

01621
74



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACION DEL EFECTO DE UN RETARDADOR DE
METABOLISMO (ROTENONA) SOBRE LA MOTILIDAD
Y VIDA MEDIA EN SEMEN CONGELADO DE OVINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

LUCRECIA RODRÍGUEZ GALVAN

ASESORES.

M.V.Z. JAVIER HERNÁNDEZ IGNACIO

DR. PEDRO OCHOA GALVAN



MÉXICO, D. F.

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN RETARDADOR DE
METABOLISMO (ROTENONA) SOBRE LA MOTILIDAD
Y VIDA MEDIA EN SEMEN CONGELADO DE OVINO**

**Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

de la

**Universidad Nacional Autónoma de México
Para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista**

Por

Lucrecia Rodríguez Galván

Asesores:

**M.V.Z. Javier Hernández Ignacio
Dr. Pedro Ochoa Galván**

México, D.F., 2003

DEDICATORIA

A mis padres:

Magdalena Galván Villanueva y Carlos G. Rodríguez Manjarrez
Por su cariño y apoyo incondicional, por el esfuerzo y la paciencia. CRACIAS!

A mi tío:

David Galván Villanueva
Por ser mi amigo, consejero, por preocuparse por mí y por quererme y cuidarme como a una hija.

A mi amigo:

Javier Hernández Ignacio
Por el esfuerzo hecho para la realización de este trabajo, pero más aún, por la buena amistad que hemos tenido el tiempo que nos ha tocado compartir.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor:

Pedro Ochoa Galván

Por sus consejos, paciencia y ayuda incondicional que siempre brindó.

A mi jurado:

Alberto Balcázar, Javier Valencia, Rosa Berta Angulo y Javier Molotla

Por el tiempo invertido y la buena disposición para mejorar este trabajo.

Al

M.V.Z. Mauricio García Gallardo

Director del Centro de Reproducción y Mejoramiento Genético Ovino-Caprino del Estado de Guanajuato por las facilidades para la realización de este trabajo.

A mis amigos:

Gris, Obdulio, Nico, Edgar, Beto y Juan

Por hacerme la vida tan agradable, han formado parte de mis mejores momentos.

A mi amigo:

Efraín

Por la ayuda prestada para finalizar este trabajo y su sincera amistad. Gracias por todo!

Al Sr.

Luis Javier Herrera Ramirez

Por la buena disposición y la invaluable ayuda que prestó para la realización de este trabajo.

CONTENIDO

PÁGINA

RESUMEN.....	1
I INTRODUCCIÓN.....	2
HIPOTESIS.....	4
OBJETIVO.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
VIAS DE INSEMINACIÓN.....	5
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL CERVICAL.....	5
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL PROFUNDA.....	6
INSEMINACIÓN INTRAUTERINA.....	6
COLECCIÓN DE SEMEN.....	7
EVALUACIÓN DE SEMEN.....	8
VOLUMEN.....	8
COLOR Y OLOR.....	8
pH.....	8
MOTILIDAD.....	9
METABOLISMO ESPERMÁTICO.....	11
DILUYENTES DEL SEMEN.....	13
AMORTIGUADORES.....	14
AZÚCARES.....	14
CRIOPROTECTORES.....	14
ANTIBIÓTICOS.....	16
SUSTANCIAS ANTIOXIDANTES.....	17
SUSTANCIAS REGULADORAS DEL METABOLISMO.....	18
CONGELACIÓN DEL SEMEN.....	19
DAÑOS AL ESPERMATOZOIDE DURANTE EL PROCESAMIENTO DEL SEMEN.....	20
DESCONGELACIÓN DEL SEMEN.....	22
III MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
PREPARACIÓN DEL DILUYENTE.....	24
COLECCIÓN DEL SEMEN.....	24
EVALUACIÓN DEL SEMEN.....	25
DILUCIÓN DEL SEMEN Y TRATAMIENTO.....	25
CONGELACIÓN DEL SEMEN.....	25
DESCONGELACIÓN DEL SEMEN.....	26
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	26
IV RESULTADOS.....	27
V DISCUSIÓN.....	32
VI CONCLUSIÓN.....	36
VII LITERATURA CITADA.....	37
ANEXO.....	47

LISTA DE CUADROS

	PÁGINA
<i>CUADRO 1</i>	
MOTILIDAD PROMEDIO DEL SEMEN DE CARNERO EN ESTADO FRESCO	29
<i>CUADRO 2</i>	
MOTILIDAD PROMEDIO DEL SEMEN DE CARNERO AL DESCONGELADO DE LOS DIFERENTES GRUPOS: A (DILUYENTE BASE Ó TESTIGO), B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M DE ROTENONA) Y C (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M DE ROTENONA)	30
<i>CUADRO 3</i>	
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN SEMEN DE CARNERO AL DESCONGELADO EN LOS GRUPOS: A (DILUYENTE BASE Ó TESTIGO), B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M DE ROTENONA) Y C (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M DE ROTENONA)	31

LISTA DE GRAFICAS

	PÁGINA
<i>GRÁFICA 1</i>	
MOTILIDAD PROMEDIO DEL SEMEN DE CARNERO AL DESCONGELADO DE LOS GRUPOS: A (DILUYENTE BASE), B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M DE ROTENONA) Y C (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M DE ROTENONA)	30
<i>GRÁFICA 2</i>	
PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN SEMEN DE CARNERO AL DESCONGELADO EN LOS GRUPOS: A (DILUYENTE BASE Ó TESTIGO), B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M DE ROTENONA) Y C (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M DE ROTENONA)...	31

ANEXO

PÁGINA

LISTA DE GRÁFICAS

<i>GRÁFICA 1A</i>	MOTILIDAD PROMEDIO DEL SEMEN DE CARNERO AL47 DESCONGELADO DE LOS DIFERENTES SEMENTALES EN EL GRUPO A (DILUYENTE BASE)
<i>GRÁFICA 2A</i>	MOTILIDAD PROMEDIO DEL SEMEN DE CARNERO AL47 DESCONGELADO DE LOS DIFERENTES SEMENTALES EN EL GRUPO B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M DE ROTENONA)
<i>GRÁFICA 3A</i>	MOTILIDAD PROMEDIO DEL SEMEN DE CARNERO AL48 DESCONGELADO DE LOS DIFERENTES SEMENTALES EN EL GRUPO C (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M DE ROTENONA)
<i>GRÁFICA 4A</i>	PROMEDIO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN SEMEN DE48 CARNERO AL DESCONGELADO DE LOS DIFERENTES SEMENTALES EN EL GRUPO A (DILUYENTE BASE)
<i>GRÁFICA 5A</i>	PROMEDIO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN SEMEN DE49 CARNERO AL DESCONGELADO DE LOS DIFERENTES SEMENTALES EN EL GRUPO B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M DE ROTENONA)
<i>GRÁFICA 6A</i>	PROMEDIO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN SEMEN DE49 CARNERO AL DESCONGELADO DE LOS DIFERENTES SEMENTALES EN EL GRUPO B (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M DE ROTENONA)

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1A

MOTILIDAD PROMEDIO DEL SEMEN DE CARNERO AL 50
DESCONGELADO, DE LOS DIFERENTES EN LOS GRUPOS
A (DILUYENTE BASE), B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M
DE ROTENONA) Y C (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M
DE ROTENONA), EXPRESADO EN PORCENTAJES.

CUADRO 2A

PROMEDIO DE ESPERMATOZOIDES VIVOS EN SEMEN DE 51
CARNERO AL DESCONGELADO, DE LOS DIFERENTES
SEMENTALES EN LOS GRUPOS A (DILUYENTE BASE),
B (DILUYENTE BASE MÁS 4 μ M DE ROTENONA) Y
C (DILUYENTE BASE MÁS 8 μ M DE ROTENONA),
EXPRESADO EN PORCENTAJES

RESUMEN

Rodríguez Galván Lucrecia. Evaluación del efecto de un retardador de metabolismo (rotenona) sobre la motilidad y vida media en semen congelado de ovino. (Bajo la dirección de: M.V.Z. Javier Hernández Ignacio y el Dr. Pedro Ochoa Galván).

La fertilidad obtenida en la inseminación artificial con semen congelado por vía cervical en las ovejas es baja. Una de las causas, son los daños ocasionados durante los procesos de congelación y el agotamiento de las reservas energéticas del espermatozoide ovino. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la rotenona sobre la motilidad y la vida media de los espermatozoides al descongelado. Se utilizaron 6 sementales, se obtuvieron 5 eyaculados de cada uno. Se evaluaron dos concentraciones diferentes de rotenona (4 y 8 μM). El semen se congeló con un medio comercial y se almacenó en pajillas de 0.25 ml con una concentración de 100 millones de espermatozoides. Se evaluó un total de 162 pajillas, 27 por cada semental, 9 por cada tratamiento. La valoración de la motilidad y la sobrevivencia espermática se realizó a las 0, 4, 8 y 12 horas postdescongelación manteniendo las muestras en baño María a 37°C. Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, sementales, tiempos y en la interacción grupo-tiempo, semental-tiempo ($P < 0.01$), siendo superior la motilidad de los espermatozoides en el grupo testigo en las primera 3 evaluaciones; la motilidad a las 12 h con de 8 μM de rotenona fue superior así como la proporción de espermatozoides vivos en los cuatro periodos de evaluación postdescongelado. Se concluye que la adición de 8 μM de rotenona al medio de congelación produjo una mejor motilidad a las doce horas postdescongelación y una mayor sobrevivencia espermática en el semen ovino.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

I.- INTRODUCCIÓN

Con la inseminación artificial (IA) se pueden establecer programas de mejoramiento genético, con el objetivo de incrementar la productividad de animales con calidad superior dentro de su raza. La utilización del semen congelado ha dado un gran desarrollo al empleo de la IA en animales domésticos y facilita el intercambio del material genético a grandes distancias.

En el ganado bovino esta técnica está bien establecida ^{1,2}. En el caso de los ovinos una de las limitantes más grandes es la baja fertilidad (menos del 20%) que se obtiene con la IA vía cervical al usar semen congelado. Con la IA por vía cervical con semen congelado, uno de los principales problemas que se tienen es la barrera anatómica que representa el tracto genital de la oveja (cérvix tortuoso y lumen cervical estrecho); así como también los problemas actuales que se presentan en los procesos de criopreservación para que el espermatozoide ovino mantenga su capacidad de tránsito por el cérvix ^{3,4}.

Existen vías de inseminación donde se utiliza semen congelado con mejores resultados como la inseminación artificial intrauterina por laparoscopia, la cual requiere de un equipo costoso y mano de obra especializada; otra vía que actualmente se está difundiendo es la transcervical (Sistema Guelph) donde se realiza una inseminación intrauterina vía cérvix, sin embargo esta técnica ha arrojado resultados variables ⁵.

Son muchos los factores que influyen en los resultados cuando se lleva a cabo un programa de inseminación artificial con semen congelado. Los espermatozoides de carnero son muy susceptibles al "choque frío" y sufren una serie de cambios físicos y químicos que repercuten directamente en su viabilidad ⁷.

En el área de la criopreservación de semen de carnero existe una gran cantidad de estudios, pero aun no se cuenta con un método de congelación de semen que favorezca la inseminación cervical y que resulte en un aceptable nivel de fertilidad ⁸.

El espermatozoide para mantener su capacidad mótil utiliza la energía almacenada en forma de Trifosfato de Adenosina (ATP) y la producida a partir de azúcares como la fructuosa contenida en el plasma seminal. Durante el procesamiento del semen se consume gran parte de la reserva energética, lo que conlleva a la acumulación de CO₂ y ácido láctico ⁸.

El metabolismo espermático tanto como la motilidad se ven alterados por los procesos de congelación y descongelación; el daño producido en las mitocondrias se reduce pero no se previene con el uso de crioprotectores, y los espermatozoides que sobreviven a dicho proceso operan por debajo de su potencial metabólico ⁹.

Se ha observado, que con el uso de retardadores del metabolismo celular y antioxidantes en los diluyentes, se logra incrementar la fertilidad del semen congelado en ovinos. Reguladores del metabolismo como la rotenona¹⁰, antimicina¹¹, 2-deoxiglucosa¹² y la monensina¹³ logran manipular el metabolismo de los espermatozoides. La actividad de estas sustancias es incrementar la capacidad de los diluyentes para preservar la vida espermática e incrementar la fertilidad del semen congelado. Pero como la información al respecto es escasa, no se conoce claramente el efecto de estas sustancias sobre la motilidad y vida media del espermatozoide así como las dosis adecuadas.

La rotenona es un potente inhibidor de la función mitocondrial, que disminuye la tasa respiratoria de las células¹⁴. La utilización de este producto en los medios empleados para la congelación, podría disminuir la gran demanda metabólica que tienen los espermatozoides, evitando los daños ocasionados a la mitocondria en el proceso de congelación y descongelación. Si se considera que parte de este daño mitocondrial se da a nivel de aparato genital de la borrega, debido a los bajos niveles de glucosa y otros azúcares glicolisables ¹⁵, la rotenona apoyaría para mantener la viabilidad del espermatozoide. Por esta razón en este trabajo se pretende evaluar el efecto de la rotenona a diferentes dosis, sobre la motilidad y vida media de los espermatozoides al descongelado.

HIPÓTESIS

La adición de rotenona en el medio de congelación disminuirá la motilidad de los espermatozoides al descongelado prolongando su vida media.

OBJETIVOS

Evaluar el efecto de la rotenona sobre la motilidad de los espermatozoides al descongelado, en diferentes tiempos de evaluación.

Evaluar el efecto de la rotenona sobre la sobrevivencia espermática al descongelado, en diferentes tiempos de evaluación.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

VÍAS DE INSEMINACIÓN

Han sido muchos los estudios realizados con la técnica de IA en ovinos y aun no se cuenta con un método eficiente y económico; la razón fundamental está tal vez en las barreras anatómicas del aparato reproductor de la hembra y la susceptibilidad de los espermatozoides de carnero al proceso de congelación y descongelación ⁶.

La oveja posee un canal cervical tortuoso y de lumen muy estrecho. Esta anatomía cervical restringe el paso de instrumentos para la inseminación artificial de la forma que se haría en ganado vacuno. Por esta razón, en la IA ovina es importante la vía de inseminación (o sitio de deposición) a usarse ya que de esto depende la dosis de semen a utilizar y los resultados esperados ⁴.

Con la pérdida de espermatozoides móviles, agotamiento de reservas energéticas, capacitación y reacción acrosomal adelantadas aunado a las barreras anatómicas de la borrega, se hace muy difícil el tránsito a través del aparato genital de la hembra, razón por la cual la inseminación artificial cervical con semen congelado resultan en porcentajes de fertilidad muy bajos ¹⁶.

Inseminación artificial cervical

La inseminación artificial cervical es el método más práctico (no invasivo) y económico en la industria ovejera. El material básico consiste en un vaginoscopio, una fuente de luz y una pipeta de inseminación ⁶. Sin embargo; cuando se usa semen congelado los resultados obtenidos suelen ser bajos ^{17,18}, causado en gran medida por el ineficaz transporte de los espermatozoides a través del cérvix y la reducción de la viabilidad a través del aparato genital ^{18,19}. A este método se le llama también "Inseminación artificial superficial" ya que la pipeta de inseminación penetra sólo hasta topar con el primer anillo del cérvix ⁶.

La dosis de semen congelado recomendada para este método, es de 100 millones de espermatozoides móviles ^{6,20}. Se reporta que en promedio la fertilidad con este método es de alrededor de 20% ^{3,21}. El volumen recomendado por dosis para la IA cervical es de 0.1 a 0.2 ml, para evitar pérdida de semen por reflujo, y una concentración de 100 a 200 millones de espermatozoides móviles ^{6,22,23}.

Inseminación cervical profunda

Este es uno de los métodos usados para mejorar la fertilidad en ovinos con la inseminación artificial. Consiste en la manipulación del cérvix por medio de forceps para ejercer tracción y obtener una profundidad con la pipeta de 2 a 5 cm en el cérvix. Cuando es utilizado semen fresco, diluido o refrigerado pueden obtenerse buenos niveles de fertilidad (68-75%), depositando el semen intracervicalmente, sin embargo, requiere de mantener las hembras a ser inseminadas relativamente cerca, ya que la fertilidad desciende de un 10 - 35 % por día de almacenamiento ⁵.

Este método ha tenido resultados variados mostrando en algunos casos porcentajes de fertilidad más bajos que la IA cervical. Se reportan resultados de fertilidad desde un 4 hasta un 55%. Los resultados obtenidos en este tipo de IA dependen de varios factores tales como el tipo de pipeta utilizada, estructura del cérvix, estado de estro, edad y número de parto, penetración de la pipeta a través del cérvix y habilidad del operador ¹⁸.

Inseminación intrauterina

Con la finalidad de evitar el problema de la barrera del cérvix en la borrega, se ha realizado la deposición del semen dentro del útero vía del cérvix (transcervical) o directamente dentro del útero vía cavidad abdominal (laparotomía o laparoscopia) ²⁴.

La técnica de inseminación artificial transcervical (IAT) ofrece una alternativa para IA uterina. Por medio de una pipeta se logra pasar el cérvix de la borrega y depositar el semen directamente en el útero ²⁵. El Sistema Guelph para la inseminación artificial transcervical (GST-AI), es el método que podría tener gran aceptación como una alternativa a la IA por laparoscopia; los costos se reducen pero se tiene la desventaja de que hasta la fecha ha arrojado resultados muy variados ^{3, 26}.

El método más utilizado actualmente en la IA intrauterina es la laparoscopia. Con ésta técnica se obtienen los mejores resultados de fertilidad, pero requiere de un equipo costoso además de gastos en tranquilizantes, anestésicos y personal especializado en el uso del laparoscopio ^{6, 21}. Sin embargo, por medio de este método puede reducirse en gran medida la dosis de semen; se

reporta el uso de 10 millones de espermatozoides móviles con porcentajes de fertilidad de 57%⁸. En el caso de realizar la inseminación en el oviducto mismo, son necesarios menos de un millón de espermatozoides²⁰. Esto permite la obtención de mayor número de dosis por eyaculado. Algunos de los factores que se ha observado que influyen en la obtención de resultados con esta técnica son el método de sincronización, estación del año, momento de inseminación, número de espermatozoides móviles y sitio de deposición uterino.^{18,27}

COLECCIÓN DE SEMEN

La fuente del semen y el método de colección afecta la concentración espermática, motilidad y también la fertilidad²⁶. En ovinos existen dos técnicas comúnmente usadas para la colección de semen, la vagina artificial y el electroeyaculador²⁸.

El instrumento más usado es la vagina artificial por medio del cual se da un estímulo térmico (temperatura de 40°C) y mecánico (presión) para provocar la eyaculación²⁹. En uno de los extremos del tubo se conecta un cono de látex que termina conectado en un tubo recolector graduado. El tubo colector debe tener una temperatura de 30°C para evitar el choque térmico de los espermatozoides, y estar protegido de los rayos del sol²⁸. El uso de la vagina artificial proporciona el mejor y más natural método para obtener muestras destinadas para la criopreservación. El semen obtenido con este método es de buena calidad y se obtiene un volumen adecuado, sin embargo, se requiere de un previo entrenamiento del carnero^{26,29}.

Otro método de colección es la electroeyaculación; este método se utiliza más como último recurso en animales que no aceptan la vagina artificial, no están adiestrados o físicamente están imposibilitados para hacerlo²⁶. Este método consiste en dar, por vía rectal, estímulos eléctricos en el piso de la pelvis, con una intensidad de 10 a 15 voltios durante 3 a 8 segundos, con intervalos de 7 a 15 segundos e incremento de un voltio²⁹. El semen que se obtiene con este método se contamina frecuentemente con orina y contiene una alta cantidad de líquido seminal; esto provoca una disminución en la resistencia de los espermatozoides al choque frío y se considera por lo tanto, un semen de menor calidad²⁶.

La frecuencia de colección del semen afecta significativamente la calidad del eyaculado. En general hay una reducción en el volumen y concentración espermática, pero un incremento en la motilidad del espermatozoide a medida que se incrementa la frecuencia de colección seminal ^{6,30}.

EVALUACIÓN DEL SEMEN

La necesidad de evaluar el semen para determinar sus características y definir su tasa de dilución, permite descartar eyaculados de probable baja fertilidad así como detectar cualquier problema en la producción seminal.

Volumen

El volumen de eyaculado puede ser medido directamente en el tubo colector cuando este es graduado. El volumen normal que se obtiene de un carnero adulto, usando la vagina artificial, varía de 0.5 a 1.2 ml; sin embargo esta cantidad puede variar de una colección a otra ^{6,28}. En el caso de usar electroeyaculador esta cantidad puede aumentar, pero no la concentración. Para evaluar el volumen se debe tener en cuenta la época del año, la edad y condición corporal así como la frecuencia de colección ³¹.

Color y olor

El color normal del eyaculado es blanco ó blanco-crema, una apariencia opaca o más cremosa puede ser indicativa de una mayor concentración de espermatozoides. Con esta evaluación se puede detectar anomalías como presencia de orina, donde se observa un color más amarillo y aparenta estar más diluido; un color rosa o incluso rojo, indica la presencia de sangre y puede detectarse también contenido purulento. En condiciones normales no debe tener ningún olor ²⁹.

pH

El pH es un parámetro que puede ser medido con tiras reactivas de papel para pH. El pH normal del eyaculado de carnero puede variar entre 5.9 y 7.3. Puede haber variaciones sobre todo cuando la muestra está contaminada con orina ⁶.

Motilidad

La prueba de motilidad es indispensable cuando se va a usar el semen para inseminación artificial. Este parámetro se valora mediante observación directa en un microscopio y podemos tener dos evaluaciones; una de ellas es la motilidad en masa u oleadas, el cual es un parámetro fácil y rápido; la otra es la motilidad progresiva o individual, esta se evalúa en una laminilla a 37°C. Debe tomarse en cuenta la velocidad del desplazamiento y los movimientos laterales y lineales de los espermatozoides ^{28,29}.

La velocidad y tipo de movimiento puede variar dependiendo del método de colección, factores ambientales, manejo después de la colección y variaciones individuales del propio semental ³². Para realizar esta evaluación se puede tomar una escala de puntos (0 a 5) o porcentajes (0 a 100%), correspondiendo cada valor de la siguiente forma: ^{28,29}

EVALUACION SUBJETIVA DE LA MOTILIDAD EN SEMEN DE CARNERO

Motilidad en masa		Motilidad individual	progresiva	o
PUNTOS	EQUIVALENCIA	PORCENTAJE	EQUIVALENCIA	
0	Totalmente inmóvil	0	Muerto	
1	Movimiento individual	10	Muy pobre	
2	Movimiento muy lento	20-40	Pobre	
3	Movimiento en oleada generalizado, ondas con amplitud lenta	45-65	Regular	
4	Movimiento en oleada rápido, sin remolinos	70-85	Bueno	
5	Movimiento en oleada rápido, con remolinos	90	Muy bueno	

Chemineau *et al.*, 1991, Evans & Maxwell 1990.

Para la congelación deben utilizarse sólo aquellos eyaculados que presenten una motilidad entre 4 y 5 o bien mayor al 70% ³². Algunos investigadores hoy en día utilizan una evaluación, de motilidad y concentración espermática más objetiva, asistidos por programas en computadora como el sistema de análisis CASA ^{33,34,35}, obteniéndose una evaluación de la motilidad y concentración espermática más objetiva, así como el número de espermatozoides con un tipo particular de movimiento ^{36,37}.

La concentración espermática se refiere al número de espermatozoides por unidad de volumen; este valor es importante para conocer la dilución final y el número de dosis que se obtendrán por eyaculado. La concentración normal de espermatozoides en un carnero adulto está en un rango de 3.5 a 6 mil millones de espermatozoides por mililitro. Una evaluación subjetiva es por observación directa de la muestra; esta puede hacerse en campo e incluye color y consistencia, asignando valores de 0 a 5 que corresponden de la siguiente forma:²⁹.

Puntos	Consistencia o apariencia
5	Cremosa espesa
4	Cremosa delgada
3	Cremosa tenue
2	Lechosa
1	Nebulosa
0	Clara u acuosa

Evans & Maxwell 1990.

Este método debe evitarse cuando el semen va a ser congelado o se requiere una determinada concentración de espermatozoides.

El cálculo de la concentración por medio de un hemocitómetro es el método más económico que permite un conteo más preciso aunque lento. El principio de esta prueba es el determinar el número de espermatozoides presentes en un volumen dado de solución con grado de dilución conocido ²⁹.

Puede usarse también, un espectrofotómetro, que es un método de conteo eficiente y rápido. El principio general de este método es el de medir la densidad óptica (a una longitud de onda de 550 nanómetros) al diluir una determinada cantidad de semen con solución salina y formol; esta se compara con una solución testigo que no contiene espermatozoides ²⁸

Por otro lado, con el empleo de diferentes tinciones se puede diferenciar espermatozoides vivos, muertos y anormales (morfológicamente) en estado fresco y descongelado. Cuando se evalúa semen enfriado o descongelado puede además, diferenciarse espermatozoides con daño acrosomal o membranal mediante tinciones más especializadas.

Con la tinción de eosina-nigrosina y Tripán azul se puede hacer un conteo de vivos y muertos ^{36,38}. Cuando se utiliza eosina-nigrosina pueden diferenciarse espermatozoides teñidos de rosa o rojo como muertos además de algunas alteraciones morfológicas como: espermatozoides con cabeza pequeña, angosta, alargada o con acrosoma anormal; espermatozoides sin cola o con anomalías de ella (cola corta, doblada, enroscada); espermatozoides con gota citoplasmática (proximal o distal) ^{28,29}.

Debido a que la criopreservación tiene efectos adversos en varias membranas del espermatozoide, se han desarrollado diferentes pruebas para determinar las alteraciones que ocurren. En el caso de la membrana plasmática han sido usados substratos como el carboxifluorescein diacetato (CFDA) ^{36,39,40}, acridina naranja ⁴¹ y propidio iodado como marcador de ADN en células dañadas o muertas ^{42,43,44,45}. Estos fluoróforos han sido combinados con pruebas de citometría de flujo para evaluar la función mitocondrial empleando Rodamina 123 ⁹, ^{46,47,48}. Otra prueba, donde se utiliza clortetraciclina va encaminada a determinar el estado de la reacción acrosomal ^{49,50}.

Estas pruebas sirven para eliminar individuos con una viabilidad espermática baja y para eliminar o modificar protocolos de manejo en el semen ⁵¹.

METABOLISMO ESPERMÁTICO

El carácter mótil del espermatozoide provee una medida de su estado fisiológico, sin embargo, la motilidad misma no es un predictor eficiente de la capacidad potencial fertilizante ³¹.

La energía requerida para la motilidad es aparentemente derivada del ATP almacenado en la célula ⁵². El uso de este ATP parece estar regulado por niveles endógenos de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) ⁵³, este, además de regular el ATP, tiene un efecto directo sobre la motilidad espermática ^{31,54}. Se estima que el porcentaje del total del ATP, usado para la motilidad, varía en un rango de 70 a 80% ⁵⁵.

Aunque el espermatozoide carece de muchos de los organelos asociados con los procesos metabólicos, son metabólicamente activos, ya que poseen las enzimas necesarias para sus reacciones bioquímicas de glucólisis, ciclo del ácido

tricarboxílico, oxidación de ácidos grasos, transporte de electrones, y posiblemente la vía de hexosas monofosfato ³¹.

Bajo condiciones anaeróbicas el espermatozoide es capaz de degradar la glucosa, frutuosa o manosa a ácido láctico ^{6,56}. Esta actividad glicolítica permite al espermatozoide vivir en condiciones de anaerobiosis ³¹. Esta característica es importante durante el almacenamiento de espermatozoides para inseminación artificial ya que el ácido láctico se acumula durante el almacenamiento, baja el pH y afecta la viabilidad espermática ^{6, 10,56}.

El espermatozoide usa una variedad de sustratos en presencia del oxígeno; su capacidad respiratoria provee el medio para usar el lactato o piruvato resultado de la fructuolisis de azúcares hasta producir CO₂ y agua ⁵⁷. Esta ruta oxidativa, localizada en mitocondria, es mucho más eficiente en la producción de energía que la fructuolisis ⁴⁷. Usando este proceso catabólico, el espermatozoide convierte la mayor parte de la energía en ATP. Aunque mucho del ATP es consumido por los procesos de motilidad ⁵⁸, algo es mantenido para conservar la integridad de los procesos de transporte activo de las membranas espermáticas. Este transporte activo previene la pérdida de componentes iónicos vitales para la célula espermática. En ausencia de sustratos exógenos, el espermatozoide usa sus reservas internas de plasmalogen para proveer la energía en un corto periodo ^{6,31}.

La energía necesaria para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, especialmente la fructuosa, presentes en el plasma seminal ⁵⁹. La glucosa que también es metabolizada por los espermatozoides, a menudo se utiliza como componente de los diluyentes. Cuando los azúcares son metabolizados por los espermatozoides se produce dióxido de carbono (CO₂), agua y algo de ácido láctico ²⁹.

El dióxido de carbono en alta concentración tiene el efecto de inhibir la motilidad de los espermatozoides y puede ser utilizado como un medio de conservación del semen a corto plazo. El semen sin diluir incubado durante largos periodos puede acumular dióxido de carbono en cantidades suficientes para inhibir la motilidad de los espermatozoides. En estos casos, se puede recuperar la motilidad diluyendo el semen con diluyente fresco, con lo que también se diluye el CO₂. Por otro lado, el oxígeno incrementa notablemente, la actividad metabólica

de los espermatozoides con lo que se acumula ácido láctico ⁶⁰. Si se acumula ácido láctico metabólico, el pH puede descender y reducir irreversiblemente la viabilidad de los espermatozoides ²⁹. El semen, una vez obtenido, deberá usarse de inmediato, ya sea para la inseminación o su conservación.

Los espermatozoides de los rumiantes se caracterizan por su alta capacidad para realizar la respiración oxidativa. El cérvix de la borrega contiene adecuados niveles de ácido láctico y oxígeno para mantener la motilidad, pero es pobre en glucosa y otros azúcares glicolisables. Al parecer, esta es la razón por la cual el espermatozoide de carnero es altamente dependiente de la respiración mitocondrial para proveer ATP para la motilidad durante el tránsito cervical ^{15,61}.

La temperatura del semen, en el momento de la eyaculación, se aproxima a la del cuerpo (37.5°C). La exposición del semen a temperaturas superiores a la indicada aumenta el ritmo metabólico, se agotan las reservas de energía y decrece la vida media del espermatozoide. La disminución de la temperatura reduce el metabolismo de los espermatozoides y un enfriamiento lento a 2 ó 5°C contribuye a prolongar la viabilidad de los espermatozoides ²⁹.

DILUYENTES DEL SEMEN

La necesidad de fertilizar un gran número de hembras con semen de un mismo animal requiere de hacer una dilución de cada eyaculado ⁹. Los diluyentes deben proveer nutrientes (principalmente substratos energéticos), sustancias protectoras contra el "choque frío" (en caso de enfriarse), y agentes crioprotectores (cuando va a congelarse). Deben también proveer un sistema "buffer" o tampón para prevenir cambios bruscos de pH, además de un ambiente isotónico para evitar un "choque osmótico". Finalmente deben contener agentes antimicrobianos ^{62,63}. El plasma seminal es ya un diluyente natural de los espermatozoides, contiene componentes benéficos ^{64,65} y puede ayudar a sus procesos de maduración ²⁶ provee de resistencia contra el choque frío además de nutrientes para los espermatozoides ⁶⁶, pese a esto es necesario agregar volumen y otros compuestos que ayuden a conservar la motilidad y capacidad fertilizante.

Amortiguadores

En la dilución del semen se requiere de sustancias con una buena capacidad amortiguadora de los iones de hidrógeno para mantener el rango de "tolerancia espermática" de 6.5 – 7.5 ⁸.

Entre los amortiguadores de más éxito tenemos el hidroximetil aminometano (TRIS), el ácido N-Tris (hidroximetil) – amino etano sulfónico (TES), el ácido N – 2 – hidroximetilpiperazina – 2 – etano sulfónico (HEPES) (Molinia 94) y el 3 – (N-morfolino) ácido propano sulfónico ^{26,67,68,69}. El TRIS es el amortiguador orgánico más utilizado en la congelación de semen de varias especies y se ha combinado con muchos otros ingredientes con buenos resultados (con él se han obtenido mejores resultados) en cuanto a motilidad y espermatozoides vivos al descongelado ⁸.

Estos amortiguadores entran a la célula espermática y evitan cambios de pH intracelulares incrementando la tolerancia de las células a un aumento de cationes monovalentes ⁶⁹.

Azúcares

Los azúcares que se agregan a los diluyentes tienen varias funciones; actúan como reguladores de la presión osmótica del diluyente y tiene un efecto crioprotector ya que evita la formación de cristales de hielo dentro de la célula y mantiene la integridad de la membrana. Otra función importante es la de actuar como fuente de energía para la célula ^{26,70}.

La fructuosa es el principal carbohidrato que se encuentra en el semen de forma natural ⁵⁶, sin embargo, en los dilutores se agregan muchos otros azúcares como glucosa, sacarosa, arabinosa y lactosa, teniendo los mejores resultados con fructuosa y glucosa ⁶⁶.

Crioprotectores

Los espermatozoides en los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación, requieren proteger las membranas celulares del "choque frío"; adicionando sustancias crioprotectoras al diluyente, tales como el glicerol, el dimetil sulfóxido (DMSO) ^{71,72}, el etilenglicol (EG), la polivinil pirrolidona (PVP), el

hidroximetil almidón (HES) y la yema de huevo ^{8,26,69}, se obtiene tal efecto, aunque en cantidades suficientemente bajas para prevenir el "choque tóxico" ⁷³.

Los crioprotectores disminuyen el punto de congelación de las soluciones, reduciendo la concentración intra y extracelular de electrolitos, la excesiva deshidratación celular a temperaturas bajo cero y reducen la formación de cristales de hielo durante la congelación e influyen en su forma.

El glicerol y la yema de huevo son las sustancias crioprotectoras más comunmente usadas en los diluyentes para la congelación del semen ovino ^{8,69}. Sin embargo, existen otros compuestos también utilizados aunque no con mejores resultados, tal es el caso de la albúmina sérica bovina, suero fetal bovino, propano-1,2-diol (PD), adonitol y una proteína polar de peces conocida como "proteína anticongelante" ^{8,21,69,74}; actualmente se prueban productos vegetales como la lecitina de soya, para evitar la cotaminación microbiana con productos de origen animal ^{75,76}. Algunos azúcares poseen también propiedades crioprotectoras como la rafinosa y la lactosa, además de compuestos anfipáticos (hidrofóbicos e hidrofílicos) como la glicina, betaina, glutamina y prolina, estas últimas usadas en combinación con glicerol y yema de huevo ^{17,26}.

El glicerol tiene la capacidad de entrar a las células y su efecto crioprotector se atribuye a su capacidad ligadora de agua que evita la formación de cristales de hielo ^{69,77}; también actúa como diluyente al disminuir el grado de disociación de sales y provoca una disminución en la presión osmótica del medio de congelación ⁷⁸. Sin embargo, su principal efecto benéfico es extracelular a nivel de membrana plasmática donde se une con los fosfolípidos, proteínas y lipoproteínas ⁷⁸. También se le ha conferido cierto efecto bacteriostático ⁶⁹. La acción del glicerol es diferente en borregos que en toros ya que penetra más fácilmente en el espermatozoide ⁶⁹.

El porcentaje de glicerol incluido en los diluyentes para la congelación de semen de carnero es limitada por su toxicidad (altera la osmolaridad) ^{20,79}; este nivel depende del ritmo de congelación y enfriamiento, composición del diluyente y método de adición del glicerol ⁷⁶. Se ha encontrado que el ritmo más alto de congelación, con la concentración más óptima de glicerol y la mejor sobrevivencia espermática observada es de 4-6% de glicerol y un ritmo de congelación de 10-100°C/min ^{8,80,81}. Cuando se adicionan antioxidantes al diluyente la concentración de glicerol puede bajar a concentraciones de 3.5%, 2.5% o 2% ⁸.

El glicerol puede ser adicionado al semen en una fracción separada del diluyente (dos pasos) o directamente (un paso). Inicialmente se encontraron más ventajas en adicionar la porción glicerolada del diluyente a 29°C que a 5°C pero en pruebas recientes ha sido más exitosa la adición a 5°C; sin embargo, muchos investigadores no han encontrado diferencias entre adicionar el glicerol a 32°C que a 3°C ó a 22°C que a 5°C ⁵. Actualmente se ha informado que la adición de glicerol 30°C es más efectiva y práctica que la adición en porciones divididas, pero la eficiencia del método depende también del azúcar contenido en el diluyente ^{8,82,83}.

La yema de huevo es un constituyente común en los diluyentes del semen ya que confiere protección a la membrana plasmática del espermatozoide, previniendo el choque frío durante la congelación y descongelación. Ayuda a preservar la motilidad y la integridad del acrosoma y membranas mitocondriales, funciona como un amortiguador osmótico haciendo que las células sean más resistentes a diluyentes hipotónicos e hipertónicos. La protección dada por la yema de huevo es atribuida a su fracción lipoproteica de baja densidad y a su capacidad de adherirse a la membrana plasmática; la yema de huevo actúa tanto fresca como seca ^{69,77}. La yema de huevo es necesaria para proteger del daño estructural del acrosoma, debe estar en los diluyentes para congelamiento en un 15 a 20% máximo, porcentajes muy altos afectan la motilidad y fertilidad ⁸⁴. Para congelar semen en ampollitas se requieren concentraciones de 3 – 6%, pero para pellets el óptimo es 15% ⁶⁹.

Antibióticos

Las sustancias antimicrobianas son necesarias para el procesamiento del semen tanto en fresco como congelado; evitan el crecimiento de microorganismos reduciendo su número y la posibilidad de transmitir enfermedades ^{63,85}. Una mezcla muy usada en las diluciones del semen es la penicilina con estreptomicina ya que tienen un amplio espectro antibacteriano y no son antibióticos tóxicos para los espermatozoides. El sulfato de amikacina y los aminoglicósidos son fácilmente añadidos al diluyente y ayudan en el control de organismos resistentes a la estreptomicina ⁸⁵.

Sustancias antioxidantes

Los cambios ocurridos durante la preservación del semen pueden contribuir a la acumulación de productos tóxicos del metabolismo y de la peroxidación; estos últimos muy importantes por las especies reactivas de oxígeno ó radicales libres (ROS) ^{17,20,85} como el superóxido de hidrógeno (H₂O₂) y el anión superóxido (O₂⁻), que causan un estado de hiperactivación e inducen la reacción acrosomal ^{87,88}. Otro efecto detrimental de estos compuestos es la fragmentación del DNA ^{7,10,89}. Además de la peroxidación lipídica extracelular, la mitocondria es la principal fuente de ROS, por la cadena de transporte electrónico donde se realiza la reducción monoeléctronica del O₂, ^{90,91} generándose también un significativo daño en la membrana interna mitocondrial ⁸⁶. Algunos de los intentos para evitar los daños por peroxidación incluyen el procesamiento de semen bajo condiciones anaerobias, adición de antioxidantes y agentes quelantes ²⁶.

Como el semen de carnero casi no contiene antioxidantes naturales han sido añadidos antioxidantes sintéticos en los diluyentes para inhibir la peroxidación de fosfolípidos espermáticos, particularmente los ácidos grasos insaturados ⁴; algunos de ellos influyen también en el estado de maduración del espermatozoide ovino, equivalente a la capacitación o reacción acrosomal ^{17,87}. Se puso especial interés en el uso de la Vit E tanto natural como sintética pero se encontraron resultados variables dependiendo del los ingredientes utilizados en el diluyente ^{18,65,92}.

Muchas otras sustancias fueron probadas por su efecto antioxidante, tal es el caso del butilato de hidroxitolueno (BHT), 6-ditrat-butil-1, 4-kresol ("ionol" o "topanol") (DTBK), monoetanolamina ("Kolamina"), fosfoetanolamina, equinocromo A, y "epigin" (un producto soviético) ¹⁸. Otras sustancias probadas por los mismos efectos son butilato de hidroxianisole (BHA), n-propil gallate (n-PG), deferroxamina mesilato (Desferal), glutatión peroxidasa ⁹³, superóxido dismutasa ^{17,93}, catalasa ^{10,17,93,94} y piruvato ^{67,95}, estos últimos con poco efecto sobre la motilidad. Algunos como n-PG tuvieron un efecto tóxico ⁹².

El eyaculado de carnero contiene una escasa cantidad de superóxido dismutasa y pequeñas concentraciones de glutatión peroxidasa y catalasa, sin embargo, estas cantidades pueden ser reducidas considerablemente por la dilución del semen ^{93,95}.

Las altas concentraciones de inositol presentes en el fluido epididimal y plasma seminal de varias especies incluyendo el carnero, protege a varias enzimas del efecto de congelamiento y de la peroxidación de lípidos, además de mantener la integridad del acrosoma en el semen descongelado. Otras sustancias encontradas en el plasma seminal y que tienen una actividad antioxidante son la carnosina, el ácido ascórbico y la prolina ⁹⁶.

Aminoácidos como la taurina y la hipotaurina se encuentran en altas concentraciones en los tejidos y fluidos reproductivos en mamíferos tanto de hembras como de machos. De ambos se ha reportado un efecto crioprotector para los espermatozoides bovinos. La hipotaurina posee un efecto importante como antioxidante protegiendo de las especies reactivas de oxígeno ⁹⁶.

Sustancias reguladoras del metabolismo

Se ha observado que con el uso de retardadores del metabolismo celular y antioxidantes en los diluyentes, se ha logrado incrementar la fertilidad del semen congelado en ovinos. Con el uso de reguladores del metabolismo como la rotenona ¹⁰, antimicina ¹¹, 2-deoxiglucosa ¹⁵ y la monensina ¹⁴ se puede manipular el metabolismo de los espermatozoides. La actividad de estas sustancias incrementa la capacidad de los diluyentes para preservar la vida espermática e incrementar la viabilidad del semen congelado.

La rotenona es un potente inhibidor de la función mitocondrial, que disminuye la tasa respiratoria de las células. Es un producto vegetal de Sudamérica utilizado como insecticida que bloquea el flujo electrónico del NADH a la coenzima Q, actuando en forma competitiva ^{13,98,99}. Este producto ha sido utilizado en numerosas ocasiones en combinación con células espermáticas, con el fin de regular el metabolismo espermático; se ha utilizado en varias especies a diferentes dosis: 0.12 μM en ratones⁷⁷, 0.5, 1 y 2 μM en equinos¹³, 5 y 4 μM en bovinos^{10,11,101}, 1 μM en gallos¹⁰² y 10 μM en carneros¹⁵. La utilización de este producto en los medios empleados para la congelación, podría disminuir la gran demanda metabólica que presentan los espermatozoides evitando los daños ocasionados a la mitocondria en el proceso de congelación y descongelación. Si se considera que parte de este daño mitocondrial se da a nivel de aparato genital de la borrega, debido a los bajos niveles de glucosa y otros azúcares glicolisables,

la rotenona serviría para mantener la capacidad de fertilización del espermatozoide ovino¹⁰³.

CONGELACIÓN DEL SEMEN

Las temperaturas y velocidades de congelamiento y descongelado son críticas para la fertilidad del semen. Se menciona como norma general que mientras más rápido se congele y descongele el semen se obtendrá una mejor recuperación espermática¹⁰⁴. Existen algunos reportes en la literatura en donde se han evaluado el efecto de la velocidad de congelación sobre la motilidad y reacción acrosomal¹⁰⁵. O'Neill observó que el semen congelado rápidamente (de 5°C a -25°C con -5°C/min) tuvo una mejor viabilidad, actividad mitocondrial e integridad de las membranas post-descongelación, que el semen congelado lentamente¹⁰⁶.

Con la finalidad de evitar el choque frío en los espermatozoides se requiere de un "periodo de equilibrio" antes de congelar el semen; este consiste en bajar lentamente la temperatura de 30°C a 5°C, temperatura que se alcanza manteniendo el semen en refrigeración durante 2 a 3 horas. Durante este proceso el semen puede ser envasado^{8,28}.

El proceso de congelación consiste en descender la temperatura de 5°C a -196°C que es la temperatura del nitrógeno líquido; a esta temperatura los espermatozoides detienen las reacciones metabólicas y la consecuente acumulación de ácido láctico que al ser acumulado baja el pH y la sobrevivencia de los espermatozoides⁸.

Para contener las dosis de semen a congelar pueden usarse pajillas de cloruro de polivinilo (PVC), minitubos o en forma de pellets. La congelación en pajillas se hace con nitrógeno líquido y la velocidad de enfriamiento es regulada por la distancia entre éste y las pajillas. La distancia óptima entre las pajillas y el nitrógeno líquido es de 4 a 6 cm y pueden ser selladas con calor o alcohol polivinílico^{6,18}. Alcanzada la temperatura entre -75°C y -125°C no se tiene efecto sobre los espermatozoides, pero los vapores a -55°C reducen la sobrevivencia⁸, ya que la zona crítica de temperatura es de -15°C a -60°C^{18,106}. Después de 8 a 10 minutos en los vapores de nitrógeno las pajillas se sumergen a -196°C para ser conservados. La mayoría de las pajillas disponibles son de 0.25 ml y 0.5ml.

En la congelación en forma de pellets se requiere una placa especial, con depresiones y enfriada en nitrógeno líquido; con este método se alcanzan temperaturas de congelación de -100°C a -160°C . También pueden hacerse éstas depresiones sobre hielo seco (dióxido de carbono sólido a -79°C). El semen es vertido en dichas depresiones y una vez terminada la congelación se transfiere a un tanque de nitrógeno líquido para preservarse. La velocidad de enfriamiento en este método puede variar por el volumen de semen y por la temperatura del agente congelante ⁸.

La congelación en pajillas tiene la ventaja de poder identificar las dosis de mejor manera, permiten un manejo simple y evitar en gran medida el desperdicio de semen al momento de la inseminación ²⁸. Una de las desventajas que tienen los pellets es la posibilidad de ser contaminados durante el proceso de congelación y descongelación. Las pajillas pueden ser congeladas y selladas de forma automática ²⁶. La congelación en pellets es más barata y rápida que la congelación en pajillas, sin embargo, su almacenamiento y descongelación es más difícil ^{28,107}.

DAÑOS AL ESPERMATOZOIDE DURANTE EL PROCESAMIENTO DEL SEMEN

Los procesos de criopreservación incluyen: reducción de temperatura, deshidratación celular, congelación y descongelación ⁷. Aunque la motilidad es preservada en una proporción relativamente alta (40 a 60%) en semen de ovino descongelado, sólo el 20 ó 30% de los espermatozoides permanecen biológicamente sin daños. Los cambios criogénicos del espermatozoide, son responsables de un decremento en la integridad funcional o transporte efectivo en el aparato genital femenino, hasta el sitio de fertilización ^{8,26,108}.

El criodaño básicamente puede ser ultraestructural (físico), bioquímico o funcional. El daño ultraestructural ocurre en la membrana plasmática, membrana acrosomal, el acrosoma, membrana mitocondrial y axonema; este es acompañado de un daño bioquímico, donde hay pérdida de elementos vitales, como: lipoproteínas, aminoácidos, colesterol, potasio, prostaglandinas, reducción de la síntesis de ATP y ADP, inactivación de la hialurodinasa y actividad proteolítica acrosomal, además de un incremento en la cantidad de sodio intracelular ^{8,9}. Otro

daño ultraestructural que se presenta es a nivel de ADN, donde se modifica la estructura de la cromatina⁸. Estos cambios criogénicos son los responsables de la disminución en la integridad funcional del espermatozoide y por lo tanto de la baja biavilidad^{8,26,55}.

Durante los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación, las membranas celulares están expuestas a estrés, desde la inclusión del crioprotector antes de congelarse, cambios de volumen asociados con el encogimiento celular en respuesta a soluciones hiperosmóticas que causan deshidratación, cambios de temperatura que modifican los fosfolípidos de la membrana y finalmente la formación de hielo intracelular⁷⁸.

El primer criodañó que ocurre en la membrana es la ruptura por efectos térmicos, mecánicos, químicos y osmóticos^{55,78,109}. Un efecto dramático ocurre entre los -15 a -60°C (no durante el almacenamiento en nitrógeno líquido)^{78,106}. Sin embargo un cambio importante se da en la permeabilidad de la membrana plasmática, este fenómeno está relacionado con el cambio en la configuración de los fosfolípidos membranales como una respuesta a los cambios de temperatura que alteran su estado físico^{7,20,26,36}, esto es conocido como "choque frío"^{7,16,26,110}. Cuando se desestabiliza la membrana plasmática se ocasiona la entrada de calcio a la célula^{9,17,110} y se provoca un estado de capacitación prematura^{6,7,85,108,111,112,113}.

Otra membrana que es dañada con los procesos de congelación y descongelación, es la acrosomal, donde se induce una desestabilización de la membrana y termina en una reacción acrosomal adelantada. Se ha encontrado que de 43 a 57 % de la población espermática sufre daño acrosomal^{6,49,50,71,106,109,111,113,114}. Esta condición no está del todo clara, se sabe que es promovida por los procesos de congelación (entrada de calcio)²⁰ y por algunos ingredientes de los diluyentes tales como el glicerol. La respiración mitocondrial es disminuida desde que baja la temperatura^{16,106}. Las alteraciones en la mitocondria pueden conllevar directamente a pérdida de la motilidad o tener como consecuencia indirecta un decremento en la producción de ATP^{36,115}, el glicerol puede ayudar a incrementar la motilidad pero no proteger la mitocondria¹¹⁵. El daño en la mitocondria se lleva a cabo durante la congelación y descongelación (formación de cristales de hielo dentro) no durante el periodo de equilibrio (de 30 a

5°C) ¹⁶. Los ingredientes utilizados en el diluyente influyen en la actividad mitocondrial, como los observados por Windsor and White 1995 al utilizar sorbitol y DMSO ⁹.

Los procesos de criopreservación causan una disminución del 50% de espermatozoides viables ¹¹⁵, aquellos que permanecen mótilles (aparentan estar funcionalmente intactos) pueden participar en la fertilización de óvulos ¹⁷, sin embargo, hay una gran mortalidad embrionaria temprana ya que muchos espermatozoides contienen un daño en su ADN ²⁰.

DESCONGELACIÓN DEL SEMEN

Se ha encontrado que no hay mucha diferencia en la sobrevivencia del semen congelado por diferentes métodos (ámpulas, pajillas o pellets), sin embargo, existen diferencias en la velocidad y temperatura de descongelación. Los espermatozoides que han sobrevivido a los procesos de enfriamiento y congelación a -196°C requieren ser descongelados y calentados, lo que implica pasar nuevamente por un rango crítico de temperatura que es entre -15°C y -60°C ^{18,106}. En el caso del espermatozoide ovino, el daño mayor ocurre entre los -10°C y -25°C, la zona de cristalización ¹⁰⁶.

Ambos, velocidad y temperatura de enfriamiento y descongelación tienen un efecto sobre la sobrevivencia del espermatozoide. Este efecto depende de si el enfriamiento ha sido lo suficientemente rápido para inducir la congelación intracelular o lo suficientemente lenta para permitir la deshidratación celular. En ambos casos la descongelación rápida se requiere para evitar la recristalización o la presencia de hielo dentro de la célula espermática, así como los cambios de osmolaridad. Los espermatozoides descongelados rápidamente son expuestos, por un periodo corto de tiempo, a las concentraciones de solutos y del crioprotector (p. ejem. glicerol), y la restauración del equilibrio intra y extracelular es más rápido que al ser descongelado lentamente ¹⁸.

Los pellets de semen congelado de carnero pueden ser descongelados en solución o en tubos secos. En cualquier caso, no sólo la presencia sino también la composición del diluyente tiene influencia en la recuperación de la motilidad. Soluciones con inositol-citrato, glucosa-citrato y fructuosa fueron mejores que rafinosa-citrato-yema de huevo a igual temperatura de descongelación (37°C) ⁸.

Rangos de temperatura entre 37°C y 75°C han sido revisados en ambos casos, con o sin soluciones y generalmente se mejora la motilidad al aumentar la temperatura ⁸. El semen de carnero congelado en pajillas ha sido descongelado en un rango de 38°C a 42°C. Algunos otros reportan descongelaciones a altas temperaturas (60°C a 75°C) con resultados similares. Esto se lleva a cabo con la inmersión de las pajillas en agua. El método más usado es aquel donde se mantiene la pajilla a 37°C durante 15 o 20 segundos. Cuando se usan altas temperaturas el tiempo disminuye (8 segundos) ^{18,26,110,115}.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó durante la época reproductiva del año 2001, en el mes de noviembre, en las instalaciones del Centro de Reproducción y Mejoramiento Genético Ovino-Caprino ubicado en el Km 4 carretera Irapuato-Salamanca, municipio de Irapuato en el estado de Guanajuato; el lugar se encuentra a una altura de 1794 m sobre el nivel del mar, a 20°44' de latitud norte y 100°45' de longitud oeste. El clima es (A)C(Wo)(W)a(e)g con una precipitación pluvial promedio de 6.1 cm y una temperatura promedio de 20.3°C¹⁷.

Preparación del diluyente de congelación

El diluyente base, utilizado como medio de congelación, se preparó de la siguiente manera:

Triladyl ^{®1}	20%
Yema de huevo	20%
Agua Tridestilada	60%

Colección del semen

Para la obtención del semen se utilizaron 6 carneros adultos de diferentes razas y edades como se muestra en el siguiente cuadro:

Cada macho disponía de una sementalera individual con medidas de 3X3 mts. En promedio cada animal recibía al día 300 gr de alimento comercial que contenía 18% de proteína cruda y 2.9 Kcal; además de 1 kg de alfalfa achicalada y paja de avena *ad libitum*. Los sementales permanecieron 5 días previos a la colecta en descanso reproductivo.

Macho	Raza	Edad	Peso
AF901	Ile de France	3 años	90 Kg
CH S/N	Charol	3 años	95 Kg
D	Dorper	9 meses	65 Kg
EF065	East Frisian	3 años	85 Kg
EF139H	East Frisian	2.5 años	95 Kg
F9	Charol	4 años	110 Kg

¹Triladyl[®] Minitub, Alemania. Ingredientes: Agua bidestilada, glicerol 6%, Tris, Ac. cítrico, fructuosa; por cada 100 ml (5 mg tilosina, 25 mg gentamicina, 30 mg espectinomina y 15 mg lincomicina).

Para la colección se utilizó una hembra en celo como maniquí y una vagina artificial mantenida a una temperatura interna de 40 a 42°C, conectada a un tubo colector graduado en mililitros, con temperatura de 30°C y protegido de los rayos del sol ²⁸. Se obtuvieron un total de treinta eyaculados, es decir 5 de cada semental. Inmediatamente después de la colecta se hizo una dilución inicial 1:1 del semen con el diluyente base para la congelación ¹⁷, y se mantuvo en baño María a una temperatura de 30°C, por un periodo de 20 a 30 minutos.

Evaluación del semen

Los eyaculados obtenidos fueron evaluados en cuanto a: color por observación directa, volumen dado directamente por el tubo colector graduado, concentración mediante un hemocitómetro ²⁹, motilidad por observación en microscopio óptico y morfología mediante una tinción de eosina-nigrosina ^{26,28,31}.

Dilución del semen y tratamiento

Después de conocer la concentración espermática de cada eyaculado se separó en tres porciones y se hizo una dilución final del semen del mismo semental, para obtener una concentración de 100 millones de espermatozoides en 0.25 ml (dosis). A cada porción se le asignó el siguiente tratamiento:

- Grupo A se agregó el diluyente de congelación sin rotenona (testigo)
- Grupo B se agregó diluyente de congelación con 4 µM de rotenona
- Grupo C se agregó diluyente de congelación con 8 µM de rotenona

Congelación del semen

El semen ya diluido se mantuvo en periodo de equilibrio durante 2 horas a temperatura de refrigeración entre 4 y 5°C ²⁸. Al inicio de este periodo se hizo el empajillado del semen en pajillas de 0.25 ml con una concentración espermática de 100 millones por dosis. La congelación se hizo en forma manual en un recipiente de poliuretano, colocando las pajillas horizontalmente a 5 cm de la superficie del nitrógeno líquido durante 10 minutos para ser sumergidos finalmente en el termo de nitrógeno líquido ⁸.

Descongelación del semen

Las pajillas fueron descongeladas 24 horas después de haber terminado el proceso de congelación. Se mantuvieron 10 segundos en el aire y después en baño María a una temperatura de 37°C por 20 segundos ^{8,118}. El contenido de cada pajilla fue vertido en una alicuota de forma individual, manteniéndose a una temperatura de 37°C por 12 horas. La vida media de los espermatozoides se evaluó observando su motilidad en el microscopio usando una platina caliente con una temperatura de 37°C. Con la finalidad de evaluar células vivas se realizaron tinciones de Azul de Tripán.

Diseño experimental

Se realizaron las evaluaciones del semen descongelado tomando las muestras de la alicuota cada cuatro horas hasta llegar a doce horas (0, 4, 8 y 12 horas). En total se evaluaron 162 pajillas que correspondieron a 54 con diluyente base (Gpo. A); 54 pajillas con diluyente base mas 4 μM de rotenona (Gpo. B); 54 con diluyente base mas 8 μM de rotenona (Gpo. C).

Análisis estadístico

Los datos correspondientes a motilidad y espermatozoides vivos expresados en porcentaje y en valores transformados mediante la función arcoseno fueron analizados mediante un análisis de varianza multivariado para mediciones repetidas, en donde las variables independientes son el grupo, semental y el tiempo. Los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico Sistema de Análisis Estadístico –SAS- ¹¹⁸.

IV. RESULTADOS

COLECCIÓN DE SEMEN

El volumen del semen colectado por eyaculado entre los sementales, estuvo dentro de un rango de 0.4 a 1.2 ml, con una concentración de 2.2 a 6.4 mil millones de espermatozoides por mililitro. Los eyaculados presentaron un color y olor normal así como un porcentaje menor al 15 de anomalías morfológicas.

MOTILIDAD

***Semen fresco**

En el cuadro 1 se presenta el promedio de motilidad en masa de los diferentes sementales; al momento de la colecta los machos presentaron una motilidad entre 85 y 95% que se mantuvo después de la dilución, terminado el periodo de equilibrio se notó una disminución de la motilidad teniendo como promedio 83.6%.

La prueba de esfericidad de Mauchly indicó que es más adecuado el análisis multivariado para mediciones repetidas que un análisis de varianza simple para comparar los grupos.

El análisis de varianza multivariado para mediciones repetidas indicó que hay diferencia entre grupos ($P < 0.01$), diferencia entre sementales ($P < 0.01$), diferencia entre tiempos ($P < 0.01$) y la interacción grupo-tiempo y semental tiempo fueron significativas ($P < 0.01$). Por lo que debido a la presencia de la interacción, los resultados de los grupos se presentan para cada uno de los tiempos.

***Semen descongelado**

La motilidad al descongelado (0 horas) presentó diferencia entre grupos, siendo mayor en el grupo A seguido de B y C. La motilidad a las cuatro horas presentó diferencia entre grupos, siendo mayor en el grupo A seguido de B y C. La motilidad a las ocho horas presentó diferencia entre grupos, siendo mayor en el grupo A seguido de B y C. La motilidad a las doce horas presentó diferencia entre grupos, siendo mayor en el grupo C seguido de B y A. Estos resultados se presentan en el cuadro 2.

En la gráfica 1 se observa que el semen descongelado presentó una motilidad superior en el grupo testigo seguido de 4 μM -Gpo B- y 8 μM -Gpo C- de rotenona, manteniéndose así hasta las 8 horas. Sin embargo se mostró una caída drástica en la motilidad del grupo testigo -Gpo A- a las 12 horas, mientras que el grupo prueba con 8 μM de rotenona presentó la motilidad más alta seguida del grupo B.

La motilidad promedio presentada por cada semental en los periodos de evaluación mostraron un efecto significativo entre los diferentes grupos. En el caso del grupo A sobresalió el desempeño del semental D, el cual a las cero horas mostró una motilidad de 63.8% y un 25.5% a las doce horas; esto en comparación con el semental CHS7N que tuvo un 68.8%, y un 13.8% de motilidad respectivamente (ver gráfica 1A del anexo).

En la motilidad del grupo B sobresalió el desempeño del semental CHS/N que presentó un 64.4% a las cero horas y la mejor motilidad del grupo a las doce horas con un 38.8%, en comparación con el semental F9 que inició con 60.5% y terminó con la motilidad más baja a las doce horas con 22.2% (ver gráfica 2A del anexo).

En el caso del grupo C el semental AF901 presentó la motilidad mayor con 58.8% a las cero horas y 38.8% a las doce, comparado con el F9 que presentó la motilidad más baja con 53.8% al descongelado y 31.6% a las doce horas (ver gráfica 3A del anexo). Los sementales restantes no señalados se mantuvieron dentro de los rangos mencionados. Los valores de cada semental se presentan en el cuadro 1A del anexo.

PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS

Existió diferencia entre grupos en el porcentaje de espermatozoides vivos a las cero horas, siendo mayor en el grupo C seguido de B y A. El porcentaje de espermatozoides vivos a las cuatro horas presentó diferencia entre grupos A y C, B y C, siendo mayor el porcentaje en el grupo C seguido de B y A. El porcentaje de espermatozoides vivos a las ocho horas presentó diferencia entre los grupos A y C, B y C, siendo mayor el porcentaje en el grupo C seguido de B y A. El porcentaje de espermatozoides vivos a las 12 horas presentó diferencia entre

grupos, siendo mayor en C seguido de B y A. Estos resultados se presentan en el cuadro 3.

En la gráfica 2 se observa que el porcentaje de espermatozoides vivos presentó desde un inicio -0 horas-, un valor mayor para el grupo C seguido de B y A. Esta relación se mantiene con el paso del tiempo hasta la última evaluación donde se observa un valor muy superior de espermatozoides vivos con 8 μ M de rotenona.

El promedio de espermatozoides vivos presentados para cada semental en los periodos de evaluación, mostraron un efecto significativo entre los diferentes grupos. En esta evaluación sobresalió el comportamiento del semental AF901 que presentó la mayor sobrevivencia a las doce horas postdescongelación en los tres grupos (A-26.2%, B-32.7% y C-40.7%) comparado con el semental F9 que mostró el promedio más bajo a las doce horas postdescongelación con un 12.7% para el grupo A y 30.1% para el grupo C (ver gráficas 4A y 6A del anexo). En el caso del grupo B el semental con el promedio más bajo de espermatozoides vivos fue el EF065 con 20.8% (ver gráfica 5A del anexo). Los sementales restantes no señalados se mantuvieron dentro de los rangos mencionados. Los valores de cada semental se presentan en el cuadro 2A del anexo.

Cuadro 1

Motilidad promedio del semen de carnero en estado fresco de los diferentes sementales

Macho	Colecta ^a	Dilución ^b	P. Equilibrio ^b
AF901	90.0	88.3	86.7
CH S/N	90.0	90.0	83.3
D	85.0	85.0	80.0
EF065	95.0	95.0	90.0
EF139H	85.0	85.0	78.3
F9	90.0	90.0	83.3
Promedio	89.2±3.8	88.9±3.7	83.6±4.2

a Los valores de la celda en la Colecta corresponden a n=1

b Los valores de las celdas Dilución y P. Equilibrio corresponden a n=3

Cuadro 2

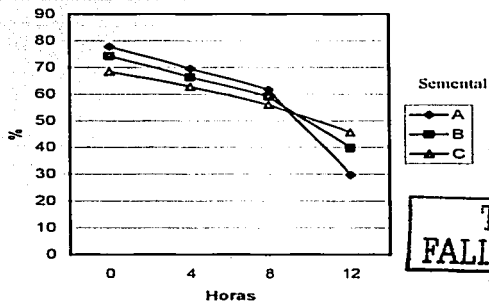
Motilidad promedio del semen de carnero al descongelado de los grupos: A (Diluyente base ó testigo), B (Diluyente base más 4 μM de rotenona) y C (Diluyente base más 8 μM de rotenona)

Grupo	TIEMPO			
	0 h	4 h	8 h	12 h
A TESTIGO	67.7 ^c \pm 3.8	59.5 ^c \pm 2.8	51.7 ^c \pm 4.2	19.7 ^a \pm 5.0
B 4 μM	64.3 ^b \pm 3.4	56.2 ^b \pm 3.6	49.1 ^b \pm 3.8	29.8 ^b \pm 5.9
C 8 μM	58.4 ^a \pm 3.3	52.7 ^a \pm 2.8	46.2 ^a \pm 3.5	35.5 ^c \pm 3.3

Letras diferentes en la misma columna indica diferencia entre los promedios de motilidad ($P < 0.05$)

Gráfica 1

Motilidad promedio del semen al descongelado de los grupos: A (Diluyente base), B (Diluyente base más 4 μM de rotenona) y C (Diluyente base más 8 μM de rotenona)



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3

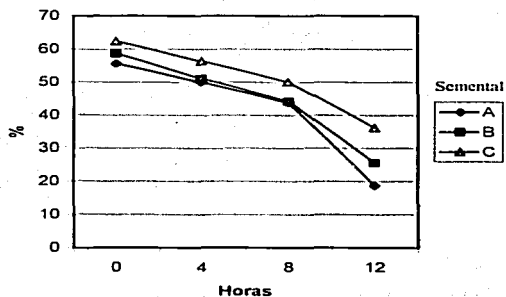
Porcentaje de espermatozoides vivos en semen de carnero al descongelado en los grupos: A (Diluyente base ó testigo), B (Diluyente base más 4 μM de rotenona) y C (Diluyente base más 8 μM de rotenona)

Grupo	TIEMPO			
	0 h	4 h	8 h	12 h
A TESTIGO	55.5 ^a ±4.5	49.8 ^a ±5.1	43.8 ^a ±4.9	18.7 ^a ±5.5
B 4 μM	58.5 ^b ±3.4	51.0 ^a ±4.9	44.0 ^a ±3.4	25.5 ^b ±4.7
C 8 μM	62.2 ^c ±4.3	56.2 ^b ±4.7	49.9 ^b ±3.6	36.1 ^c ±3.9

Letras diferentes en la misma columna indica diferencia entre los promedios de motilidad (P<0.05)

Gráfica 2

Porcentaje de espermatozoides vivos en semen de carnero al descongelado en los grupos: A (Diluyente base ó testigo), B (Diluyente base más 4 μM de rotenona) y C (Diluyente base más 8 μM de rotenona)



V. DISCUSIÓN

La motilidad es esencial para el proceso de fertilización. Sin embargo aunque es una característica esencial de los espermatozoides viables, no necesariamente es indicativo de su capacidad fecundante³¹. Por lo que también es necesario valorar el tiempo de sobrevivencia de los espermatozoides al descongelado, para lo cual los espermatozoides deben de mantenerse en condiciones propicias (temperatura a 37°C, medio nutritivo bajo condiciones de incubación)⁹².

En el presente estudio para evaluar el efecto de la rotenona como inhibidor metabólico, la motilidad del semen fue valorado al descongelado (cero horas), 4, 8, y 12 horas. Los resultados obtenidos muestran que al momento de la descongelación (cero horas), la motilidad en el grupo A (67.7 %) es mayor en relación al B(64 %) y al C(58.4 %), observándose diferencias significativas entre grupos($P < 0.05$).

La valoración de la motilidad individual realizada en este trabajo fue de manera subjetiva. Los porcentajes de esta variable se observan superiores a los rangos que algunos investigadores han reportado con respecto al semen descongelado en ovinos y en otras especies (45- 55%)^{32,64,77,104,119}. Pero a pesar de esto el porcentaje de motilidad registrado en el grupo A y B son inferiores al porcentaje, reportado por D'Alessandro *et al* 2000 (73%), donde realizan una evaluación de semen envasado en pajillas de manera también subjetiva¹²⁰. Bag, *et al* en 1999, evalúan la motilidad espermática al descongelado en ovinos con el apoyo del sistema CASA y reportan un (72.2 %) ¹²¹. El porcentaje observado en el grupo C está dentro de los rangos reportados. Estos reportes nos indican que en este trabajo la motilidad no fue sobrevaluada. Según Chemineau *et al* 1991, el semen no debe tener menos de un 40% de motilidad al descongelado²⁸, y 30 % después de 5-6 horas de incubación²⁹, para alcanzar buenos porcentajes de fertilidad con semen congelado en los programas de inseminación. Apoyándonos en este reporte se considera que los promedios de motilidad registrados al descongelado en el presente estudio son óptimos para la inseminación artificial.

El comportamiento de la motilidad individual de los espermatozoides en los 3 grupos, nos indica ya un efecto de los tratamientos, en donde se aprecia que en el grupo A (testigo) la motilidad es alta con respecto al B y C. La motilidad observada a las cuatro y ocho horas postdescongelación tanto en el grupo A, B, y C, muestran diferencias ($P < 0.01$) (cuadro 2). Los promedios de motilidad obtenidos a las cuatro horas son inferiores a lo reportado por D'Alessandro *et al.*, 2000 (69%) donde evalúa bajo condiciones de incubación por 3 horas la motilidad del semen, congelados en pajillas con una concentración de 100 millones de espermatozoides, mediante un programa computarizado¹²⁰. Valcárcel *et al.*, 1994 reportan una motilidad del 40% a las cuatro horas y un 14% a las ocho horas, estos promedios están por debajo de los alcanzados en este estudio⁴⁴; hay que mencionar que la motilidad del semen que ellos emplearon en la congelación mostraba desde un inicio una motilidad menor (71%) al presentado por los seminales utilizados en este trabajo (89%), posiblemente ésto fue un factor que influyó en el resultado obtenido en su evaluación⁴⁴.

La evaluación de la motilidad realizada en estos periodos de tiempo en los diferentes grupos muestra el efecto de la rotenona^{46,101} y se observa claramente en la valoración realizada a las doce horas postdescongelación, como el Grupo C mantiene una motilidad mayor con respecto a B y A, las diferencias observadas entre B y C están dadas por las concentraciones de la sustancia usada en estos grupos.

El comportamiento de la motilidad espermática en los tres grupos, en los cuatro periodos de valoración, mostró en el grupo A y B una mayor motilidad hasta las ocho horas postdescongelación, posteriormente a las doce horas se observa que en el grupo C mantiene una motilidad superior al grupo A y B. El comportamiento de la motilidad registrado en este trabajo se le atribuye al efecto de la rotenona, debido a que es un potente inhibidor de la función mitocondrial, que disminuye la tasa respiratoria de las células^{9,102,103}. Esta sustancia probablemente provocó una disminución en la gran demanda metabólica que presentan los espermatozoides del ovino. Reflejándose en la conservación de una motilidad aceptable en el grupo C por un periodo de tiempo mayor, dado que no se presentó el mismo gasto energético como el que tuvieron los espermatozoides en los otros grupos.

Las diferencias de motilidad y sobrevivencia espermática, observada entre los sementales, en los diferentes grupos, podrían ser atribuidas a las características individuales ya que se encontró diferencia en el grupo testigo, por lo que estas variaciones no se atribuyen a los tratamientos dados. Algunos investigadores argumentan que estas variaciones entre razas e individuos, posiblemente están dadas por los componentes bioquímicos del líquido seminal que modifican de alguna manera la respuesta de la célula espermática a la criopreservación^{6,16,26,122}.

La sobrevivencia de los espermatozoides, en los periodos de tiempo en el cual se realizó la valoración en los grupos A, B y C, en este trabajo, mostraron diferencias entre grupo ($P < 0.05$). El número de espermatozoides entre grupos al descongelado (0 horas) está dentro de los rangos reportados por otros investigadores que han obtenido de un 50 hasta un 65 % de células vivas^{16,72,82,119}. Dichos resultados están dentro del 50 % de células vivas postdescongelación indicado por Salamon., 2000⁸.

La viabilidad espermática observada postdescongelación a las cuatro horas, aún existiendo diferencias entre grupos, sigue estando dentro del margen del 50 % de células vivas informado por Salamon., 2000 y D'Alessandro *et al.*, 2000^{8,120}. Estos resultados son similares a los informados por Bilodeau *et al.*, 2002 en semen bovino evaluado tres horas postdescongelación (55%)⁹⁵.

En la evaluación de espermatozoides vivos a las ocho horas se encontró un mayor porcentaje en el grupo C, lo cual es muy similar a lo reportado por Bilodeau *et al.*, 2002, en una evaluación realizada a las seis horas postdescongelación en bovinos (50%)⁹⁵. En el caso de semen descongelado se dispone de escasa información donde se evalúe la sobrevivencia espermática mas allá de seis horas, por lo que los datos obtenidos a las ocho y doce horas en este estudio no pueden ser comparados.

Lo que resalta en la evaluación de esta variable, es que en el grupo C se observó una mayor cantidad de espermatozoides vivos, durante los cuatro intervalos de tiempo valorados; se obtuvo un rango de sobrevivencia de las cero hasta las doce horas de 62.2 y 36.1 %. Estos resultados nos sugieren que la rotenona probablemente favoreció la sobrevivencia espermática en el grupo C, debido a su efecto regulador en la tasa metabólica del semen ya que fue mayor en

este grupo que en el grupo A y B. Si consideramos, que cuando el metabolismo espermático se realiza en condiciones anaeróbicas, aunado a una mayor tasa metabólica, hay una mayor producción de ácido láctico, modificándose el pH del medio en donde se mantiene el semen, ésta alteración repercute en forma detrimental en la integridad del espermatozoide, comprometiendo su sobrevivencia^{47,60,123}. Por lo que se considera que una de las causas que probablemente influyeron en la baja sobrevivencia espermática de los grupos A y B se debió a este fenómeno bioquímico.

La sobrevivencia espermática observada a las doce horas con 8 μM de rotenona mantiene un porcentaje de células vivas suficientes que podría asegurar una posible fertilización. El porcentaje de sobrevivencia espermática es importante considerarlo ya que el lapso de vida fértil de los espermatozoides y del óvulo determina la tasa de concepción. La longevidad del espermatozoide que ha sufrido los procesos de congelación y descongelación se reduce en comparación con el semen fresco, lo cual toma relevancia dependiendo del sitio de deposición en la IA. En algunos reportes se dice que con 15 millones de espermatozoides motiles se garantiza la fertilización intrauterina⁶; las concentraciones de espermatozoides vivos obtenidos en el grupo C a las doce horas, está por encima de ésta cantidad, por lo que, el empleo de la rotenona en los medios de conservación de semen podría mejorar los resultados en los programas de IA, sin embargo para evaluar la efectividad de la rotenona, es necesario realizar inseminaciones con medios donde se incluya para la congelación, empleando diferentes vías de inseminación.

VI. CONCLUSION

Se concluye que la motilidad del semen de carnero postdescongelado mantuvo una motilidad superior en el grupo testigo, sin embargo, a las 12 horas la concentración de 8 μM de rotenona tuvo un efecto favorable en el medio de congelación, manteniendo una mejor motilidad in vitro y una mayor cantidad de espermatozoides vivos durante las cuatro evaluaciones

VII. LITERATURA CITADA

- 1.-Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci* 2000;62:23-53.
- 2.-Vishwanath R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology* 2003;53:571-584.
- 3.-Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC. Transcervical artificial insemination of australian merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology* 1994;42:147-157.
- 4.-Halbert GM, Dobson H, Walton JS and Buckrell BC. The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology* 1990;33:977-992.
- 5.- Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology* 1990;33:993-1010.
- 6.- Vivanco MHW. Inseminación artificial en ovinos. Memorias de Aplicación de Técnicas Biotecnológicas en la Reproducción de Ovinos y Caprinos; 1998 octubre 26-27; Chapingo, México. 1998:135-194.
- 7.- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. *Theriogenology* 2002;57:327-344.
- 8.-Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:77-111.
- 9.-Windsor DP and White IG. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial insemination or frozen storage. *Anim Reprod Sci* 1995;40:43-58.
- 10.-Hammerstedt RH, Volonté C, Racker E. Motility, heat, and lactate production in ejaculated bovine sperm. *Arch Biochem Biophys* 1988;266:111-123.
- 11.-Krzyszosiak J, Molan P and Vishwanath R. Measurements of bovine sperm velocities under true anaerobic and aerobic conditions. *Anim Reprod Sci* 1999;55:163-173.
- 12.-Windsor DP and White IG. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sper rhodamine 123 accumulation. *Mol Reprod Dev* 1993;36:354-360.
- 13.-Papaioannou ZK, Murphy PR, Monks SR, Inés N, Ryan PM, Boland PM and Roche FJ. Assessment of viability and mitochondrial function of equine spermatozoa using doubles staining and flow cytometry. *Theriogenology* 1997;48:299-312.

- 14.-Scheffler EI. Mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation En: Mitochondria. EUA: Wiley-Liss, 1999.
- 15.-Windsor DP. Mitochondrial function and ram sperm fertility. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:279-284.
- 16.-Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:871-891.
- 17.-Maxwell WMC and Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 1996;42:55-65.
- 18.-Salamon S. Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 1995;38:1-36.
- 19.-Lightfoot RJ and Salamon S. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method; I Transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewe. *J Reprod Fert* 1970;22:385-398.
- 20.-Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61:481-492.
- 21 -Upreti GC, Payne SR, Duganzich DM, Oliver JE, Smith JF. Enzyme leakage during cryopreservation of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1996;41:27-36.
- 22.-Ritar AJ, Ball PD. The effect of freeze-thawing of goat and sheep semen at a high density of spermatozoa on cell viability and fertility after insemination. *Anim Reprod Sci* 1993;31:249-262.
- 23.-Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Guillan L, Gellatly ES and Mcphie CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fert Dev* 1999;11:123-126.
- 24.-Eppleston J, Salamon S, Moore NW and Evans G. The depth of cervical insemination and site of intrauterine insemination and their relationship to the fertility of frozen-thawed ram semen. *Anim Reprod Sci* 1994;36:211-225.
- 25.-Wuolster-Raddcliffe MC, Lewis GS. Development of a new transcervical artificial insemination method for sheep: effects of a new transcervical artificial insemination catheter and transversing the cervix on semen quality and fertility. *Theriogenology* 2002;58:1361-1371.
- 26.-Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000;53:47-58.
- 27.-Eppleston J, Maxwell WMC. Sources of variation in the reproductive performance of ewes insemination with frozen-thawed ram semen by laparoscopy. *Theriogenology* 1995;43:777-788.

- 28.-Chemineau P, Cagnié Y, Guérin Y, Orgeur P, Vallet JC. Training manual on artificial insemination in sheep and goats FAO and Agriculture Organization of the United Nations. Rome 1991.
- 29.-Evans, G. Maxwell WMC. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza, España: Acribia, 1990.
- 30.-Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Rum Res* 2002;44:153-158.
- 31.-Hafez ESE. Estudios del semen. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. 5ª ed. Editado por: Hafez, E.S.E. 491-518. México (DF): Interamericana McGraw-Hill, 1989.
- 32.-Brito FI. Evaluación de dos diluyentes utilizados para la congelación de semen de carnero en pellets. (Tesis de Licenciatura). México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1995.
- 33.-Olds-Clarke P, Baer HM, Gerber WL. Human sperm motion analysis by automatic (Hamilton-Thorn Motility Analyzer) and manual (image-80) digitization systems. *J Androl* 1990;11:52-58.
- 34.-Holt WV, Palomo MJ. Optimization of a continuous real-time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:219-230.
- 35.-Tardif AL, Farrel PB, Trouern-Trend and Foote RH. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J Daily Sci* 1997;80:1606-1612.
- 36.-Rodríguez MH, Larsson B and Pertoft H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:297-308.
- 37.-Mortimer ST and Maxwell WMC. Kinematic definition of ram sperm by hyperactivation. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:25-30.
- 38.-Dott HM and Foster GC. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'Live/dead' stain. *J Reprod Fert* 1972;29:443-445.
- 39.-McGann EL, Yang H and Walterson M. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology* 1988;25:178-185.
- 40.-Azerêdo GA, Esper CR and Resende KT. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. *Small Rum Res* 2001;41:257-263.

- 41.-Kosower NS, Katayose H, Yanagimachi R. Thiol-disulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 1992;13:342-348.
- 42.-Harrison RAP and Vickers ES. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod Fert* 1990;88:343-352.
- 43.-Karabinus DS and Evenson DP. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J Daily Sci* 1991;74:3836-3848.
- 44.-Valcárcel A, de las Heras MA, Pérez L, Moses DF and Baldassarre H. Fluorescent staining as a method of assessing membrane damage and post-thaw survival of ram spermatozoa. *Theriogenology* 1994;41:483-489.
- 45.-Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol Reprod* 1995;53:276-284.
- 46.-Graham JK, Kunze E, Hammerstedt H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. *Biol of Reprod* 1990;43:55-64.
- 47.-Windsor DP and White IG. Assessment of ram sperm mitochondrial function by quantitative determination of sper rhodamine 123 accumulation. *Mol Reprod Dev* 1993;36:354-360.
- 48.-Garner LD, Thomas AC, Joerg WH, Dejarnete JM and Marshall EC. Fluorometric assessment of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* 1997;57:1401-1406.
- 49 - Pérez LJ, Valcárcel A and de la Heras MA, Moses D, Baldassarre H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 1996;46:131-140.
- 50 -Guillan L, Evans G and Maxwell WMC. Capacitation status and fertility of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:481-487.
- 51.-Hammerstedt RH. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and course of action. *Anim Reprod Sci* 1996;42:77-87.
- 52.-Liu DY, Jennings MG, Baker GHW. Correlation between defective motility (asthenospermia) and ATP reactivation of demembrated human spermatozoa. *J Androl* 1987;8:349-353.
- 53.-Melendrez CS, Ruttle JL, Halford DM, Chaudhry PS, Casillas ER. Polyamines in ejaculated ram spermatozoa and their relationship with sperm motility. *J androl* 1992;13:293-296.
- 54.-Salem MH, Mekawy MY, Ahmed NA, Abdel-Aziz, Mohamed AA, El-Oksh HA, Pursel VG. Effect of cyclic AMP on fructose utilization, progressive motility and protein synthesis by ram spermatozoa. *Theriogenology* 1992;37:1061-1074.

- 55.-Krzyszosiak J, Evenson D, Pitt C, Jost L, Moland P and Vishwanath R. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reprod Fert Dev* 2000; 12:251-261.
- 56.-Jones AR and Connor DE. Fructose metabolism by boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 2000;12:355-359.
- 57.-Murdoch RN, Armstrong VL, Clulow J, Jones RC. Relationship between motility and oxygen consumption of sperm from the cauda epididymides of the rat. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:87-94.
- 58.-Vishwanath R, Swan MA, White IG. Effect of Triton X-100 on ultrastructure, reactivation, and motility characteristics of ram spermatozoa. *Gamete Res* 1986;15:361-371.
- 59.-Gibbons R, Collins K, Selwood R. Exogenous energy sources for spermatozoa in cervical mucus of the cow at oestrus. *J Reprod Fert* 1974;40:187-189.
- 60.-Joshi A, Mathur AK, Srivastava RS, Kalra DB. Factors affecting metabolic behaviour of ram spermatozoa during cryopreservation. *Ind J Anim Sci* 1990;60:1336-1337.
- 61.-Holt WV, North RD. Thermotropic phase transitions in the plasma membrane of ram spermatozoa. *J Reprod Fert* 1986;78:447-457.
- 62.-Shin SJ, Lien DH, Patten VH, Ruhnke HL. A new antibiotic combination for frozen bovine semen: I. Control of *Mycoplasma*, *Ureaplasmas*, *Campylobacter fetus* subsp., *venerealis* and *Haemophilus somnus*. *Theriogenology* 1988;29:577-591.
- 63.-Thibier M, Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci* 2000;62:233-251.
- 64.-Graham JK. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 1994;41:1151-1162.
- 65.-Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA and Muñino-Blanco T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 2001;56:425-434.
- 66.-Molinia FC, Evans G, Quintana CPI, Maxwell WMC. Effect of monosaccharides and disaccharides in tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1994;36:113-122.
- 67.-Upreti GC, Jensen K, Munday R, Duganzich DM, Vishwanath R, Smith JF. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Anim Reprod Sci* 1998;51:275-287.

68.-El-Alamy MA, Foote RH. Freezability of spermatozoa from finn and dorset rams in multiple semen extenders. *Anim Reprod Sci* 2001;65:245-254.

69.-Salamon S and Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen I. Processing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 1995;37:185-249.

70.-Aisen EG, Medina VH, Venturino A. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 2002;57:1801-1808.

71.-Bustamante CG, Valencia MJ. Acción del sulfóxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. *Vet Mex* 1981;12:211-216.

72.-Singh MP, Sinha AK, Singh BK. Effect of cryoprotectans on certain seminal attributes and on the fertility of buck spermatozoa. *Theriogenology* 1995;43:1047-1053

73.-Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM and England GCM. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci* 2001;67:101-111.

74.-Payne SR, Oliver JE, Upreti GC. Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1994;31:180-184.

75.-Gil J, Rodríguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell ® and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology* 2003;59:1157-1170.

76.-Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram. *Theriogenology* 2003;59:1241-1255.

77.-Pontbriand D, Howard JG, Schiewe MC, Stuart LD, Wildt DE. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 1989;26:341-354.

78.-Parks JE, Graham JK. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 1992;38:209-222.

79.-Abdelhakeam AA, Graham EF, Vázquez IA. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: fertility trials and the effects of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology* 1991; 28:36-42.

80.-Colas G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fert* 1975;42:277-285.

- 81.-Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* 1984;21:542-551.
- 82.-Deshpande SB, Mehta VM. Effect of dilutors and different glycerol levels on pre-freeze and post-freeze sperm motility and live sperm count in surti buck semen. *Ind J Anim Sci* 1991;61:1093-1095.
- 83.-Das KK, Rajkonwar CK. Effects on the motility of buck semen during freezing with lactose egg yolk glycerol extender. *Int J Anim Sci* 1995;10:127-128.
- 84.-Gustafsson BK. Aspects of fertility with frozen-thawed ram semen. *Cryobiology* 1978;15:358-361.
- 85.-Yoshida M. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:349-355.
- 86.-Vishwanath R, Shannon P. Do sperm cell age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:321-331.
- 87.-Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:659-668.
- 88.-O'flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirement for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999;52:289-301.
- 89.-Mathews KC and Van Holde EK. *Bioquímica*. 2a ed. España: Interamericana McGraw-Hill, 1999.
- 90.-Halliwell B and Gutteridge MCJ. *Free radicals in biology and medicine*. 2ª ed. Calderon Press Oxford, 1989.
- 91.-Windyard PG, Blake DR and Evans CH. *Free radicals and inflammation*. Croatia. Birkäuser Verlag, 2000.
- 92.-Upreti GC, Jensen K, Oliver JE, Duganzich DM, Munday R, Smith JF. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim Reprod Sci* 1997;48:269-278.
- 93.-Maxwell WMC and Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod Fertil Dev* 1996;8:1013-1020.
- 94.-Shannon P, Curson B. Kinetics of the aromatic L-amino acid oxidase from dead bovine spermatozoa and the effect of catalase on fertility of diluted bovine semen stored at 5 C and ambient temperatures. *J Reprod Fert* 1982;64:463-467.
- 95.-Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 2002;57:1105-1122.

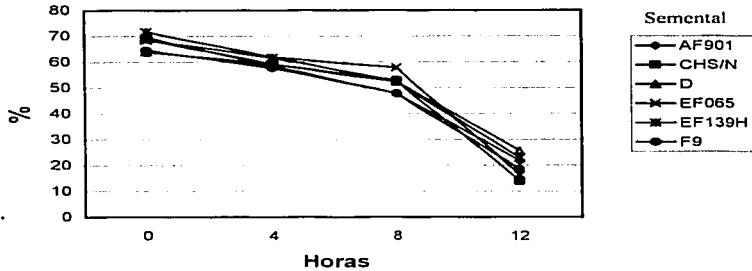
- 96.-Sanchez-Partida LG, Setchell BP, Maxwell WMC. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997;9:689-696.
- 97.-Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Bioquímica de Harper*. 12ª ed. México (DF): Manual Moderno, 1992.
- 98.-Nelson DL, Cox MM. *Lehringer principles of biochemistry*. Third edition. EUA: Worth Publishers, 2000.
- 99.-Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principios de bioquímica*. 3ª ed. Barcelona, España: Omega 2001.
- 100.- Bayard TS, Kayne FJ. Energy metabolism of spermatozoa. VI. Direct intramitochondrial lactate oxidation by rabbit sperm mitochondria. *Biol. Reprod* 1977;16:549-556.
- 101.- Dalvit GC, Miragaya MH, Chaves MG and Beconi MT. Energy requirement of bovine spermatozoa for in vitro capacitation. *Theriogenology* 1995;44:1051-1058.
- 102.- Ochkur IS, Kopeika FE, Suraj FP and Grischenko IV. The influence of cryopreservation on parameters of energetic metabolism and motility of fowl spermatozoa. *Cryobiology* 1994;31:239-244.
- 103.- Pérez LJ, Valcárcel A and de la Heras MA, Moses D, Baldassarre H. Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 1996;46:131-140.
- 104.- Valencia MJ, González HG, González GM, Trejo GA. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.25 y 0.5 ml descongelado a dos diferentes temperaturas. *Vet Méx* 1994;25:127-131.
- 105.- Bag S, Joshi A, Rawat PS, Mittal JP. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Samil Rum Res* 2002;43:23-29.
- 106.-Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP and Boland MP. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci* 2000;62:265-275.
- 107.-Rangel SR. *Manual de Inseminación artificial en ovinos*. Chignahuapa (Puebla) México: Banco de México FIRA, 2001.
- 108.-Guillan L and Maxwell WMC. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J Reprod Fertil Suppl* 1999;54:271-283.

- 109.-Edward AY, Windsor DP, Purvis IW, Sánchez-Partida LG and Maxwell WMC. Distribution of variance associated with measurement of post-thaw function in ram sperm. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:129-134.
- 110.-Holt WV. Basis aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 2000;62:3-22.
- 111.-Holt WV. Alternative strategies for the long-term preservation of spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 1997;7:309-319.
- 112.-Maxwell WMC, Johnson LA. Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology* 1997;48:209-219.
- 113.-Guillan L, Evans G, Maxwell WMC. The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviductal epithelial cells in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2000;12:237-244.
- 114.-Deka BC, Rao AR. Effect of extenders on sperm motility and acrosomal integrity of frozen buck semen. *Ind Vet J* 1985;62:414-417.
- 115.-Thomas CA, Garner DL, Dejarnette JM and Marshall CE. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol Reprod* 1998;58:786-793.
- 116.- Angulo MR. Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen de ovino. (Tesis de Licenciatura). México, DF.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1988.
- 117.-García ME. Modificación al sistema de clasificación climática de Copen 3ª ed. México, (DF): FOCET Larios 1981.
- 118.-SAS. Institute inc. System for linear models. USA: Cary INC. 1992.
- 119.- Martínez TVM. Comparación de dos técnicas para la congelación de semen caprino utilizando yema de huevo. (Tesis de Licenciatura). México, D.F.: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 2001.
- 120.- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA and Bellitti A. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology* 2001;55:1159-1170.
- 121.- Bag S, Joshi A, Mathur AK, Rawat PS, Mittal JP. Effect of thawing temperature on motion characteristics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Ind J Anim Sci* 1999;69:16-18.
- 122.- Windsor DP. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of merion ewes. *Anim Reprod Sci* 1997;47:21-29.

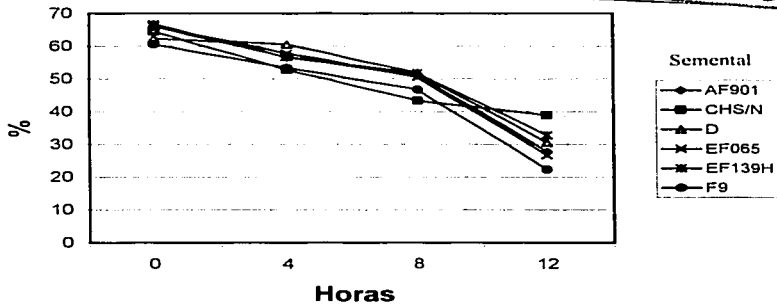
123.- Nevo AC. Polge C. Frederick G. Aerobic and anaerobic metabolism of boar spermatozoa in relation to their motility. J Reprod Fert 1970;22:109-118.

ANEXO

Gráfica 1A
Motilidad promedio del semen de carnero al descongelado, de los diferentes sementales en el grupo A (Diluyente base)



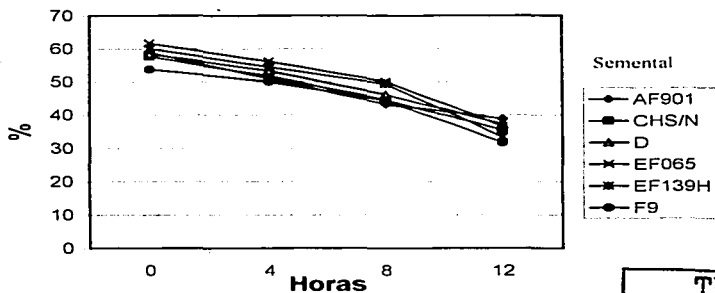
Gráfica 2A
Motilidad promedio del semen de carnero al descongelado, de los diferentes sementales en el grupo B (Diluyente base más 4 µM de rotenona)



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Gráfica 3A

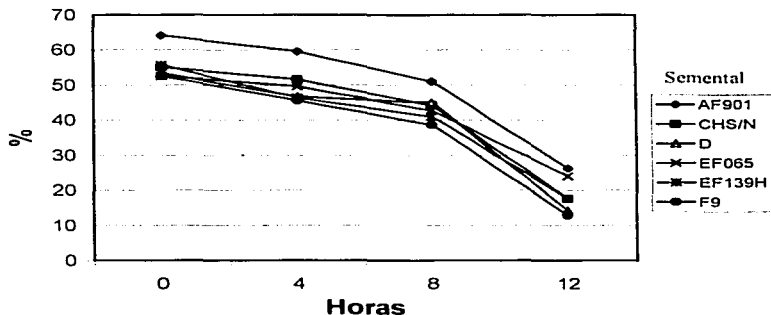
Motilidad promedio del semen de carnero al descongelado, de los diferentes semantales en el grupo C (Diluyente base más 8 μM de rotenona)



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

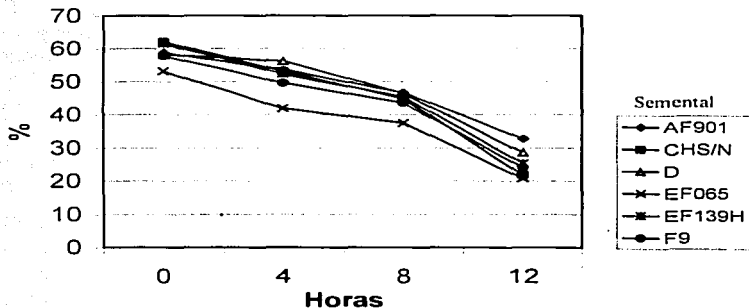
Gráfica 4A

Promedio de espermatozoides vivos en semen de carnero al descongelado, de los diferentes semantales en el grupo A (Diluyente base)



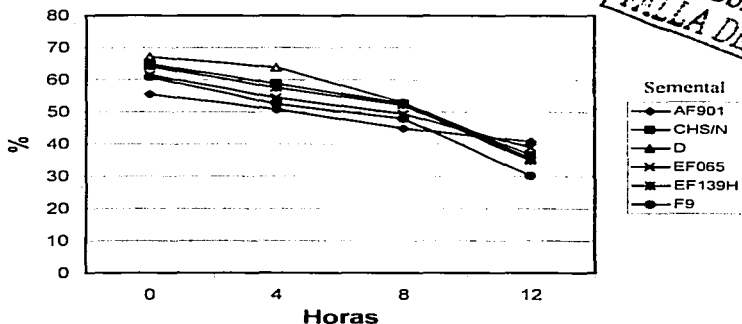
Gráfica 5A

Promedio de espermatozoides vivos en semen de carnero al descongelado, de los diferentes semantales en el grupo B (Diluyente base más 4 μM de rotenona)



Gráfica 6A

Promedio de espermatozoides vivos en semen de carnero, al descongelado de los diferentes semantales en el grupo C (Diluyente base más 8 μM de rotenona)



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS NO SALE DE LA BIBLIOTECA

Cuadro 1A

Motilidad promedio del semen de carnero al descongelado, de los diferentes sementales en los grupos A (Diluyente base), B (Diluyente base más 4 μ M de rotenona) y C (Diluyente base más 8 μ M de rotenona), expresado en porcentajes.

GRUPO A				
Semental	0 Horas	4 Horas	8 Horas	12 Horas
AF901	69.4	58.3	47.	21.6
CHS/N	68.8	58.8	52.	13.8
D	63.8	58.8	52.	25.5
EF065	68.3	61.6	57.	16.1
EF139H	71.6	61.6	52.	22.7
F9	64.4	57.7	47.	18.3

GRUPO B				
Semental	0 Horas	4 Horas	8 Horas	12 Horas
AF901	66.1	56.6	51.	27.7
CHS/N	64.4	52.7	43.	38.8
D	62.2	60.5	51.	30.5
EF065	66.1	57.7	50.	26.6
EF139H	66.6	56.6	51.	32.7
F9	60.5	53.3	46.	22.2

GRUPO C				
Semental	0 Horas	4 Horas	8 Horas	12 Horas
AF901	58.8	51.1	43.	38.8
CHS/N	57.7	51.6	44.	35.5
D	58.3	53.3	46.	37.2
EF065	61.6	56.1	5	36.6
EF139H	60	54.4	49.	33.3
F9	53.8	50	44.	31.6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 2A

Promedio de espermatozoides vivos en semen de carnero al descongelado, de los diferentes sementales en los grupos A (Diluyente base), B (Diluyente base más 4 μM de rotenona) y C (Diluyente base más 8 μM de rotenona), expresado en porcentaje.

GRUPO A				
Semental	0 Horas	4 Horas	8 Horas	12 Horas
AF901	64.1	59.5	51.1	26.2
CHS/N	55	51.5	44.2	17.5
D	53.2	46.6	45	14.2
EF065	52.5	49.5	42.7	24
EF139H	55.6	46.2	41	17.6
F9	52.5	45.5	38.7	12.7

GRUPO B				
Semental	0 Horas	4 Horas	8 Horas	12 Horas
AF901	58.7	53.5	46.6	32.7
CHS/N	62	53	44.8	21.8
D	58.2	56.1	46.3	28.5
EF065	53.1	41.8	37.4	20.8
EF139H	61.5	52.2	45.3	25.3
F9	57.8	49.5	43.5	24.1

GRUPO C				
Semental	0 Horas	4 Horas	8 Horas	12 Horas
AF901	55.4	50.7	44.8	40.7
CHS/N	64.7	58.6	52.6	36.5
D	67.1	63.7	52.8	35.4
EF065	61.4	54.3	49.3	38.8
EF139H	64.1	57.5	52.2	34.8
F9	60.8	52.4	47.8	30.1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN