susceptibles a bajas temperaturas, lo que ocasiona cambios en la estructura y función celular relacionada con el choque por frío, incluyendo cambios en el acrosoma después de la descongelación (Ollero *et al.*, 1996).

Por lo tanto, es importante valorar la integridad acrosomal de los espermatozoides para evaluar la capacidad fecundante de un eyaculado (Osorio *et al.*, 2007) y predecir la fertilidad del macho.

Diversas técnicas se han utilizado desde hace mucho tiempo que permiten realizar la valoración de la integridad acrosomal, entre las que destacan los métodos fluorescentes realizados con sustancias caras y equipo especializado (Restrepo *et al.*, 2016). También se incluyen los métodos más accesibles y de rutina, que se basan en colorantes o tinciones, que sólo se requieren un microscopio de contraste de fases. Entre estos últimos métodos se pueden mencionar: Eosina-Nigrosina,

Eosina-Verde rápido, Tinción triple, Tinción Spermac y tinción de Giemsa (Bernardi *et al.*, 2011; Restrepo *et al.*, 2013).

4.9. Radicales libres y antioxidantes en el semen ovino

4.9.1. Radicales libres. Los radicales libres son átomos o moléculas que contienen un electrón no apareado y se comportan como moléculas altamente reactivas (Hicks *et al.*, 2006; Villa-Arcila y Ceballos-Márquez, 2007), que pueden reaccionar con muchas moléculas de la célula y producir un daño no controlado. También tienen un papel fundamental en el metabolismo normal de la célula (Carrillo *et al.*, 2016). Durante la criopreservación, los espermatozoides ovinos llegan a ser susceptibles a bajas temperaturas, debido a daños en la membrana, que son ocasionados por una producción excesiva de radicales libres, responsables del daño oxidativo (Ball *et al.*, 2001a) que son perjudiciales para los espermatozoides (O'Flaherty *et al.*, 1997). Esto provoca que disminuyan los niveles de defensas antioxidantes después del proceso congelación/descongelación (Bilodeau *et al.*, 2000). Lo que se refleja en la pérdida de la capacidad fertilizante en espermatozoides ovinos (Salamon y Maxwell, 1995a), debido a que las especies oxígeno-activas (ROS), inducen una reacción en cadena, provocando un rompimiento de dobles enlaces en los lípidos de las membranas (Wang *et al.*, 2001).

4.9.2. Antioxidantes. Un antioxidante, es una sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones, en relación a las del sustrato oxidable, retrasa considerablemente o inhibe la oxidación de dicho sustrato (Hicks *et al.*, 2006).

Los antioxidantes se clasifican en endógenos enzimáticos y exógenos no enzimáticos, de acuerdo a su estructura química y función biológica (Villa-Arcila *et al.*, 2007).

Algunos antioxidantes endógenos enzimáticos son: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y el glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otras. Dentro de los antioxidantes exógenos no enzimáticos se tienen a: el glutatión en su forma reducida (GSH), algunos minerales como el selenio, zinc, o vitaminas como riboflavina, vitamina C (ácido ascórbico), tocoferol (Vitamina E), que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes.

Aditivos adicionados en los diluyentes en este caso los antioxidantes, durante el proceso de criopreservación reducen el daño oxidativo (Santini, 2003). Existen varios estudios en donde se han utilizado diversos antioxidantes, Ruíz (2005), trabajó con dos antioxidantes como son, 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempo) y 4-hidroxi 2,2,6,6 tetrametil-1-piperidiniloxil (Tempol), como antioxidantes para mejorar la conservación del semen ovino. El autor demostró que el uso de Tempo 0.5 mM en un dilutor en base a Tris, mejora la capacidad fecundante del semen criopreservado.

4.9.2.1. Vitamina E como antioxidante. La vitamina E tiene muchas funciones en el organismo. Algunas de ellas son las siguientes: efecto de antioxidante por lo que protege a la vitamina A, se le asocia con el desarrollo normal de los epitelios germinativos del aparato reproductor femenino y masculino, conserva la función fisiológica de órganos vitales como hígado, cerebro y músculo

cardíaco. La vitamina E se considera como el antioxidante más importante. Actúa removiendo las especies de oxígeno reactivo durante el estrés oxidativo, evitando la peroxidación de las membranas celulares y el daño del endotelio vascular (Lerne y Urbina, 2008).

También, tiene la capacidad de eliminar radicales hidropéroxilos lipídicos, romper la cadena de oxidación, lo que previene la propagación de los radicales libres en las lipoproteínas plasmáticas y de membrana (Ross *et al.*, 2010).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización del experimento

El estudio se realizó en la Posta Zootécnica de la Universidad del Papaloapan, *campus* Loma Bonita, Oaxaca, entre los meses de noviembre a abril. El lugar está ubicado en las coordenadas geográficas 18° 01' 19" LN y 95° 51' 33" LO, a una altura de 25 msnm. El clima del lugar es cálido húmedo con lluvias abundantes en verano; con precipitación y temperatura media anual de 1,845 mm y 24.7 °C, respectivamente (INEGI, 2015).

5.2. Animales utilizados

Se utilizaron dos carneros de la raza Pelibuey, de 1 y 2 años de edad respectivamente, con un peso corporal promedio de 60 kg de peso vivo y una condición corporal (CC) de 3.5-4 (en escala de 1-5) (Russel, 1969; Romero, 2015). Los animales exhibieron un adecuado estado de salud a la exploración clínica. En total se realizaron 20 colectas de semen por carnero, todas fueron hechas en un horario de 7:00 a 7:30 a.m.

5.3. Manejo de la alimentación

Los carneros fueron alimentados diariamente con 500 g de alimento comercial (Ovina 14; Purina®), 5 kg de forraje verde (*Cynodon nlemfuensis*) y agua a libre acceso (*ad libitum*). La dieta se suplementó con sales minerales (Fosforisal B; Purina®) cada 3 días durante el tiempo que duró la colección de eyaculados.

Los carneros se alojaron de manera individual en sementaleras de 1 m de ancho x 2 m de largo, construidas con techo de lámina de zinc, piso de tierra y con malla

ciclónica para dividir los corrales. Cada sementalera tiene una puerta, un bebedero y un comedero.

5.4. Manejo sanitario

Una semana antes del inicio de la fase experimental cada animal se desparasitó con 3 mL de Levamisol® (L-vermizol; Aranda) vía intramuscular y 1 mL de ivermectina al 5 %® (Ivermectina 5%, laboratorio Forti) vía subcutánea, repitiendo una segunda dosis a los 15 días con la finalidad de tener a los carneros en óptimas condiciones durante toda la fase de colección de eyaculados.

Además, los carneros fueron vacunados previo a iniciar el experimento con Bacterina toxoide 8 vías® (laboratorios Pier), (2.5 mL c/u, vía intramuscular), para prevenir enfermedades clostridiales y pasteurelosis.

5.5. Recolección de semen

La recolección del semen se realizó con vagina artificial, siguiendo el método establecido por Hafez (2002). Cada muestra obtenida se analizó macroscópica y microscópicamente.

Se hicieron dos recolecciones de semen por semana por cada carnero (martes y jueves), durante un periodo de dos meses y medio. El semen se evaluó en fresco y después se dividió en dos fracciones, una de ellas fue diluida solo con el dilutor Triladyl® y la otra porción con Triladyl más vitamina E.

En total, se realizaron 20 colectas (eyaculados) por semental, todas fueron hechas en un horario de 7:00 a 7:30 a.m.

5.6. Evaluación de semen fresco

Después de la recolección del semen, se evaluaron las características macroscópicas como el volumen y color. Según lo establecido por Duran (2009), el volumen del eyaculado fue medido directamente del tubo colector graduado y la evaluación del color y apariencia del semen se realizaron bajo las categorías: cremoso, lechoso y acuoso considerados por Sorensen (1982).

Para la evaluación microscópica se analizaron las variables de: motilidad masal, motilidad individual, porcentaje de vivos y muertos, anomalías y concentración, según el procedimiento (Sorensen 1982; Hafez, 2002; Cortez-Romero y Gallegos-Sánchez, 2014).

- ✓ **Color del eyaculado:** se evaluó desde un color cremoso lechoso hasta un color transparente, tomando como mejor valor el que mostró una coloración cremoso lechoso.
- ✓ **Volumen del eyaculado:** fue medido por medio de la graduación del tubo colector plástico de 5 mL.
- ✓ **Motilidad masal:** se midió a través de un microscopio óptico (Optika, B-159), al observar el movimiento de los espermatozoides de una gota de semen fresco se designó el valor correspondiente.
- ✓ **Motilidad individual:** se ocupó una solución de citrato al 3%, se colocó una gota de semen fresco sobre un porta objetos y una gota de la solución de citrato, se homogenizaron y se observaron al microscopio con el objetivo de 10x y 40x.

- ✓ **Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos:** fue medido al utilizar un colorante a base de eosina-nigrosina, de un total de 100 espermatozoides contados los que se tiñeron del color de la eosina fueron considerados como muertos.
- ✓ **Concentración espermática:** se analizó mediante una cámara de Neubauer, se tomaron 10 microlitros de semen y se depositaron en un tubo graduado con 0.9 mL de solución salina al 3 %, de esta mezcla resultante se tomaron 10 microlitros para llenar la cámara de Neubauer y se observó al microscopio contando los cuadrantes de las cuatro esquinas y el cuadrante del centro.

5.7. Tratamientos en estudio

El experimento consistió en la evaluación de dos tratamientos. El tratamiento 1 (T1) consistió en el dilutor Triladyl® adicionado con la vitamina E, y el tratamiento 2 (T2) o testigo que contenía sólo Triladyl® (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ingredientes de los dilutores para conservar semen ovino.

Ingredientes	Dilutor Triladyl + Vitamina E (T1)	Dilutor Triladyl (T2)
Triladyl	5 mL	5 mL
Perlas de vitamina E	1 (5 mg)	
Yema de huevo	1.5 mL	1.5 mL
Agua destilada	Aforar a 8 mL	Aforar a 8 mL

La elaboración del dilutor Triladyl adicionado con vitamina E consistió en mezclar 2.5 mL de Triladyl, 1 perla de vitamina E, 1.5 mL de yema de huevo y agua destilada hasta aforar a 8 mL.

5.8. Dilución del semen

El semen colectado por cada carnero se dividió en dos porciones iguales, cada una de ellas se mezcló con cada dilutor a evaluar, respectivamente. La cantidad de dilutor que se agregó se obtuvo con base a la fórmula descrita por Sorensen, 1982.

$$cant. dilutor = \left(\left(\frac{VE * CEE}{CEP} \right) * VP \right) - VE$$

Donde:

VE= Volumen del Eyaculado

CEE= Concentracion Eyaculado

CEP= concentración de la pajilla

VP= Volumen pajilla

El número de pajillas obtenidas dependió del volumen de eyaculado y de la concentración espermática de cada eyaculado en forma fresca. Cada pajilla tuvo una concentración de 100×10^6 millones de espermatozoides.

5.9. Descenso de la temperatura del semen

La temperatura del semen diluido se llevó de 36 °C a 5 °C según lo establecido por Hafez (2002), a esta temperatura se da el enfriamiento del semen. Se utilizó un baño María (Marca Torrey) a una temperatura de 35 °C, se colocó un vaso de precipitado (250 mL) con agua donde se colocó el tubo con el semen diluido, con la finalidad de bajar gradualmente la temperatura, se agregó hielo poco a poco (descenso de 1 °C cada minuto).

Al descender la temperatura cada 5 °C, se tomó una muestra para evaluar su motilidad masal e individual, en un microscopio de amplio espectro (Optika, B-159), con la finalidad de verificar que el semen estuviera vivo y continuar con el descenso de temperatura, basado en el protocolo de Hafez (2002).

5.10. Congelado del semen

Después del descenso de la temperatura a 5 °C, el semen enfriado se colocó a refrigeración a 5 °C para cumplir la fase de equilibrio, de acuerdo a Evans y Maxwell, (1990) la cual va de 2-6 h. En el experimento se consideró un tiempo de equilibrio de 4 h. Luego con una micro pipeta se tomó una gota de semen de cada tubo, para evaluar la motilidad individual y masal, posteriormente se empajilló el semen utilizando pajillas de 0.25 mL, cada pajilla se selló con alcohol polivinílico.

A continuación, las pajillas, se colocaron dentro de una hielera de unicel, se agregó nitrógeno líquido cubriendo una altura de 4 cm del fondo hacia la parte superior, las

pajillas se colocaron de forma horizontal y se sostuvieron en un rack diseñado a una altura de 10-13 cm del nivel de nitrógeno, durante un periodo de 8 minutos.

La finalidad de exponer el semen a los vapores de nitrógeno es descender la temperatura a $-79\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Pasado el tiempo de 8 minutos, se soltaron las pajillas en el nitrógeno líquido dentro de la hielera de unicel, se tomó una muestra de una pajilla por cada tubo para analizar la motilidad individual, la motilidad masal y espermatozoides vivos y muertos, las demás muestras fueron colocadas en gobelets etiquetados y guardadas en un tanque de nitrógeno líquido de 20 kg, para su posterior análisis en el Laboratorio Químico-Biológico de la Universidad del Papaloapan, *campus* Loma Bonita.

5.11. Descongelamiento de pajillas

La evaluación del semen congelado se realizó a los 30 días posteriores al congelado, las pajillas conservadas en el tanque de nitrógeno líquido fueron descongeladas una por una. Se introdujeron en un vaso de precipitados de 600 mL con agua a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 segundos. Cada pajilla fue secada con papel absorbente y luego se cortaron por un extremo para evaluar el daño acrosomal, para ello, se utilizó dos colorantes diferentes (eosina-nigrosina y triple tinción-Spermac).

Por cada eyaculado se congelaron 10 pajillas y consecutivamente se descongelaron 5 pajillas para evaluar motilidad masal y el daño acrosomal.

5.12. Evaluación de la motilidad y daño acrosomal del semen congelado con el colorante Eosina-Nigrosina

Se colocó una gota de semen de cada pajilla descongelada en un portaobjetos calentado a 37 °C para evaluar la motilidad masal. A continuación, se colocó una gota de semen sobre otro portaobjetos y se mezcló con una gota de colorante eosina-nigrosina realizando un frotis, el cual fue secado en una platina térmica y se observó al microscopio para hacer el recuento de células teñidas (100 células por campo visual), para observar el daño acrosomal y obtener el porcentaje.

5.13. Evaluación de pajillas descongeladas con el colorante Spermac triple tinción

Esta tinción se realizó para tener una mejor evaluación de la integridad del acrosoma, de acuerdo a la literatura la fijación de la muestra permite una mejor visualización del acrosoma, así mismo, hacer una comparación con la tinción eosina-nigrosina.

De las 5 pajillas descongeladas se escogieron dos al azar para elaborar la triple tinción, una vez descongelada la pajilla se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos calentado en una platina térmica a 37 °C.

Se realizó un frotis sobre el portaobjetos, se dejó secar en una platina térmica a 37 °C durante 5 minutos para después meterlo en una caja Petri con el fijador, en esta caja permaneció 5 minutos. Enseguida fue colocado en una platina térmica a 35 °C durante 15 minutos, luego se sumergió en una caja de Petri con el colorante rojo

durante 3 minutos, al sacarlo se secó la parte posterior y se pasó a otra caja Petri con el colorante B o verde claro por un tiempo de 2 minutos.

Transcurrido el tiempo fue sumergido en el colorante C o verde oscuro por 2 minutos, por último, se lavó en agua destilada, se dejó secar y se realizó el conteo y observación al microscopio de cada frotis.

5.14. Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron para semen fresco fueron:

- ✓ **Color del eyaculado:** se valoró desde un color cremoso lechoso hasta un color transparente, se consideró como mejor valor el que tenía la coloración cremoso lechoso.
- ✓ **Volumen del eyaculado:** fue medido por medio de la graduación del tubo colector en mililitros (mL).
- ✓ **Motilidad masal:** se analizó a través de un microscopio óptico, al observar el movimiento de los espermatozoides de una gota de semen fresco se designó el valor correspondiente. El valor se mide en escala de 0 a 5, teniendo como óptimo un 5 para mayor movilidad y 0 para movimiento nulo, lo que se observa es el movimiento en forma de remolinos.
- ✓ **Motilidad individual:** se utilizó una solución de citrato al 3 %, se colocó una gota de semen fresco sobre un portaobjetos y una gota de la solución de citrato, se homogenizó y se observó al microscopio en el objetivo de 10x y 40x. Se expresa en porcentaje.

- ✓ **Vivos y muertos:** se valoró con colorante de eosina-nigrosina, de un total de 100 espermatozoides contados los que se tiñeron del color de la eosina fueron considerados muertos. El valor se expresa en porcentaje (%).
- ✓ **Concentración espermática:** cada eyaculado se analizó mediante una cámara de Neubauer, se tomaron 10 μ L de semen y se depositaron en un tubo graduado con 0.9 mL de solución salina al 3 %, de esta mezcla resultante se tomaron 10 μ L para llenar la cámara de Neubauer y se observó al microscopio contando los cuadrantes de las cuatro esquinas y el cuadrante del centro.

Semen diluido y enfriado fueron:

- ✓ **Motilidad masal:** esta variable se analizó bajo el mismo procedimiento que para semen fresco. Se mide en una escala de 0 a 5.
- ✓ **Motilidad individual:** esta variable se evaluó bajo el mismo procedimiento que para semen fresco. Se expresó en porcentaje.

Semen descongelado fueron:

- ✓ **Motilidad masal:** después del descongelado se valoró bajo el mismo procedimiento que para semen fresco y semen diluido. Se expresa en una escala de 0 a 5.
- ✓ **Daño acrosomal:** se refiere al daño que sufre el acrosoma del espermatozoide durante la congelación, su evaluación se realizó mediante dos colorantes, eosina-nigrosina y el colorante triple tinción, y hacer una comparativa entre ambos colorantes. Se enumera en porcentaje.

5.15. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 2X2, se consideró a los sementales y diluentes como factores. Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza y las diferencias entre medias se obtuvieron mediante la prueba de Tukey con una significancia de 0.05 ($p \leq 0.05$). Se utilizó el programa estadístico SAS (SAS, 2010). Las variables que se expresan en porcentaje fueron sometidas a una transformación de arcoseno para tener igualdad de varianza y distribución normal, antes de efectuar el análisis estadístico.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + C_j + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = variables a evaluar.

μ = media poblacional.

T_i = efecto del i -ésimo tratamiento (dilutores).

C_j = efecto del j -ésimo bloque (carnero).

ε_{ij} = error experimental de la unidad j en el tratamiento i .

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Características macro y microscópicas del semen fresco

Los resultados obtenidos para semen fresco de carneros se muestran en el Cuadro 5. Se observa que no se encontraron diferencias ($p \geq 0.05$) en el volumen de eyaculado (V), motilidad masal (MS), motilidad individual (MI) y vivos y muertos (VM). En la concentración espermática (CE) se observó una diferencia significativa ($p \leq 0.05$), lo que indica que el carnero de 2 años (C2), tuvo mayor concentración espermática con respecto al carnero de un año (C8).

Cuadro 5. Evaluación macroscópica y microscópica de semen fresco en ovinos Pelibuey.

CARNERO	N	V (mL)	CE ($\times 10^6$)/mL	MS	MI	VM
C2	20	0.85 ^a	3,636.0 ^a	5.0 ^a	98.9 ^a	99.9 ^a
C8	20	0.92 ^a	2,986.0 ^b	4.9 ^a	97.4 ^a	99.9 ^a

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). N= número de eyaculados totales; V= volumen de eyaculado (mL); CE= número de espermatozoides en 1 mL de eyaculado; MS= motilidad masal; MI= motilidad individual (%); VM= vivos y muertos en cada eyaculado (%).

En la raza Corriedale, se obtuvieron volúmenes de eyaculados que van de 1.4 mL, 1.7 mL, y 1.5 mL, para ovinos con edades de 1.7, 2.7 y 4.5 años, respectivamente, no existieron diferencias de acuerdo a la edad de los ovinos, debido a que estos según el autor, se encontraban en una etapa de reproducción activa (Ramos *et al.*,

2017). En la raza Black Belly se reportó un volumen de eyaculado de 1.25 mL en ovinos de cuatro años de edad (Palacios, 2005).

El valor obtenido en este estudio referente al volumen de eyaculado está dentro del rango de 0.75 a 2 mL por eyaculado en ovinos (Sathe y Shipley, 2014; Cueto *et al.*, 2016). Los resultados en motilidad masal y motilidad individual contrastan con los reportados por Buitrago y Pérez (2008), valores de 4 a 5 y 80 %, respectivamente, quienes utilizaron machos con edades de 1 y 2 años de edad, esto indica que, en ovinos, independientemente de la edad, los machos evaluados pueden utilizarse como sementales y ser aptos para criopreservar el semen.

El porcentaje de motilidad individual obtenido en la presente investigación está dentro del rango considerado como bueno a partir de 90 % de motilidad individual en eyaculados de semen ovino de acuerdo con Palacios (2005).

En el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$). Lo recomendado para catalogar un buen semen es aquel que posee de 70 % a 80 % de espermatozoides normales. Los valores obtenidos en este estudio, fueron superiores a estos porcentajes (99.9 %). De acuerdo a Evans y Maxwell (1990), la muestra de un eyaculado de semen de un macho reproductor o carnero no debe mostrar un porcentaje mayor de 15 % a 20 % de espermatozoides coloreados o muertos. La concentración espermática se halló en $3,636 \times 10^6$ y $2,986 \times 10^6$ espermatozoides/mL (spz/mL), en los carneros C2 y C8, respectivamente. Aguirre *et al.* (2007), reportaron en la raza Pelibuey $3,880 \times 10^6$ spz/mL, en carneros de la raza Black Belly se ha reportado $2,108 \times 10^6$ spz/mL y en

la raza Assaf $2,892 \times 10^6$ spz/mL (Cabrera *et al.*, 2010). López *et al.* (2017), obtuvieron una concentración de $2,964 \times 10^6$ spz/mL en muestras seminales frescas de carneros Pelibuey. Las diferencias en la concentración espermática, puede deberse a diversos factores como la edad, nutrición, salud del carnero, factores medioambientales, manejo, estación en la cual se realizó la colección, entre otros (Melling y Alder, 2000). De acuerdo con Garner y Hafez (2000), las características macroscópicas y microscópicas varían dependiendo del estado sanitario, nutricional o influencia del ambiente en el semen ovino.

En el presente estudio, el carnero de dos años tuvo una mayor concentración espermática. Lo anterior indica que la edad influyó sobre esta variable de calidad espermática y que los machos de mayor edad producen más espermatozoides por mL de eyaculado que los animales jóvenes. La variación obtenida en la concentración espermática con respecto a la edad coincide con lo mencionado por Salisbury *et al.* (1982), quienes sostuvieron que la concentración aumenta con la edad y tamaño del animal.

Cabe resaltar que pueden hacerse más trabajos al respecto, y se recomienda utilizar un número mayor de animales, o con diferentes rangos de edades para obtener un dato más certero.

6.2. Motilidad masal e individual en semen diluido y enfriado a 5 °C en ovinos

Pelibuey

Los valores obtenidos para ambos carneros no reflejan diferencias significativas en la motilidad masal e individual para el semen diluido y enfriado a 5 °C (Cuadro 6). La edad no influyó al diluir o enfriar el semen utilizando el dilutor Triladyl sin adición de vitamina E, aunque la motilidad masal e individual si disminuyó por acción de la adición del dilutor y del proceso de enfriado comparada con la motilidad obtenida al momento de extraer el semen fresco (Cuadro 5).

Los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos por Ramos *et al.* (2017), quienes mostraron 74.33 % y 64.50 % de motilidad individual con semen diluido y semen enfriado, respectivamente, al usar el dilutor triladyl, en ovinos Corriedale.

Cuadro 6. Evaluación de la motilidad masal e individual del semen diluido y enfriado de carneros ovinos de la raza Pelibuey utilizando el dilutor Triladyl sin adición de Vitamina E.

CARNERO	N	MSD	MID (%)	MSE	MIE (%)
C2	40	4.74 ^a	91.4 ^a	4.0 ^a	76.9 ^a
C8	40	4.70 ^a	89.9 ^a	3.8 ^a	74.8 ^a

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). N= número de eyaculados; MSD= motilidad masal al realizar la dilución a 36 °C, MID= motilidad individual al realizar la dilución, MSE= motilidad masal al enfriado a 5 °C, MIE= motilidad individual enfriado 5 °C.

El descenso de la motilidad individual en el proceso de dilución y enfriado a 5 °C podría deberse a un aumento en el daño de la membrana, debido a una mayor actividad metabólica inicial en respuesta a la dilución (Johnson *et al.*, 2000). Por su parte, El-Sisy *et al.* (2007) mencionaron que el estrés oxidativo causado por exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), está relacionado con una disminución de la motilidad y viabilidad espermática.

6.3. Motilidad masal e individual en el semen descongelado de ovinos Pelibuey

La respuesta obtenida en la motilidad masal e individual en el semen descongelado de ambos carneros no reflejaron diferencias significativas ($p \geq 0.05$) (Cuadro 7). Los resultados en este estudio son menores a los reportados por Hafez (2002), sin embargo, quedan en el límite de los valores satisfactorios que se consideran en los eyaculados después de ser criopreservados (Hafez 2002).

De los 40 eyaculados por tratamiento (20 eyaculados por carnero) los valores son satisfactorios, ya que, los valores de motilidad individual no se encontraron por encima de los rangos adecuados se ha probado que los eyaculados hasta con 15 % de motilidad individual llegan a ser fecundantes (Avalos *et al.*, 2009).

Cuadro 7. Motilidad masal e individual en el semen descongelado de carneros de la raza Pelibuey.

CARNERO	MSDS	MIDS (%)
C2	2.16 ^a	30.1 ^a
C8	1.93 ^a	26.9 ^a

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). MSDS= Motilidad masal del semen después del descongelado, MIDS= Motilidad individual del semen después del descongelado.

6.4. Motilidad masal y motilidad individual entre los procesos de dilución, enfriado y descongelado del semen ovino de la raza Pelibuey

La comparación entre los procesos de dilución, enfriado y descongelado del semen, muestran que la motilidad masal en la dilución desciende de 4.7 a 2.5 al descongelado (Figura 1), y la motilidad individual de 98 % obtenida en la dilución descendió a 28.5 % al descongelado (Figura 2), estos resultados tienen una tendencia similar a la encontrada por Buitrago y Pérez (2008), donde la motilidad masal descendió de 4.8 a 3.8 y la motilidad individual de 80.33 % y 80 % a 44.2 % y 40.8 %, respectivamente.

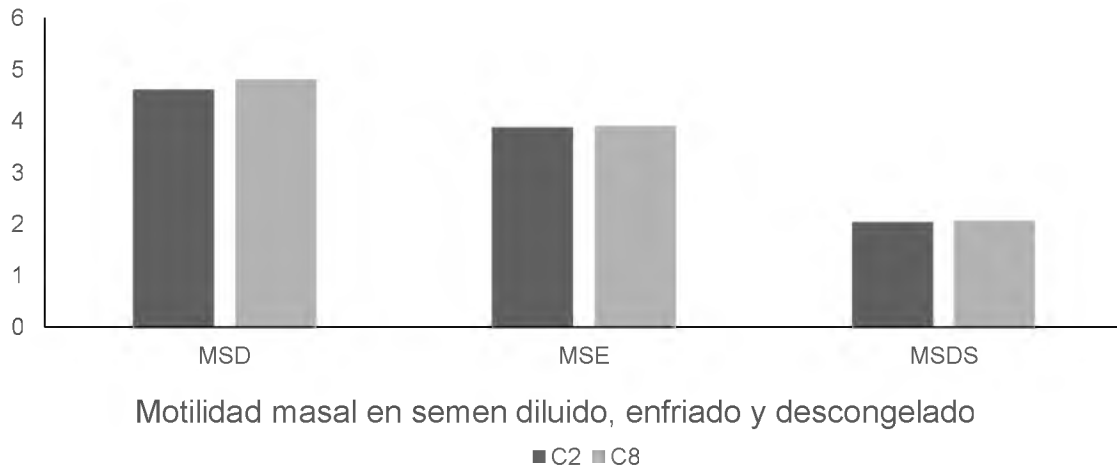


Figura 1. Motilidad masal a la dilución, enfriado y descongelado del semen de carneros Pelibuey. C2=Carnero 2, C8=Carnero 8, MSD= Motilidad masal después de la dilución a 36 °C, MSE= Motilidad masal al enfriado a 5 °C, MSDS= Motilidad masal después del descongelado.

Los resultados de este estudio muestran que después del proceso de congelación-descongelación la motilidad masal y motilidad individual disminuyeron gradualmente en todo el proceso. La congelación tiene un efecto de estrés en los espermatozoides por los cambios de temperatura que sufren durante el proceso de enfriamiento y descongelamiento, lo cual deriva del daño celular durante los procesos físicos y químicos (Watson, 1995).

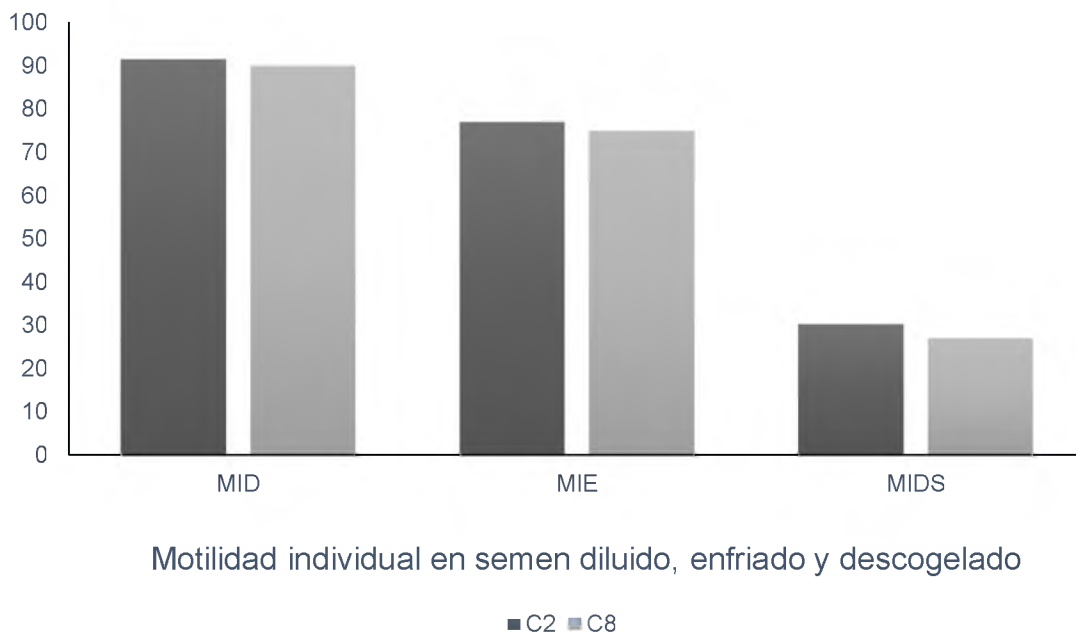


Figura 2. Motilidad individual a la dilución, enfriado y descongelado del semen de carneros Pelibuey. C2= Carnero 2, C8= Carnero 8, MID= Motilidad individual después de la dilución, MIE= Motilidad individual después del enfriado, MIDS= Motilidad individual después del descongelado.

6.5. Motilidad masal e individual al adicionar vitamina E al dilutor Triladyl

No se encontraron diferencias ($p > 0.05$) en el dilutor Triladyl® con y sin adición de vitamina E en la respuesta promedio en motilidad masal y motilidad individual. En el Cuadro 8, se observan los valores obtenidos. En todas las variables evaluadas, existe un ligero incremento al añadir vitamina E al dilutor, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$).

Los resultados difieren de los obtenidos con el dilutor Triladyl® sin adición de vitamina E por Aké *et al.* (2016), quienes reportaron en borregos Pelibuey una

motilidad individual del semen fresco de 87.7 % y del semen descongelado del 65.6 %, lo que indica que la motilidad individual disminuyó en relación al procesamiento del semen.

Cuadro 8. Promedio total de motilidad masal e individual en los procesos de dilución, enfriado y descongelado con el dilutor Triladyl y Triladyl+vit E en carneros de la raza Pelibuey.

TRATAMIENTO	N	MSD	MID		MIE		MIDS	
			(%)	MSE	(%)	MSDS	(%)	
TRILADYL	40	4.61 ^a	89.5 ^a	3.88 ^a	74.9 ^a	2.03 ^a	28.1 ^a	
TRILADYL+VIT E	40	4.82 ^a	91.8 ^a	3.90 ^a	76.8 ^a	2.06 ^a	28.9 ^a	

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). MSD= Motilidad masal después de la dilución a 36 °C, MSE= Motilidad masal enfriado a 5 °C, MSDS= Motilidad masal después del descongelado. MID= Motilidad individual después de la dilución, MIE= Motilidad individual después de enfriado, MIDS= Motilidad individual después del descongelado.

El resultado obtenido en este estudio, fue inferior al porcentaje promedio encontrado por Gómez (2014), quien al descongelar semen ovino de la raza Katahdin usando el dilutor Triladyl más vitamina E, dilutor Triladyl más vitamina E y C y dilutor Triladyl más vitamina C, reportó 30.73 %, 22.58 % y 12.96 %, de motilidad individual, respectivamente.

De acuerdo con Agarwal y Said (2003), la vitamina E protege las membranas del daño oxidativo. También se ha demostrado que disminuye el daño provocado por la criopreservación durante el proceso de congelación y mejora la motilidad post-congelado (Park *et al.*, 2003).

En lo que se refiere a la respuesta promedio de la motilidad masal y motilidad individual al adicionar vitamina E al dilutor Triladyl con respecto a la edad de los

sementales, no se encontraron diferencias ($p>0.05$) en los procesos de dilución, enfriado y descongelado del semen (Cuadro 9).

Cuadro 9. Promedio de la motilidad masal y motilidad individual en la dilución, enfriado y descongelado del semen al adicionar vitamina E al dilutor Triladyl por efecto de la edad en carneros de la raza Pelibuey.

CARNERO	TRATAMIENTO	N	MSD	MID	MSE	MIE	MSDS	MIDS
C2	Triladyl	20	4.70 ^a	90.8 ^a	4.03 ^a	76.3 ^a	2.15 ^a	29.3 ^a
	Triladyl+vitamina E	20	4.77 ^a	92.0 ^a	4.00 ^a	77.5 ^a	2.17 ^a	31.0 ^a
C8	Triladyl	20	4.53 ^b	88.3 ^a	3.75 ^a	73.5 ^a	1.93 ^a	27.0 ^a
	Triladyl+vitamina E	20	4.87 ^a	91.5 ^a	3.80 ^a	76.0 ^a	1.95 ^a	26.8 ^a

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p<0.05$). MSD= Motilidad masal después de la dilución a 36 °C, MSE= Motilidad masal enfriado a 5 °C, MSDS= Motilidad masal después del descongelado. MID= Motilidad individual después de la dilución, = Motilidad individual después del enfriado, MIDS= Motilidad individual después del descongelado.

Con estos resultados se llega a la conclusión de que la vitamina E no altera los resultados en cuanto a las edades evaluadas de ambos sementales. Las variaciones encontradas se atribuyen más a la diferencia de edades.

Jiménez *et al.*, 2007, no obtuvieron diferencias al evaluar motilidad en semen ovino después del descongelado añadiendo vitamina E como antioxidante. Estos resultados se asemejan a los encontrados en el presente estudio y pueden deberse a los componentes del dilutor. Sarlos *et al.* (2002) mencionó que el efecto de la vitamina E varía dependiendo la fuente de azúcar y de amortiguador que se utilicen.

6.6. Integridad del acrosoma después del descongelado del semen

En el Cuadro 10, se visualizan diferencias ($p < 0.05$) en las variables integridad del acrosoma y motilidad individual por efecto de la edad del semental después del descongelado del semen.

Cuadro 10. Evaluación del porcentaje de integridad del acrosoma y motilidad individual en el semen descongelado por efecto de la edad de carneros Pelibuey.

Carnero	N	Integridad del acrosoma (%)	Motilidad individual (%)
C2	200	72.73 (27.27) ^a	31.81 ^a
C8	200	70.45 (29.55) ^b	27.92 ^b

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). N= Número de pajillas

Menor porcentaje de motilidad y mayor daño acrosomal se obtuvo en el carnero de menor edad (C8) al descongelar las pajillas de semen. En cuanto al daño acrosomal o eyaculados donde los espermatozoides que han perdido el acrosoma mostraran menor fertilidad (Rubio, 2017). Estos resultados se relacionan a lo mencionado por Fernández-Abella 2015, quien encontró diferencias al evaluar sementales de distintas edades y observar que los eyaculados de machos de menor edad tienen menor viabilidad.

Las dos características antes indicadas, conllevan a que el carnero de mayor edad (C2), demostró una mayor capacidad fecundante que el carnero de menor edad (C8) (datos no publicados). De esta manera, se concluye que, para semen fresco la edad de los carneros no influyó en sus parámetros evaluados. Al momento del

descongelado, existió mayor daño acrosomal y menor motilidad masal en las pajillas evaluadas del carnero de un año de edad.

Las variables integridad del acrosoma y motilidad individual mostraron diferencias ($p < 0.05$) por efecto de la adición de vitamina E al dilutor Triladyl en el eyaculado de ovinos Pelibuey después del descongelado del semen (Cuadro 11).

Durante el proceso de congelación-descongelación del semen, hay daños estructurales en los espermatozoides que van acompañados de daños bioquímicos o la pérdida de sus contenidos vitales (Salamon y Maxwell, 1995b). Las estructuras celulares son las que mayor daño sufren en el proceso de congelación debido a la pérdida de fluidos de sus componentes lipídicos (Mazur, 1984). Valcárcel *et al.*, (1997), mencionó que las lesiones en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial son las principales causas del daño a nivel estructural y pérdida de funciones ocasionadas por la criopreservación. Por lo tanto, la vitamina E adicionada al dilutor mostró un menor porcentaje de integridad acrosomal en el esperma ovino, considerando que se redujo el daño oxidativo por enfriamiento,

Cuadro 11. Evaluación del porcentaje de integridad del acrosoma y motilidad individual del semen descongelado por adición de vitamina E al dilutor Triladyl en carneros Pelibuey en Loma Bonita, Oaxaca.

Tratamiento	N	Integridad del acrosoma	
		(%)	Motilidad individual (%)
Triladyl	200	72.73 (29.30) ^a	29.69 ^a
Triladyl + Vit E	200	70.45 (27.52) ^b	30.03 ^b

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). N=número de pajillas.

El porcentaje de integridad de acrosomal obtenido en este estudio es similar al obtenido por Ávila (2009) (74.04%), y mayor al obtenido por Aguado (1998) (54.8%).

El porcentaje de motilidad individual obtenido después del descongelado quedan muy por debajo de los obtenidos por Cabrera *et al.*, (2010) (84.55%). Este autor reporto como valor mínimo un 60 % para la motilidad individual por lo que los datos obtenidos en este estudio, están debajo de estos estándares. Estas diferencias en los resultados obtenidos pueden deberse a la época cuando se realizó el experimento el método de evaluación.

6.7. Eficiencia del colorante en la integridad estructural de la membrana de semen ovino

En el Cuadro 12, se muestra que el colorante triple tinción (TT; Spermac), otorga una mayor visión de daño acrosomal que sufre el semen después del descongelamiento, comparado con el colorante eosina-nigrosina (EN).

Con el colorante EN, la visualización de la integridad de la membrana es menos eficaz, comparada con el colorante TT. Esto puede estar relacionado con el proceso de fijación de la muestra. De acuerdo con Mallma (2019), la tinción EN es usada en muestras no fijadas químicamente y por ser un colorante hipotónico, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides.

Cuadro 12. Evaluación de la integridad del acrosoma en tinción Eosina-Nigrosina (EN) y triple tinción (TT; Spermac) en el semen descongelado de carneros Pelibuey en Loma Bonita, Oaxaca.

Colorante	N	Integridad del acrosoma (%)
EN	320	26.57 ^b
TT	80	35.75 ^a

^{a,b}Valores con diferente literal en la columna difieren estadísticamente ($p < 0.05$). N= Número de pajillas por tratamiento.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. Conclusiones

Las variables macroscópicas (volumen del eyaculado) y microscópicas (motilidad masal, motilidad individual, porcentaje de espermatozoides vivos y muertos) del semen fresco de ovinos Pelibuey, de acuerdo con la edad de los carneros, fueron similares a excepción de la concentración espermática, todos los valores se encuentran dentro de los rangos establecidos como adecuados en la literatura. Las variables evaluadas para semen enfriado y refrigerado no mostraron diferencias estadísticas significativas entre carneros ni entre tratamientos, la edad de los sementales no influyó ni se observó un efecto al añadir vitamina E.

Los procesos de dilución, enfriado y descongelado del semen afectan en la motilidad masal e individual del semen ovino. El factor edad del carnero y la adición de vitamina E al dilutor Triladyl influye en el porcentaje de la integridad acrosomal y motilidad individual en el semen descongelado.

La triple tinción "Spermac", mejoró los resultados del porcentaje de integridad acrosomal del semen ovino. Las muestras coloreadas con eosina-nigrosina (EN) presentaron mayor daño acrosomal.

7.2. Recomendaciones

Se recomienda utilizar un mayor número de sementales ovinos con diferentes edades y evaluarlos en varias épocas del año para comprender a detalle las variaciones en la calidad seminal.

Es deseable probar un mayor número de tinciones para poder comparar su efecto en la integridad del acrosoma del semen de carneros Pelibuey.

Al efectuar estudios más avanzados debería utilizarse la triple tinción "Spermac ya que se visualiza de forma más nítida el daño del acrosoma con esta tinción.

8. LITERATURA CITADA

- Agarwal A., Said T.M. 2003. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*. 9(4):331-345.
- Aguado MJ, García Cervigon, Manso A, Perez Guzman, Garde J, Montoro V. 1998. Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino manchego mantenido durante 24 horas en refrigeración. *Producción Ovina y Caprina XXIII*: 521-524.
- Aguirre V., Orihuela A., Vázquez R. 2007. Effect of semen collection frequency on seasonal variation sexual behavior, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Tropical Animal Health Production*. 39:271-277.
- Aké L. J.R., Ramírez P.H.S., Aké V.N.Y., Aké V.J.R., Barrios G.M.B. 2016. Viabilidad de semen ovino congelado con leche descremada como diluyente. *Bioagrocencias*. 9(1):65-71.
- Avalos R., D, Sánchez, A. Olazabal, A. Terrazas, R. Soto, A. Medrano. 2009, Predicción de la fertilidad de machos ovinos jóvenes mediante la evaluación de semen, conducta a la monta y fertilidad por monta directa. *Memoria XIV Congreso Nacional de Ovinocultura, Querétaro*. 5 p.
- Ávalos R.A., González S.J.A., Vargas I.A.K., Herrera B.J.A. 2018. Recolección y manipulación seminal in vitro. Editorial Universidad Autónoma Metropolitana. CDMX. 57 p.
- Avila-Anglas, 2009, Efecto de dos dilutores en la conservación de la integridad de la membrana plasmática de espermatozoides en semen refrigerado de carnero, Banco Nacional de Semen, Universidad Nacional Agraria La Molina, La molina Lima Perú.
- Ball B.A., Vo A.T., Baumber J. 2001a. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal Veterinary Research*. 62(4):508-515.
- Barrios C. 2007. Guía práctica de ovinocultura, BACOM Ltda. Empresa del sector Agropecuario y Ambiental. Rancho de la Oveja, Granja demostrativa de ovinos. 45 p.
- Bernardi S.F., Allende R., Mazzeo M.J., Marini P.R. 2011. Evaluación de los cambios ocasionados en espermatozoides bovinos por variaciones en el manejo de las dosis durante su manipulación en inseminación artificial. *Investigación Veterinaria*. 13:25-38.
- Bilodeau J.F., Chatterjee S., Sirard M.A., Gagnon C. 2000. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. 55(3):282-288.

- Buitrago P. M.J., Pérez S. L. M. 2008. Comparación de dos diluyentes para criopreservación de semen ovino (Tesis de Licenciatura). Universidad de la Salle. Facultad de Medicina Veterinaria, Bogotá. 80 p.
- Cabrera V. P., Orellana Ch. J., Pantoja A. C. 2010. Efecto de dos dilutores sobre la motilidad e integridad de la membrana espermática en semen congelado de ovinos. *Revistas de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 21(2):154-160.
- Carrillo E.R., Ponce M J.A., Peña P.C.A., Flores R.O.I., Neri M.R., Zepeda M.A.D., Pérez C.A.A., Ortiz T.A. 2016. Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM* 59(1):1-18.
- Cortez-Romero C., Gallegos-Sánchez J. 2014. Biotecnologías reproductivas, moleculares y génicas en ovinos. 1ª edición. Biblioteca Básica de Agricultura. Colegio de Postgraduados. 282 p.
- Cueto M., Gibbons A., Macarena M., Galarraga B., Fernández J. 2016. Manual de procesamiento y conservación del semen ovino. 22 p. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/intamanual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf. Consultado en mayo del 2021.
- De la Cruz M.J.A. 2019. Manejo General de sementales. Disponible en: <http://www.borrego.com.mx/wp-content/uploads/2019/06/sementales.pdf>. Consultado en marzo del 2021.
- De Lucas T., Arbiza A.S.I. 2004. Sistemas de apareamiento e inseminación artificial en ovinos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 118 p.
- Durán del Campo A., Cavestany D., Duran-Hontou G. 1993. Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, Agropecuaria. Hemisferio Sur. 199 p.
- Durán R.F. 2009. Inseminación en caprinos, ovinos, conejos, aves de corral y porcinos, Grupo Latino Editores. 1ª edición, Bogotá, Colombia. 94 p.
- Ek-Mex J.E., Aké-López J.R., Silva-Mena C.A. 2009. Efecto de dos diluyentes sobre la viabilidad del semen congelado de ovinos de pelo. *Bioagrobiencias*. 2(1):4-12.
- El-Sisy G.A., El-Nattal W.S., El-Sheshtawy R.I. 2007. Buffalo semen quality, antioxidants and peroxidation during chilling and cryopreservation. *Online Journal Veterinary Research* 11:55-61.
- Evans G., Maxwell W.M.C. 1990. Inseminación artificial en ovejas y cabras. Edición en inglés 1987. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 65 p.

- Garde J., Artiga A., Gutiérrez y Vázquez. 1992. Triple tinción para valorar acrosomas normales y viabilidad espermática en semen ovino. *Medicina Veterinaria*. 9:107-114.
- Garner D., Hafez E. 2000. Spermatozoa and seminal plasma: In Hafez E.S.E. and Hafez. B (eds.) *Reproduction in Farm Animals*. 7^a Edition. Lippincott Williams y Wilkins Company, Philadelphia. USA. pp. 96-109.
- Gillan L., Evans G., Maxwell W.M. 1997. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development*. 9(5): 481-487.
- Godoy G. J.M., Rojas R.M. 2011. Protocolo de inseminación con semen fresco en ovinos, Una buena metodología para realizar en forma más rápida el mejoramiento animal, Informativo N° 45, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro de Investigación especializado en Agricultura del Desierto y Altiplano (CIE), INIA URURI, Región de Arica y Parinacota, Ministerio de agricultura. 4 p.
- Gómez I., Domínguez Y.M., De la Isla G., Velázquez D. 2014. Efecto de aditivos antioxidantes en semen ovino post-congelación. *Memorias del XII Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia*. León Guanajuato, México. Del 13 al 15 de mayo de 2014. pp. 1-5.
- Hafez, E.S.E. 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. En: Hafez, E.S.E. and Hafez. B (eds.) *Reproduction in farm animals*, 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia. pp. 431-442.
- Hafez E.S.E. 2002. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7^a ed. México: Interamericana McGraw-Hill. 470 p.
- Hicks J.J., Torres R.Y., Sierra V.M. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 14(4):223-226.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2015. "Mapa geográfico". Disponible en: <http://gaia.inegi.org.mx/mdm6/?v=bGF0OjIzLjMyMDA4LGxvbjotMTAxLjUwMDAwLHo6MSxsOmMxMTFzZXJ2aWNpb3N8dGMxMTFzZXJ2aWNpb3M=>. Consultado el 18 de febrero del 2020.
- Jimenez, Quezada, Prieto, Orozco, Itza, Carrera, 2007. Evaluación de la adición de quercetina y vitamina E al medio de criopreservación de semen ovino sobre la fertilidad *in vivo*, *Abanico veterinario*, vol. 11, ene./dic. 2021.
- Johnson L., Varner D., Roberts M., Smith T., Keillor G., Scrutchfield W. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science*. 60-61:471-480.
- Lerne J., Urbina M.T. 2008. *Fertilidad y reproducción asistida*. 1^a edición. Caracas, Venezuela. Medica Panamericana. 378 p.

- López A., Villanueva N.Y., Villanueva J.R.A. 2017. Efecto de la raza, edad y época sobre la capacidad reproductiva del carnero. Avances de la investigación sobre producción de ovinos de pelo en México. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/FernandoCasanovaLugo/publication/321307604_Avances_de_la_investigacion_sobre_produccion_de_ovinos_de_pelo_en_Mexico/links/5a1baa6faca272df080f1fe3/Avances-de-la-investigacion-sobre-produccion-de-ovinos-de-pelo-en-Mexico.pdf. Consultado en agosto del 2021.
- López J. 2014. Reproducción Veterinaria. Disponible en: <http://www.m.reproduccionveterinaria.com>. Consultado en junio del 2020.
- Mallma M.P. 2019. Colorantes Diff-Quik y Eosina-Nigrosina en la evaluación morfológica de espermatozoides antes y después de la criopreservación del semen del toro Holstein. Tesis de Licenciatura en Medicina, Veterinaria y Zootecnia. Abancay-Perú. 60 p.
- Mazur P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *The American Journal of Physiology*. 247(3):125-142.
- Medrano J.A. 2000, Recursos animales locales del centro de México. *Archivos de Zootecnia*. 49:385-390.
- Melling M., Alber M. 2000. Práctica ovina y caprina. Buenos Aires. Editorial Intermédica. 208 p.
- Membrillo-Ortega A., Córdova-Izquierdo A., Hicks-Gómez J.J., Valencia-Méndez J.J., Castillo-Juárez H. 2011. Efecto de la adición de antioxidantes en semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *Revista Veterinaria*. 22 (2):85-90.
- Minitube (Grupo Minitube). 2008, Alemania. Disponible en: <http://www.minitube.com> Consultado en mayo del 2020.
- Minitube (Grupo Minitube). 1993. Manual de Triladyl. Disponible en: <http://www.tienda.arbiotech.com.mx> Consultado en marzo 2020.
- Morani E., Roncoletta M., Ancieto K., Franceschini P., Tedesco A. 2004. Production of reactive oxygen species in bovine semen after freezing and thawing. 15 th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil. 474 p.
- Ollero M., Blanco T., López-Pérez M. y Cebrian-Pérez, J. 1996. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system. Effect of different cryoprotectants. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 680(1-2): 157-164.
- O'flaherty C., Beconi M., Beorlegui N., 1997, Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa, *Androgologia*, volumen 29, september-october, 269-275.

- Osorio S.R.E. Giraldo J.F., Mesa H., Gómez L.G., Henao U.F.J. 2007. Evaluación de la integridad acrosómica en el semen de verraco. *Veterinaria Zootecnia*. 1(1):41-47.
- Palacios M. 2005. Evaluación del agua de coco (*Cocus nucífera*), *Opuntia* spp, leche y sus combinaciones para la criopreservación del semen ovino (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Chihuahua, México. 72 p.
- Park N.C., Park H.J., Lee K.M., Shin D.G. 2003. Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation. *Asian Journal Andrology*. 5:195-201.
- Patrat C., Serres C., Jouannet P. 2000. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*. 92(3-4): 255-266.
- Perezgrovas G. R. 1998. Comparación de recursos genéticos: el Borrego Chiapas (México) y las razas autóctonas de origen español. *Archivos de Zootecnia*. 47:425-430.
- Ramos Z. L., Rojas P. A., Martínez F. Z. 2017. Efecto de dilutores y tiempos de equilibrio en la criopreservación de semen ovino (*Ovis aries*). *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales* 4(2):63-71.
- Restrepo B.G. Usuga S.A., Rojano B.A. 2013. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Revista Veterinaria y Zootecnia*. 8:115-127.
- Restrepo B.G., Varela G.E., Usuga S.A. 2016. Evaluación de la calidad espermática epididimal en hipopótamos *Hippopotamus amphibius* (artiodactyla: hippotamidae) ubicados en el magdalena medio, Colombia. *Acta Zoológica Mexicana*. 32:158-167.
- Romero M.J. 2005. Antecedentes de la ovinocultura en México. Disponible en: https://fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_zoo/unidad_4_ovinos.pdf. Consultado en febrero del 2020.
- Romero O. 2015. Evaluación de la condición corporal y edad de los ovinos [en línea] Temuco: Informativo INIA Carillanca. No. 79. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/4553>. Consultado el 27 de mayo del 2021.
- Ross C., Morris A., Khairy M., Khalaf Y., Braude P., Coomarasamy A., El-Toukhy T. 2010. A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive Biomedicine Online* 20:711-723.
- Rubio G. 2017. Efecto de la criopreservación sobre la integridad estructural y funcional de espermatozoides ovinos tropicales. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia. 137 p.
- Ruíz G.L.F. 2005. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y Tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a Tris. Tesis

de Médico Veterinario, Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Lima-Perú. 72 p.

- Russel J.F., Doney J.M., Gunn R.G. 1969. Subjective assessment of body fat in live sheep. *Journal Agriculture Science*. 72:451-454.
- Ruther B, Russo A.F. 2006. Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro. 2ª ed. Buenos Aires. Agro-Vet. 270 p.
- Salamon, S., Maxwell, W.M.C., Evans, G. 1990. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, Ed. Acribia. 192 p.
- Salamon S., Maxwell W.M.C. 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. Review. *Animal Reproduction Science*. 37:185-249.
- Salamon S., Maxwell W.M.C. 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Reproduction Science*. 38:1-36.
- Salamon S., Ritar A.J. 1982. Deep freezing of Angora goat semen: Effects of diluent composition and method and rate of dilution on survival of spermatozoa. *Science*. 35:295-303.
- Salamon S., Visser D. 1972. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Australian Journal Biology Science*. 25:605-618.
- Saleh R.A., Agarwal. A. 2002. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal Andrology*. 23(6):737-752.
- Salisbury G., Demark V., Lodge J. 1982. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 33-35.
- Sandoval M.R., Santiani A.A., Ruiz G. L., Leyva V.V., Coronado S.L., Delgado C.A. 2007. Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 18(2):107-114.
- Santini, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias mención en Biología de la reproducción. Facultad de Medicina-Universidad de la Frontera. Temuco-Chile. *Science*. 60-61:481-492.
- Sarlos P, Molnar A, Kokai M, Gabor GY, Ratky J. 2002. Comparative evaluation of de effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta veterinaria Hungarica*. 50:235-245.

- SAS Institute Inc. 2010. SAS/STAT 9.22. User's Guide Cary NC: SAS Institute Inc. Cary NC, USA 8444 p. Disponible en: <http://support.sas.com/documentation/cdl/en/statug/63347/PDF/default/statug.pdf>. Consultado el 7 agosto del 2021.
- Sathe S., Shipley. 2014. Chapter 10: Applied andrology in sheep, goats and selected cervids. IN: Chenoweth P y Lorton S. Animal Andrology: Theories and Applications. CAB International, CABI. London, UK. 226-254.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2021. Disponible en: <https://www.qob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria>
- Sorensen A. M. 1982. Evaluación de la aptitud reproductiva. En: Sorensen A. Reproducción animal, principios básicos y prácticos. 1ª edición. Argentina: McGraw-Hill. pp. 124-143.
- Stornelli M.C., Tittarelli C.M., Savignone C.A., Stornelli M.A. 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria* 25(2):28-35.
- Trejo, G.A., 2001, Variación Estacional de la libido y calidad del semen de cinco razas ovinas en el Estado de México, Tesis de Licenciatura en Medicina, Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México-México. 109 p.
- Valcárcel A., De las Heras M.A., Pérez L., Moses D.F., Baldassarre H. 1997. Assessment of acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. *Journal Animal Reproduction Science*. 45(4):299-309.
- Villa-Arcila N.A., Ceballos-Márquez A. 2007. Radicales libres e infertilidad en el macho. *Revista Veterinaria y Zootecnia*. 1(2):87-97.
- Viser D., Salamon S. 1974. Fertility following inseminations with frozen-thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. *Australian Journal Biology Science*. 27:423-425.
- Wang A.W, Zhang H., Ikemoto I., Anderson D.J., Loughlin, K.R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49(6):921-925.
- Wang X.L., Rainwater D.L., VandeBerg J.F., Mitchell B.D., Mahaney M.C. 2001. Genetic contributions to plasma total antioxidant activity. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 21:1190-1195.
- Watson P. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility Development*. 7(4):871-891.

Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 2(60-61):481-492.