

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

7.26.59

FACULTAD DE AGRONOMIA

EFFECTOS DE LA CENTRIFUGACION SOBRE LA MOTILIDAD, LA CONCENTRACION
Y EL PORCENTAJE DE ACROSOMAS INTACTOS EN SEMEN OVINO
CONGELADO Y DESCONGELADO

por

Julián AMBIELLE MATOSAS
Alvaro CARDOZO ORTEGA
Luis MARTINEZ PEREIRA

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
INGENIERO AGRONOMO.

MONTEVIDEO
URUGUAY
1998

Tesis aprobada por:

Director:

Dr. Alvaro López

.....
Nombre completo y firma

Dra. Raquel Pérez

.....
Nombre completo y firma

Dr. Daniel Queirolo

.....
Nombre completo y firma

Fecha:

Autores:

Julián Ambielle Matosas

.....
Nombre completo y firma

Alvaro Cardozo Ortega

.....
Nombre completo y firma

Luis Martínez Pereira

.....
Nombre completo y firma

AGRADECIMIENTOS

El grupo agradece a la Ing. Chiesa, a la Dra. Van Lier, al Sr. García y al Sr. Goralczyk por sus aportes a la realización de este trabajo, y a todos los que de una forma u otra colaboraron a la ejecución del mismo.

Agradezco particularmente a mi primo Juan Daniel Santellán por su invaluable ayuda, sin la cual no hubiera culminado mis estudios, y en general a toda mi familia.

Quiero agradecer a Luis Martínez y a Julián Ambielle sin los cuales no podría haber defendido la tesis, hago también extensivo mi agradecimiento a mi novia Xenia Silveira, y a mis padres Osvaldo Cardozo y Laura Ortega.

Quisiera agradecer a mi novia, hermana y madre por todo el apoyo y comprensión brindada, a mis compañeros de tesis, particularmente a Julián Ambielle por el compromiso asumido desde los inicios de este emprendimiento, y a todos aquellos que directa o indirectamente contribuyeron para que esta obra se hiciera realidad.

TABLA DE CONTENIDO

PAGINA DE APROBACION.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	2
A. INTRODUCCION.....	2
B. EL SEMEN Y SUS CARACTERISTICAS.....	3
1. Plasma seminal.....	3
2. Espermatozoides.....	4
a. Estructura.....	4
b. Metabolismo.....	5
c. Factores que afectan la supervivencia.....	5
C. MANEJO DEL SEMEN.....	6
1. Extracción del semen.....	6
a. Recogida del semen por Vagina Artificial.....	7
b. Recogida del semen por estímulo eléctrico.....	8
D. VALORACION DEL SEMEN.....	9
1. Introducción.....	9
2. Tests macroscópicos.....	10
a. Color y olor del semen.....	10
b. Volumen de semen.....	11
c. Consistencia.....	11

3. Tests microscópicos	11
a. Concentración de espermatozoides	11
♦ Método del Recuento Celular Directo	12
♦ Colorímetro	12
♦ Contador electrónico de partículas	12
b. Motilidad de los espermatozoides	13
♦ Onda de movimiento	14
♦ Proporción de espermatozoides móviles	15
♦ Método del Hemocitómetro	15
♦ Fotografía con exposición de tiempo	16
♦ Analizadores computarizados	16
c. Morfología de los espermatozoides	16
4. Tests bioquímicos	17
a. Coeficiente Respiratorio	17
b. Índice de Fructólisis	17
c. Poder deshidrogenante	18
5. Tests biológicos	18
a. Porcentaje de preñez	18
b. Resistencia del espermatozoide	18
E. SIGNIFICADO DE LA CALIDAD DEL SEMEN	19
1. Motilidad	19
2. Morfología celular, Integridad Acrosómica (PAI)	20

F. DILUCION.....	21
G. CONSERVACION.....	23
1. Principios de la conservación del esperma.....	23
a. Temperatura.....	23
b. Fuentes de energía.....	24
c. Presión osmótica y equilibrio electrolítico.....	24
d. Acción amortiguadora y pH.....	25
e. Inhibición del crecimiento de microorganismos.....	25
f. Protección de los espermatozoides contra el frío.....	26
2. Alternativas de conservación del semen.....	27
a. Conservación a temperatura ambiente.....	27
b. Conservación durante poco tiempo o en frío.....	28
c. Conservación mediante congelado.....	30
♦ Crioprotectores.....	32
♦ Proporción de glicerol en el diluyente.....	34
♦ Adición de glicerol.....	35
H. METODOS DE CONGELACION.....	38
1. Descongelado del semen.....	40
I. FACTORES QUE AFECTAN LA FERTILIDAD EN LA I.A.....	43
III. MATERIALES Y METODOS.....	47
A. LOCALIZACION Y ANIMALES.....	47
B. MANEJO DEL SEMEN.....	47
C. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO.....	48

IV.	RESULTADOS	49
V.	DISCUSION	58
VI.	CONCLUSIONES	61
VII.	RESUMEN.....	62
VIII.	BIBLIOGRAFIA.....	63

I. INTRODUCCION

La inseminación artificial es una técnica con destacada importancia en lo que respecta al mejoramiento genético, que ha logrado su máximo desarrollo en los bovinos, y que sin dudas puede alcanzar buenos resultados en ovinos, siempre y cuando se utilicen sementales de probado mérito genético, semen congelado de buena calidad y una técnica sencilla, económica, rápida y efectiva de inseminación (citado por López, 1987).

No obstante y a pesar de que hace ya muchos años que se practica la I.A. en ganado ovino (Durán del Campo, 1980), la difusión de esta técnica se ha visto limitada en su desarrollo como consecuencia de los bajos niveles de fertilidad logrados con semen congelado, lo que restringe la I.A. en esta especie a la utilización de semen líquido, lo que limita el uso de material genético superior, por la imposibilidad de mantenerlo por más de 24 horas (Colas y Courot, 1977).

Las causas de estos pobres resultados se pueden resumir en tres puntos: 1) falta de una técnica de congelación y descongelación, y de diluyentes adecuados para el semen ovino (Visser, 1974, citado por Pérez, 1987); 2) la dificultad que presenta el cérvix de la oveja para el transporte espermático (Azzarini, 1991; Fernández Abella, 1987; Lightfoot y Salamon, 1970) y 3) a la dificultad de efectuar la IA intrauterina (Fukui y Roberts, citado por Pérez, 1987).

Según Durán del Campo, (1987) es evidente que la fertilidad del semen de carnero es 20% a 25% inferior a la de semen congelado de toro, mientras que en los bovinos el semen puede introducirse en el cérvix en profundidad o incluso en el útero, en los ovinos no puede depositarse más allá del cérvix.

Por su parte Evans y Maxwell (1990) expresaron que aparentemente la fertilidad relativamente baja del semen congelado, después de la inseminación cervical, está relacionada con la reducida viabilidad de los espermatozoides sometidos a procesos de congelado y descongelado. Además existen muchas dificultades para obtener una adecuada población de espermatozoides viables a nivel de cérvix, y su transporte a través de este y del útero para llegar al oviducto. En último caso son pocos los espermatozoides viables y/o sin dañar que son capaces de llegar al lugar de la fertilización, por lo que la fertilidad se ve muy disminuida.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la velocidad de centrifugación sobre la concentración, la motilidad y la morfología espermática del semen ovino congelado en pajuelas. Con el presente trabajo se pretende aumentar el número de espermatozoides por unidad de volumen y por lo tanto por pajuela cuando se utilice la presente técnica de congelación de semen de carnero.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

A. INTRODUCCION.

La multiplicación de animales de calidad superior en una población es uno de los elementos esenciales del mejoramiento genético. La velocidad del progreso genético depende, entre otros factores, de la tasa reproductiva de los animales, que puede operar mediante la modificación de la intensidad de selección y de los intervalos generacionales. Azzarini (1992)

En los últimos veinte años se han conseguido progresos importantes en las técnicas de control de la reproducción en los ovinos, las que aplicadas a los programas de mejoramiento genético pueden influir notablemente en la rapidez del cambio genético. Azzarini (1992).

El mismo autor destaca como las más importantes la Inseminación artificial (I.A.), la superovulación, la transferencia de embriones y la crioconservación de gametos.

La I.A. es el método de reproducción en el que los gametos masculinos son transportados al tracto genital femenino, a través de medios mecánicos que sustituyen a los habituales órganos especializados. (Durán del Campo, 1995).

Además de la importancia que esta técnica tiene desde el punto de vista del progreso genético, según este autor la misma cuenta con la fundamental ventaja de permitir el incremento de la cantidad de hembras fecundadas con un solo reproductor.

Por su parte Evans y Maxwell (1990) destacan, además de las ya mencionadas ventajas, las de: facilitar el transporte del material genético, permitir una prolongada conservación del semen, aumentar la eficiencia reproductiva, reducción o eliminación de sementales, prevención y control de enfermedades, utilización de machos incapacitados, mantenimiento de registros seguros.

Fernández Abella (1987), concluye que la I.A., además de permitir la introducción de una característica altamente heredable o un carácter transmitido por uno solo gen o pequeño grupo de genes, permite aumentar el número de ovejas posible de fecundar por eyaculado y por ende por camero, mejorar sanitariamente el semen utilizado, evitándose enfermedades infectocontagiosas y permite sustituir la alimentación destinada a machos.

No obstante las destacables ventajas de esta técnica, existen algunos inconvenientes entre los que podemos mencionar: riesgo de consanguinidad, reproductividad insegura, propagación de enfermedades, fertilidad reducida, costos elevados (Evans y Maxwell, 1990).

En la actualidad, la I.A. se limita a situaciones puntuales a nivel comercial y más frecuentemente a los planteles, cuyo objeto es utilizar de manera amplia un solo carnero o facilitar el método de servicio individual cuando se desea emplear varios carneros (Azzarini, 1992).

Este mismo autor sostiene que la falta de una técnica eficaz en el uso del semen congelado ha sido una de las principales limitantes para el aprovechamiento pleno de la I.A. como ayuda para el mejoramiento genético. La inseminación cervical tradicional es aplicable cuando se utiliza semen fresco o refrigerado, pero no cuando el semen ha sido congelado. La principal dificultad radica en poder establecer un número suficiente de espermatozoides viables en el cuello uterino, así como en las dificultades del transporte a través de este (Azzarini, 1992).

B. EL SEMEN Y SUS CARACTERISTICAS.

El semen es el líquido generativo del macho que contiene los gametos masculinos o espermatozoides. El mismo está constituido por dos constituyentes principales: el plasma seminal y los espermatozoides propiamente dichos (Evans y Maxwell, 1990).

1. Plasma seminal.

El mismo constituye una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, los epidídimos, conductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias. El plasma seminal desempeña básicamente tres funciones (Evans y Maxwell, 1990):

- i) Actúa como vehículo para los espermatozoides.
- ii) Actúa como activador de los espermatozoides, previamente no móviles.

iii) Proporciona un medio rico en nutrientes tamponado que colabora en mantener la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse éstos en el aparato genital de la hembra.

El plasma seminal normalmente es un líquido neutro e isotónico siendo su principal componente el agua (75%).

La presión osmótica del semen se mantiene fundamentalmente en base a los componentes orgánicos, los que predominan sobre los inorgánicos, aunque existen cantidades considerables de sodio, potasio y cloro. Las principales moléculas orgánicas presentes en el semen ovino son fructosa, sorbitol, inositol, ácido cítrico, glicerilfosforilcolina, fosfolípidos, prostaglandinas y proteínas. La fructosa, derivada de la glucosa de la sangre, es el azúcar más fácilmente metabolizable y constituye la principal fuente de energía para los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

Normalmente el pH del plasma seminal se mantiene muy cercano a 7, participando para ello un complejo sistema amortiguador que tiene por función evitar los cambios bruscos de pH protegiendo de esta manera las células espermáticas, que de otra forma verían enormemente afectada su supervivencia. (Evans y Maxwell, 1990).

Las prostaglandinas, por su parte se encuentran en una alta concentración en el semen de carnero y de macho cabrío. Se ha sugerido que las mismas podrían colaborar en el transporte de los espermatozoides a través del aparato genital femenino debido a que las mismas son capaces de estimular poderosas contracciones de la musculatura uterina, no obstante la explicación de estas altas concentraciones no está del todo clara (Evans y Maxwell, 1990).

2. Espermatozoides.

a. Estructura.

Los espermatozoides son células altamente especializadas formadas por dos partes principales: la cabeza y la cola.

La cabeza, rodeada por una membrana celular doble, es plana y ovoide y está ocupada en su casi totalidad por el núcleo. Este a su vez está constituido básicamente por los cromosomas, responsables de la información genética paterna, está cubierto por una doble membrana porosa. La parte anterior de la cabeza está envuelta por una caperuza especial denominada acrosoma, portadora de las enzimas necesarias para el proceso de fertilización (Evans y Maxwell, 1990)

La cola por su parte, semejante a un flagelo, es el órgano locomotor de los espermatozoides, provista de un haz de fibras axiales desplazado longitudinalmente. El movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los mismos en los medios líquidos. La misma está unida a la cabeza mediante un cuello corto conocido como región de implantación. En épocas calurosas o situaciones estresantes el cuello puede lesionarse separándose de esta manera la cabeza de la cola. Esta última a su vez puede diferenciarse en tres regiones fundamentales: pieza proximal, pieza principal y pieza terminal.

La pieza proximal es la región más gruesa de la cola provista de una lámina mitocondrial, siendo las mitocondrias las responsables de suministrar la energía necesaria para la locomoción. La pieza intermedia, constituye la parte más larga de la cola y contiene la mayor parte de la maquinaria propulsora estando revestida por una vaina fibrosa. La pieza terminal por su parte es relativamente corta y no tiene vaina.

b. Metabolismo.

La energía necesaria para mantener la motilidad y viabilidad de los espermatozoides procede de los azúcares, especialmente de la fructuosa, presentes en el plasma seminal. El metabolismo de estos azúcares deja como resultado una concentración creciente de dióxido de carbono, agua y en menor importancia ácido láctico (Evans y Maxwell, 1990).

El anhídrido carbónico en altas concentraciones tiene la capacidad de inhibir la motilidad de los espermatozoides utilizándose este principio para la conservación de semen a corto plazo. No obstante, si bien es posible anular este efecto mediante dilución con diluyente fresco, la acumulación de ácido láctico metabólico en el semen puede descender el pH y reducir irreversiblemente la viabilidad de los espermatozoides. Como consecuencia de ello se recomienda la utilización del semen lo más fresco que sea posible (Evans y Maxwell, 1990).

c. Factores que afectan la supervivencia.

El semen, sea de carnero o de macho cabrío, es muy sensible a los cambios ambientales y otras circunstancias por lo que es imprescindible tomar medidas precautorias para conservar la calidad del semen en buenas condiciones. Entre los factores que pueden afectar la supervivencia del semen se pueden destacar:

i) Temperatura: la temperatura del semen en el momento de la eyaculación es próxima a la del cuerpo (37°C). El metabolismo de los espermatozoides está íntimamente asociado a los cambios de temperatura. La exposición del semen a temperaturas superiores a la indicada determina un aumento del ritmo metabólico lo que a su vez condiciona un agotamiento de las reservas de energía y por consiguiente un descenso de la vida media de los espermatozoides. Por otra parte la disminución de la temperatura reduce el metabolismo y en el caso de que dicho descenso se produzca bruscamente, particularmente por debajo de 10 °C, la viabilidad de los espermatozoides se verá drásticamente afectada. Este fenómeno se conoce como shock de frío. No obstante el riesgo del enfriamiento súbito, el enfriamiento lento del semen a 2-5°C no es fatal, sino que por el contrario la reducción del metabolismo asociado a las bajas temperaturas contribuiría a prolongar la viabilidad de los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

ii) Luz: La luz solar directa es muy perjudicial para el semen. Una exposición corta a la luz solar puede reducir la viabilidad de los espermatozoides y si esa exposición se prolonga por espacio de 30-40 minutos, la misma puede ser determinante de muerte celular. Consecuentemente, es aconsejable evitar la exposición directa del semen a la luz solar por lo que las operaciones de recogida y manejo deben hacerse en interiores, protegidas de los rayos solares directos.

iii) Contacto con metal: El contacto con metal, de cualquier tipo es peligroso para los espermatozoides, por esta razón, sólo se debe utilizar material de vidrio o equipos de materiales sintéticos inertes cuando se trate de recoger, diluir, conservar e incluso practicar la inseminación.

iv) Contacto con agua: El agua reduce la presión osmótica del plasma seminal lo que puede matar a los espermatozoides por deshidratación. Por tanto, el agua se comporta como un peligroso agente espermicida, por lo que nunca deberá ponerse en contacto directo con el semen.

v) Impurezas y bacterias: Los contaminantes del semen, cualquiera fuera su tipo (bacterias, polvo, pelos, orina, etc.) reducirán la viabilidad de los espermatozoides.

vi) Desinfectantes: Los desinfectantes y antisépticos son muy peligrosos para los espermatozoides, por lo que se evitará su uso. Para esterilizar el material se puede utilizar alcohol al 70% en agua, si bien deberá secarse cuidadosamente previo a su utilización. El material de vidrio puede esterilizarse mediante calor seco.

vii) Exposición al aire: El oxígeno del aire incrementa la actividad metabólica de los espermatozoides lo que conduce a una acumulación creciente de ácido láctico. Este ácido puede reducir el pH del semen por debajo del óptimo ($\text{pH}=7$) con la que la viabilidad de los espermatozoides se reducirá notablemente, por consiguiente el semen, una vez recogido, deberá usarse de inmediato, ya sea para inseminación o para conservación.

viii) Además de los puntos resaltados, existen otros de fundamental importancia en lo que respecta a la supervivencia y viabilidad del semen como ser: pH y sustancias tampones del diluyente a utilizarse y presión osmótica del mismo.

C. MANEJO DEL SEMEN.

1. Extracción del semen.

En la generalidad los métodos para la colecta de semen se pueden dividir en dos grandes grupos: métodos indirectos y métodos directos (Fernández Abella, 1987).

En la actualidad los métodos de mayor difusión y utilización son los métodos directos, vagina artificial y electroeyaculador, habiendo quedando en desuso los métodos indirectos debido a que no garantizaban una buena asepsia y cantidades adecuadas de semen (Salisbury, 1978; Fernández Abella, 1987; López, 1987; Azzarini, 1991).

a. Recogida del semen por Vagina Artificial.

Es el método de mayor preferencia dada su rapidez y limpieza, proporcionando un semen recolectado de mejor calidad, no siendo estresante para el semental permitiendo repetidas colecciones en el día (Evans y Maxwell, 1990).

La vagina artificial es una imitación de la vagina de la oveja la que proporciona el estímulo térmico (temperatura) y mecánico (presión) necesarios para producir la erección y posterior eyaculación del macho previa desviación del pene de manera que penetre en la misma (López, 1987).

La misma, similar a la utilizada en toros, consiste en una caperuza externa de 20 x 5,5 cm fabricada en goma resistente, plástico u otro material sintético que tenga propiedades aislantes, y un conducto interno fabricado en goma u otro material sintético apropiado, el que deberá ser ligeramente elástico. El tamaño de la vagina está en relación con la longitud del pene. El conducto interno suele tener 2-3 cm más que la caperuza externa con el fin de poderse plegar sobre esta, determinándose entonces un espacio libre entre ambos conductos. El conducto externo o caperuza normalmente tiene una válvula ubicada lateralmente la que permite el ingreso de agua y aire al espacio libre de manera de lograr las condiciones necesarias que aseguren la eyaculación del macho sometido a este tratamiento (López y Valencia, 1982).

Uno de los extremos del conducto interno se debe lubricar ligeramente con vaselina neutra o aceites minerales que no dañen los espermatozoides en una extensión que no supere los 3 cm. En el otro extremo se debe colocar un tubo de vidrio estéril y calibrado para recoger el semen.

La temperatura de la vagina artificial, inmediatamente antes de recoger el semen, deberá ser de 42-45 °C, lo que se puede controlar mediante la inserción de un termómetro limpio y la presión adecuada es de 40 - 60 mm de mercurio lo que se consigue mediante insuflación de aire a través de la válvula mencionada (Durán del Campo, 1980; Ott y Memon, 1980). La presión óptima para algunos machos sólo puede conocerse a través de la experiencia (Evans y Maxwell, 1990).

La vagina deberá estar limpia, seca y estéril, evitando utilizar la misma vagina para distintas recogidas de semen. Después de cada uso se debe lavar, enjuagar con agua destilada y secar profundamente. Se evitará en todo momento, la presencia de agua en el tubo interno debido a las características spermicidas de la misma.

El semen se debe recoger en un ambiente libre de polvo y se debe limpiar cuidadosamente el prepucio del macho así como la parte trasera de la hembra señuelo a fin de evitar cualquier contaminación del semen. Asimismo y con la finalidad de evitar el shock de frío los vidrios de colecta se deben calentar a una temperatura de 35-37 °C (Durán del Campo, 1980).

La frecuencia con la que se puede colectar el semen depende de la edad, de la condición y del temperamento. Los carneros pueden montar y eyacular entre 10 y 15 veces por día.

El volumen, la concentración y consecuentemente el número de espermatozoides por eyaculado disminuyen con las sucesivas colectas, sin embargo un régimen de 3-5 recogidas diarias, durante periodos de 4-5 días, separados durante periodos de 2-3 días de descanso no reducirá sensiblemente la cantidad y calidad del semen (Evans y Maxwell, 1990).

b. Recogida del semen por estímulo eléctrico.

Dicha metodología se basa en la estimulación eléctrica de los centros lumbares de la erección y eyaculación para obtener el semen, siendo éste diferente al recogido mediante vagina artificial (Evans y Maxwell, 1990).

Existen diferentes tipos de estimuladores eléctricos siendo el más corriente el que se conoce con el nombre de electroeyaculador el cual consiste en un electrodo bipolar de aplicación rectal (15-20 cm). Dicho estimulador es accionado por pequeñas baterías que determinan una salida de 6-12 voltios (120-200 miliamperios) debiéndose aplicar sucesivos estímulos alternando con periodos de descanso. (Maxwell y Evans, 1990).

No obstante lo corriente de esta técnica, existen opiniones diferenciales según los distintos autores en lo que respecta a la duración de los estímulos y periodos descanso.

Fernández Abella (1987) determinó estímulos de 3-4 segundos de duración y periodos de descanso de igual duración siendo necesarios dos a tres choques eléctricos para que se produzca la eyaculación, sugiriendo no aplicar más de 5-6 choques por carnero; Evans y Maxwell (1990) por su parte manejan aplicaciones cortas de 3-8 segundos alternando con descansos de 15-20 segundos.

Dicha técnica tiene la primordial ventaja de que posibilita la recolección de semen sin la necesidad de un acostumbramiento previo del carnero, tal como sucede con el caso de la vagina artificial. Igualmente presenta la utilidad de permitir la recolección de semen de aquellos carneros impedidos de realizar monta normal por defectos anatómicos no hereditarios, así como también permite la evaluación de fertilidad de sementales a campo y confirmar resultados positivos de las vasectomías realizadas previo a la utilización de los machos marcadores o retarjos (López, 1987).

Asimismo la electroeyaculación tiene la ventaja de que casi la totalidad de los carneros experimentan respuesta favorable a este tipo de tratamiento (López, 1987).

Como ya fuera mencionado, existen diferencias entre las características del semen recolectado mediante electroeyaculación y el recolectado mediante vagina artificial.

El semen obtenido por esta técnica presente mayor volumen debido a una mayor cantidad de líquido seminal proveniente de las glándulas anexas. La concentración de espermatozoides es menor lo que determina una menor resistencia al choque de frío y al congelamiento (Fernández Abella, 1987; López, 1987).

Por su parte Durán del Campo (1980) detectó un pH más elevado y una mayor concentración de fructosa en semen obtenido mediante estímulo eléctrico y Marley, Morrison y White (1977) encontraron una menor concentración de glicerol - fosforicolina bajo el mismo tratamiento.

Si bien la electroeyacuación cuenta con algunas ventajas como las que ya mencionamos, este método tiene el inconveniente de que produce malestar en el macho, no permite realizar extracciones con mucha frecuencia y tiene riesgo de contaminación del semen con orina. Estas causas son conducentes al hecho de que sea preferible el método de la vagina artificial a la estimulación eléctrica, tanto en ovinos como en otras especies (Ott y Memon, 1980).

D. VALORACION DEL SEMEN.

1. Introducción.

Es de suma importancia, tanto desde el punto de vista biológico como también económico, que únicamente se utilice semen con grandes posibilidades de fertilizar. En este sentido es imprescindible organizar métodos adecuados que permitan examinar cada uno de los eyaculados previo a su utilización, desechándose todas aquellas muestras que no reúnan las condiciones mínimas necesarias. (Evans y Maxwell, 1990).

El único test con mayor grado de eficacia capaz de predecir la fertilidad de un reproductor, es sin duda, el porcentaje de preñez resultante de sus servicios naturales o artificiales llevados a cabo en hembras sanas y en condiciones normales. No obstante, una metodología disponible, aunque de menor exactitud, es el denominado método de valoración del semen, que más allá de las excepciones, se constituye en una técnica sumamente rápida y útil permitiendo asimismo lograr una idea de la fertilidad del semen previo a su comercialización (Durán del Campo, 1980).

En respaldo de esta técnica Azzarini y Ponzoni (1979), expresaron que el examen de semen es una medida indirecta de la fertilidad. Estos autores obtuvieron una correlación múltiple de 0,49 entre la fecundidad y las siguientes características del semen: movilidad, % de espermatozoides vivos normales, % de espermatozoides anormales, % de cuellos anormales y % de piezas medias anormales.

La valoración del semen comprende los siguientes exámenes (Durán del Campo, 1980).

TESTS MACROSCOPICOS

Color y Olor del semen.
Volumen.
Consistencia.

TESTS MICROSCOPICOS

Motilidad
Concentración.
Morfología.

TESTS BIOQUIMICOS

Coeficiente Respiratorio.
Índice de Fructólisis.
Poder deshidrogenante y acidez.

TESTS BIOLOGICOS

Porcentaje de preñez
Resistencia del espermatozoide

Indudablemente el manejo de esta técnica requiere de cierta habilidad siendo importantes el entrenamiento y experiencia previa en lo que respecta a tales observaciones, requiriéndose instrumental específico el que debe utilizarse con total información y destreza.

En definitiva es esencial el conocimiento de todos los detalles asociados a dicha metodología. Se necesita estar familiarizado con los instrumentos y conocer sus aplicaciones para descubrir inmediatamente los posibles errores. Es fundamental no descuidar en ningún momento la limpieza del instrumental así como del laboratorio.

2. Tests macroscópicos.

Inmediatamente después de la recogida debe hacerse un examen macroscópico del semen eyaculado en el tubo de colección. El mismo comprende la observación del color y opacidad del semen así como la cuidadosa comprobación de la ausencia de sustancias extrañas. Asimismo debe registrarse el volumen, que constituye un dato necesario para lograr una dilución adecuada.

a. Color y olor del semen.

El semen normal de carnero es inodoro, salvo en caso de procesos infecciosos. A su vez la presencia de orina será determinante de un olor característico, así como supondrá una coloración menos intensa.

En lo que a coloración respecta, el mismo es de color blanco lechoso o crema pálido, lo que puede variar de un eyaculado a otro, aún hablando de un mismo macho. Por su parte las coloraciones rosáceas son indicadoras de presencia de sangre y coloraciones grises o pardas son índices de contaminación o infección del aparato reproductor.

b. Volumen de semen.

El mismo se puede medir directamente en el tubo de recogida, si está calibrado, o con más seguridad utilizando una pipeta calibrada. Cuando la colección se realiza mediante vagina artificial el volumen promedio gira alrededor de 1,0 ml dependiendo de la edad y condición del animal, frecuencia de recolección y destreza del operario.

c. Consistencia.

La misma depende de la relación de contenido de sus dos constituyentes, espermatozoides y plasma seminal. El examen de consistencia es un método rápido y simple que estima la concentración del semen de acuerdo al siguiente cuadro:

VALOR	CONSISTENCIA	No. DE ESPERMATOZOIDES(*)	
		MEDIA	VARIACION
0	ACUOSA	INSIGNIFICANTE	
1	NEBULOSA	0,7	0,3-1,0
2	LECHOSA	2,0	1,0-2,5
3	CREMOSA TENUE	3,0	2,5-3,5
4	CREMOSA	4,0	3,5-4,5
5	CREMOSA ESPESA	5,0	4,5-6,0

(*) Expresado en miles de millones. Nota: El semen lechoso, nebuloso o acuoso no debe utilizarse para Inseminación Artificial (Evans y Maxwell, 1990).

3. Tests microscópicos.

a. Concentración de espermatozoides.

Como es sabido, la relación de dilución está estrechamente vinculada al número de espermatozoides por unidad de volumen, de ahí la importancia de determinar dicho

parámetro con la máxima exactitud posible. Normalmente el semen de carnero de buena calidad contiene a razón de 3,5 - 6,0 mil millones de espermatozoides por mililitro.

♦ Método del Recuento Celular Directo.

Consiste en contar directamente el número de espermatozoides mediante lo que se conoce como hemocitómetro o contador de células sanguíneas (hematíes). El mismo está constituido por una cámara de contaje, un cubre objetos y dos pipetas de mezcla provistas de un tubo flexible y una boquilla. La cámara de contaje es un porta objetos de vidrio grueso, provisto de dos retículas de contaje. El diseño de la retícula varía según el tipo de hemocitómetro, pero normalmente contiene grupos de dieciséis cuadrados pequeños divididos por líneas dobles o triples en cuadrados más grandes (Evans y Maxwell, 1990).

El semen es diluido generalmente en una proporción 1:200 utilizándose un diluyente tal que permita inmovilizar a los espermatozoides para el contaje y dispersarlos uniformemente a fin de evitar la aglutinación de los mismos (Salisbury, 1978; Durán del Campo, 1980). Entre los posibles diluyentes podemos destacar solución de Cloruro sódico al 4% (Salisbury, 1978), solución de Clorazeno al 4% o Solución de Floxina al 10% (Durán del Campo, 1980).

La dilución se realiza en las pipetas mezcladoras mediante agitación vigorosa de forma tal de lograr una distribución uniforme de las células espermáticas. Luego de la dilución la mezcla se introduce en la cámara de recuento, de volumen conocido, se dejan sedimentar los espermatozoides y posteriormente se procede al conteo.

♦ Colorímetro.

Este constituye un método indirecto, porque el aparato debe calibrarse mediante comparación de resultados con muestras de concentración conocida. Por su exactitud y rapidez, la técnica del colorímetro presta una notable colaboración en centros de inseminación donde deben obtenerse y procesarse al mismo tiempo las concentraciones de muchas muestras de semen, no obstante su elevado costo determina que su utilización no se justifique en trabajos de pequeña entidad (Durán del Campo, 1980).

El método se basa en la cantidad de luz que deja pasar la muestra líquida, la cantidad de luz transmitida a través de la muestra varía inversamente con el número de espermatozoides en la misma.

♦ Contador electrónico de partículas.

Para utilizar esta metodología es necesario diluir el semen con solución salina normal a una proporción 1:6000. La suspensión se hace pasar después por aspiración a través de una abertura circular que mantiene un voltaje. Cuando las células espermáticas pasan por la abertura, se produce un súbito cambio de la resistencia eléctrica. Se amplifica el pulso del voltaje resultante y puede contarse electrónicamente. Este método es muy exacto pero su alto costo limita su utilización rutinaria (Glover y Phipps, 1962; Foote y Bredderman, 1969; citados por Salisbury, 1978).

b. Motilidad de los espermatozoides.

Un hecho característico de los espermatozoides, que a la vez es prerrequisito para la fertilización, es su motilidad, por lo que la determinación de ésta nos puede suministrar una medida indirecta de la calidad del semen (Evans y Maxwell, 1990).

Por movilidad se entiende el desplazamiento del espermatozoide el que puede caracterizarse en los siguientes tipos (Fernández Abella, 1987):

- i) Progresivo o rectilíneo, el espermatozoide se proyecta hacia delante.
- ii) Zigzagueante o de retroceso, el espermatozoide muestra un recorrido vacilante con frecuentes curvas.
- iii) Oscilatorio, el espermatozoide gira sin avanzar con movimientos reducidos hacia ambos lados.
- iv) Vibratorio, el espermatozoide muestra movimientos convulsivos sin progreso ni cambio de posición.

Los métodos comunes de determinación de la motilidad de los espermatozoides son principalmente visuales y los resultados se expresan por lo general en términos comparativos en lugar de absolutos. No existen medios fácilmente utilizables para caracterizar la distribución de la motilidad de las células espermáticas aisladas en una muestra de semen, por lo que la caracterización de la motilidad se realiza sobre la base de una muestra total o como la media de la población.

Las observaciones de motilidad pueden verse influidas por la concentración de células espermáticas y por otros numerosos factores entre los que podemos destacar: método de recogida del semen, factores ambientales, manejo del semen después de recogido y la valoración y variaciones del propio semental, por lo que debe ponerse especial atención para detectar las mencionadas influencias y corregirlas. Las mismas deben realizarse a la temperatura del organismo, en razón de que la motilidad varía inversamente con la temperatura (Salisbury et al, 1978).

Existen dos métodos para cuantificar este aspecto, cuando el semen se utiliza fresco la valoración por onda de movimiento es el método más práctico, sin embargo

cuando el mismo ha sido extensivamente diluido o congelado y descongelado se debe utilizar la metodología basada en la valoración mediante proporción de espermatozoides progresivamente móviles (Evans y Maxwell, 1990).

♦ Onda de movimiento.

Dicha metodología se base en la valoración de la onda de movimiento de los espermatozoides, la que es característica de cada tipo de semen y especie. La misma consiste en colocar una gota de semen sobre un portaobjeto limpio, seco y templado (37 °C) y observar la respectiva onda con pocos aumentos (Normalmente 40x - 100x) valorándose en proporción al vigor o potencia de la misma. Dicha estimación, si bien es subjetiva, la misma puede resultar sumamente segura una vez que el observador ha adquirido la suficiente práctica.

La valoración se realiza sobre la base del siguiente cuadro (Evans y Maxwell, 1990):

VALOR	CLASE	DESCRIPCION
5	Muy buena	Densa, ondas de movimiento muy rápidas No se pueden observar las células individuales. El 90% o más de los espermatozoides son activos.
4	Buena	Movimiento vigoroso, pero las ondas y los remolinos no son rápidos como los de valor 5. Alrededor de 70-85% de las células activas.
3	Regular	Sólo aparecen ondas de movimiento lento. Se pueden ver espermatozoides aislados. El 45-65% de las células son activas.
2	Pobre	No aparecen ondas aunque se observan movimientos de espermatozoides. Sólo viven el 20-40% de las células espermáticas y su movilidad es pobre.
1	Muy pobre	Muy pocos espermatozoides (alrededor del 10%) presentan signos de vida, pero con movimientos débiles.

0	Muertos	Ningún espermatozoide presenta movimiento.
---	---------	--

Las muestras de buena motilidad (4 o 5 puntos) son las que se pueden utilizar para I.A., las muestras con valoración 3 o menos se aconseja desecharlas.

♦ Proporción de espermatozoides móviles.

Esta metodología se utiliza fundamentalmente para muestras de semen que se han diluido y conservado y que por ello pueden tener movilidad reducida (Evans y Maxwell, 1990).

La técnica más sencilla y seguramente la más difundida, consiste en la observación, mediante microscopio de gran aumento (400x), de muestras de semen depositadas sobre porta limpio, seco y templado (37°C), tratando el operario de visualizar varios campos y valorar entonces la proporción de espermatozoides que son progresivamente móviles. Es necesario desarrollar un sistema de calentamiento que mantenga la temperatura indicada en forma constante (Evans, Maxwell 1990).

Este método según citan Salisbury et al. (1978) fue desarrollado en la Universidad de Illinois donde se determinó que la exactitud del mismo dependía del grado de dilución, del control de la temperatura, y de la habilidad del técnico. Asimismo esta técnica podía incrementar sus resultados, en lo que respecta a la precisión de las determinaciones mediante la utilización de microscopio de contraste, sugiriéndose el empleo de colorantes y sustancias fluorescentes, así como luz ultravioleta para el caso de observaciones de semen diluido sobre la base de yema de huevo o leche, lo que mejora acusadamente las determinaciones según estudios realizados por Van Demark (1959), citado por Salisbury (1978).

Además del desarrollado, existen otros métodos que permiten lograr determinaciones más precisas entre las que podemos destacar:

♦ Método del Hemocitómetro.

Brady y Gildow (citado por Salisbury, 1978) fueron los primeros en describir un método enteramente objetivo, basado en el empleo del hemocitómetro, el cual consiste en diluir el semen por una parte con suero salino en una proporción 1:100 y por otra con alcohol en la misma proporción para matar las células espermáticas. Las soluciones se colocaban por separado en ambas cámaras del hemocitómetro, en las dos se contaba el número de espermatozoides inmóviles y se calculaba por diferencia el número de espermatozoides con movimiento.

Según los estudios realizados por Bane (Citado por Salisbury, 1978) existe una correlación de 0,907 entre las determinaciones de motilidad mediante utilización del hemocitómetro y las hechas observando semen no diluido bajo cubreobjetos. No obstante, lo efectivo de esta técnica no se traduce en el plano práctico lo que ha desestimado su utilización, empleándose fundamentalmente y con resultados favorables para el adiestramiento de técnicos.

Además permite monitorear los resultados obtenidos mediante la metodología anteriormente descrita, por lo que conviene comprobar los mismos ocasionalmente con las determinaciones logradas mediante hemocitómetro (Salisbury, et al., 1978).

♦ Fotografía con exposición de tiempo

La fotografía temporizada, realizada a través del microscopio a campo oscuro, mediante exposiciones de dos segundos cada una y consecuente proyección de las imágenes y comparación de las mismas permite realizar determinaciones exactas en lo que se refiere al número de espermatozoides móviles y características del movimiento para el caso de muestras sometidas a congelado y descongelado (Salisbury, et al., 1978).

♦ Analizadores computarizados

Estos equipos permiten evaluar diferentes variables de la motilidad (trayectoria, velocidad, etc.) de gran cantidad de espermatozoides en tiempo muy reducido y en forma objetiva. La mayor limitante de los mismos es su costo pero también debe considerarse que su condición de "método objetivo" también tiene la limitación de la pericia del técnico que realiza las manipulaciones (Rodríguez-Martínez et al. 1997).

No obstante lo exacto de esta técnica, este método no es corrientemente utilizado debido al alto costo del equipo requerido, brindando la primera técnica considerada resultados satisfactorios en lo que se refiere a programas de I. A. (Evans y Maxwell, 1990).

c. Morfología de los espermatozoides

Fundamentalmente el examen morfológico del semen constituye una prueba de calidad, cada eyaculado contiene una serie de espermatozoides anormales, pero si la proporción de éstos es muy alta entonces el semen deberá desecharse (Evans y Maxwell, 1990).

Para el examen rutinario de la morfología se puede utilizar la tinción eosina - nigrosina, colorante que tiene la siguiente composición: Eosina (soluble en agua) 1,67 g - Nigrosina (soluble en agua) 10,00 g - Citrato sódico 2,90 g - Agua destilada (c.s.p.) 100 ml.

Los componentes del colorante se disuelven en un recipiente adecuado y se colocan en baño de agua caliente, previo a su utilización se debe filtrar.

Los pasos a seguir para valorar la morfología de las células espermáticas son los siguientes (Evans y Maxwell, 1990):

i) Colocar en lugares separados, 1-2 gotas de colorante y una pequeña gota de semen, sobre el extremo de un porta, templado (37 °C).

ii) Mezclar el semen y el colorante y extender sobre el porta, pudiéndose utilizar para ello el borde de otro porta, de tal manera que se forme una delgada película sobre el mismo. Si la misma es demasiado gruesa la observación se verá dificultada.

iii) Permitir que la muestra seque y observar al microscopio (Aumento 400x).

iv) Examinar por lo menos cien espermatozoides de diferentes campos, considerando que cuantas más células se valoren más se incrementa la seguridad de la prueba.

Las muestras de semen que contengan más de un 15% de espermatozoides anormales deben desecharse (Evans y Maxwell, 1990).

4. Tests bioquímicos.

a. Coeficiente Respiratorio.

Ivanov (citado por Durán del Campo, 1980) observó que el aumento de la cantidad y fundamentalmente actividad de los espermatozoides es correspondida con un aumento paralelo de la absorción de oxígeno. Sobre la base de estas consideraciones Walton y Edward diseñaron un mecanismo capaz de determinar exactamente la cantidad de oxígeno consumido por determinada cantidad de espermatozoides. No obstante, si bien esta constituye una técnica que permite estimar con buena precisión la fertilidad del semen, la misma es extremadamente delicada como para considerarse como test rutinario.

b. Índice de Fructólisis.

El mismo constituye uno de los tests más modernos habiéndose encontrado una estrecha relación entre fertilidad e índice de fructólisis, sin embargo dada su complejidad no es frecuentemente utilizado.

c. Poder deshidrogenante.

Esta metodología, desarrollada por Sorensen en 1941 (citado por Durán del Campo, 1980), denominada test de producción de metileno y quizás una de las más discutidas por especialistas e investigadores, se basa en la actividad catalizadora desempeñada por ciertas enzimas citoplasmáticas denominadas deshidrogenasas que en determinado momento provocarían una liberación de hidrógeno.

Un índice de la actividad deshidrogenante celular, la que lógicamente deberá variar en función de la cantidad y actividad de los espermatozoides, se determinará efectivamente midiendo la cantidad de hidrógeno liberado. La misma puede ser estimada indirectamente, de ahí su denominación, mediante agregado de azul de metileno, sustancia con alta afinidad por el hidrógeno que al captarlo se convierte en leucoazul de metileno, tornándose incoloro.

De esta manera, cuanto más células espermáticas haya en una muestra o mayor sea su actividad, mayor será el hidrógeno liberado y menor será el tiempo necesario para que el azul de metileno se vuelva incoloro.

Si bien la cantidad y actividad de los espermatozoides no son de hecho sinónimo de fertilidad, la reducción del azul de metileno en pocos segundos es un dato sumamente favorable y promisorio. No obstante esta técnica ha sido objeto de numerosas críticas en el sentido que la actividad hidrogenasa no es patrimonio exclusivo de las células espermáticas.

A pesar de ello Gonsalus et al (1941) citado por Durán del Campo (1980) demostró que las potenciales células contaminantes del semen, no son suficientes como para variar el tiempo de reducción del azul de metileno.

5. Tests biológicos.

a. Porcentaje de preñez.

Constituye ésta una evaluación indirecta del semen, midiéndose la calidad del mismo a través del porcentaje de hembras preñadas, ya sea por monta natural o por inseminación artificial, pero requiere en ambos casos que las hembras sean normalmente fértiles y tengan un adecuado estado higiénico y sanitario.

b. Resistencia del espermatozoide.

Estos exámenes se han desarrollado con la finalidad de investigar la resistencia de los mismos a determinados agentes agresores. Dentro de los más conocidos se destacan resistencia al cloruro de sodio y el conocido como de shock térmico.

El primero de ellos ideado por Milanov, pretende medir la resistencia de las células sometidas al efecto de volúmenes crecientes de una solución de NaCl al 1% obteniéndose de esta forma un coeficiente según la relación $R=V/v$ donde V = volumen gastado de NaCl y v =volumen de semen utilizado (Durán del Campo, 1980).

Por su parte el shock térmico consiste en sumergir, en agua a 0 °C, por espacio de diez minutos, una muestra de semen. La diferencia obtenida, entre la cantidad de espermatozoides antes y después del tratamiento, nos da una idea del índice de resistencia de los mismos, lo que a su vez se correlaciona positivamente con la fertilidad.

E. SIGNIFICADO DE LA CALIDAD DEL SEMEN.

El objetivo de los intentos por medir la calidad del semen es garantizar que la fertilidad consiguiente de dicho semen se encuentre dentro de los parámetros normales. (Salisbury, et al., 1978).

1. Motilidad

La evaluación de la motilidad espermática constituye la técnica más frecuentemente utilizada para estimar la calidad del semen, sin embargo según Elliot (1978) la correlación entre motilidad del semen fresco y la fertilidad no es alta. Estas afirmaciones son compartidas por Salisbury et al.,(1978) quienes sostienen que la motilidad de una muestra de semen recientemente eyaculada no es una buena predicción de la fertilidad, ni de la capacidad de las células espermáticas de sobrevivir al proceso de congelación.

Sin embargo, López (1987) sostiene que la motilidad del semen tras la descongelación tiene alta correlación con la fertilidad sobre todo cuando se emplean técnicas objetivas de evaluación lo que es absolutamente coincidente con las afirmaciones de Salisbury et al. (1978) en el sentido que la valoración exacta del porcentaje de células progresivas después de la congelación reviste enorme importancia permitiendo de esta manera medir la vitalidad del semen descongelado y determinar la tasa de dilución que debe emplearse.

Por su parte Fernández Abella, et al. (1992) observaron que la fertilidad obtenida "in vivo" (tasa de procreo) mostró una alta correlación con la motilidad evaluada "in vitro".

Estas observaciones se fundamentan en las afirmaciones de Fernández Abella (1993) en el sentido de que si bien las contracciones vaginales movilizan el semen hacia el cuello uterino, es la motilidad la que determina la entrada y pasaje a través del cérvix y la

penetración del oocito. Además la unión útero-tubal constituye una importante barrera capaz de reducir la población espermática, jugando entonces un papel trascendente la motilidad espermática a los efectos de sortear la mencionada barrera.

Se ha observado que la motilidad disminuye cuando el semen es diluido, enfriado así como cuando es sometido a tratamientos de congelación y descongelación. Las posibles causas de esta disminución serían la remoción o la alteración de componentes celulares lo que provoca un trastorno del intercambio iónico (Curiel y Méndez, 1981).

Además es posible que el mecanismo de inactivación espermática por dilución y lavado sea básicamente parecido al envejecimiento de los espermatozoides cuando son almacenados, este fenómeno se caracteriza por hinchamiento y degeneración del complejo lipo-proteico, seguido por cambios físicos y químicos como la oxidación de grupos sulfhidrilos intracelulares, esenciales para la movilidad normal, disminución en el contenido de enzimas vitales como el ATP e incremento en la permeabilidad espermática lo cual ocasiona la pérdida de proteínas intracelulares (Curiel y Méndez, 1981).

2. Morfología celular. Integridad Acrosómica (PAI).

Como consecuencia de que el porcentaje de acrosomas intactos, en adelante PAI, está correlacionado positivamente con el porcentaje de no retorno al estro, incluso en un grado mayor que la motilidad, la misma constituye una técnica de gran interés en la evaluación espermática (Elliot, 1978).

Esto a su vez adquiere mayor importancia si se considera que la motilidad no siempre es afectada por el daño acrosómico según ha sido demostrado por Tasseron, et al. (1977).

Idénticos resultados ha obtenido Fernández Abella (1987) quien afirma que existe una elevada correlación entre el porcentaje de formas anormales y el poder fecundante del semen, de forma tal que un eyaculado con un porcentaje de anomalías superior al 20% debería desecharse.

Se ha observado que el espermatozoide ovino sufre mayor daño acrosómico durante el proceso de congelación y descongelación que el espermatozoide bovino. La evaluación se realiza observando el borde apical en preparaciones diluidas y fijadas con solución de Hancock. Cuando el acrosoma no está dañado el borde apical se observa como una media luna oscura en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide (López y Pérez, 1984).

Las anomalías o anomalías morfológicas pueden clasificarse en (Fernández Abella, 1987).

i) Primarias: aquellas que se originan durante el proceso de espermatogénesis y son fundamentalmente anomalías de acrosoma y de cabeza.

ii) Secundarias: aquellas que se originan luego de formados los espermatozoides y las más frecuentes son las anomalías del flagelo.

Las anomalías secundarias tienen menor importancia debido a que son las menos relacionadas con la fertilidad del semen (Fernández Abella, 1987).

No se recomienda utilizar muestras con más de 10% de anomalías primarias y 20% de anomalías totales (López y Pérez, 1984).

F. DILUCION.

Si bien, de acuerdo a los trabajos de Watson y Martin (1976), la dilución del semen no causa una gran reducción de la fertilidad del mismo, más allá de resultados obtenidos en favor de semen no diluido en comparación con aquel diluido, existen dos razones básicas que avalan dicha técnica ya sea para su uso inmediato o para congelación del mismo, según establecen Evans y Maxwell (1990):

1) Razones técnicas: La inseminación artificial es una herramienta de fundamental importancia en lo que a reproducción se refiere en tanto que permite potencializar el número de hembras a cubrir en comparación con la monta natural. Evidentemente es posible reducir el volumen así como el número de espermatozoides que contiene cada dosis con relación a la inseminación natural, lo que aumenta sustancialmente el número de hembras viables de cubrir con cada eyaculado.

2) Razones biológicas: El problema de reducir el número de espermatozoides a la dosis requerida, manteniendo un volumen aceptable, se soluciona mediante la dilución del semen. A su vez los diluyentes apropiados proporcionan a los espermatozoides nutrientes (Fuente de energía), sustancias amortiguadoras de los cambios de pH y un ambiente isotónico. Asimismo protegen a los espermatozoides frente al denominado shock de frío, cuando se enfrían y conservan o contra las injurias ocasionadas por congelación del semen.

Salisbury (1978) por su parte manifiesta que los diluyentes cumplen dos funciones fundamentales: conservar la fertilidad de las células espermáticas y aumentar el volumen total de la dosis de forma tal que la misma pueda ser envasada y utilizada convenientemente a la vez que permita manejar una concentración tal de células que aseguren la máxima tasa de fertilización sin desperdiciar espermatozoides.

La dilución del semen debe realizarse tan pronto como sea posible una vez recolectado y evaluado el semen.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, previo a la dilución es necesario determinar el número de espermatozoides y volumen requerido a los fines de un programa de Inseminación Artificial:

A) Volumen: El volumen de inseminado puede variar ligeramente dentro de ciertos límites. El límite inferior viene determinado por el volumen mínimo que se puede manejar convenientemente, con cierta seguridad y asimismo practicidad. El límite superior está determinado por la capacidad del órgano o lugar de la inseminación para retener el semen.

De esta manera y de acuerdo al tipo de inseminación se recomiendan los siguientes volúmenes:

Inseminación Vaginal:	0,30 - 0,50 ml.
Inseminación Cervical:	0,05 - 0,20 ml.
Inseminación Intrauterina:	0,05 - 0,10 ml.

(Para cada cuerno)

(Estos volúmenes deben contener el mínimo número de espermatozoides móviles).

B) Número de espermatozoides: Como regla general se requieren menos espermatozoides para la inseminación uterina que para la cervical e igualmente menos para esta última que para la vaginal. Independientemente del lugar de inseminación el número de espermatozoides móviles afecta la fertilidad, estableciéndose de esta manera un número mínimo de seguridad de acuerdo a los diferentes lugares de inseminación el que a continuación se detalla:

	FRESCO	CONSERVADO	CONGELADO
I.A. VAGINAL	300	NO EFECTIVO	NO EFECTIVO
I.A. CERVICAL	100	150	180
I.A. INTRAUTERINA			
A) VIA CERVIX (Solo cabra)	60	60	60
B) VIA LAPARASCOPIA	20	20	20

La dilución que se puede hacer del semen depende de la concentración de espermatozoides activos en la muestra y del número de dosis de inseminación que se precisen. Las muestras con baja concentración o motilidad requerirán diluciones más bajas, pero no se recomienda utilizarlas.

Por su parte, Fernández Abella (1987) establece que la relación de dilución es importante debido que a medida que aumenta la dilución los espermatozoides pierden movilidad y disminuye su resistencia al shock térmico. No obstante López (1987) no detectó

diferencias en lo que a motilidad y porcentaje de acrosomas intactos respecta utilizando distintos grados de dilución.

Aznarez y Menéndez (1994) expresaron que todo diluyente, para ser considerado ideal, debe cumplir los siguientes requisitos:

1) Igual presión osmótica que el esperma (300-320 miliosmoles) y mantener equilibrio electrolítico.

2) pH similar al semen (6,6-6,8) y poseer poder buffer, para amortiguar las variaciones del mismo.

3) Contener nutrientes que sirvan como fuente de energía para los requerimientos de los espermatozoides.

4) Carente de toxicidad y tener buena estabilidad.

5) Suministrar protección a la célula espermática contra los procesos de enfriamiento, congelación y descongelación.

6) Aumentar el volumen del semen de forma tal que permitan una manipulación adecuada de las dosis.

G. CONSERVACION.

1. Principios de la conservación del esperma.

La conservación del semen de carnero, así como el de otras especies domésticas, puede efectuarse en estado líquido (a corto plazo) o congelado. El objetivo, en cualquiera de los casos es el de disminuir el metabolismo de los espermatozoides y poder prolongar así el tiempo por el cual mantienen su capacidad fertilizante (Azzarini, 1991).

a. Temperatura.

Según Salisbury (1978) la tasa metabólica tiende a ser proporcional a la temperatura absoluta, por lo que la disminución de la misma ha sido el principal medio para disminuir las reacciones químicas y de esta manera prolongar la vida.

Por su parte Evans y Maxwell (1990) sostienen que el fundamento de conservar el semen es prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides mediante la reducción o detención de la movilidad y del ritmo metabólico, a través de la disminución paulatina de la temperatura.

b. Fuentes de energía.

Los espermatozoides necesitan la energía fundamentalmente para cubrir los requerimientos derivados de todos los procesos vitales y satisfacer los gastos resultantes de la movilidad, aunque presumiblemente se requiere energía adicional para la conservación. Por estas razones es necesario utilizar diluyentes que aporten fuentes de energía simples como la fructosa o la glucosa de manera de proteger las reservas y los componentes celulares (Salisbury, 1978).

López (1987) y Fernández Abella (1987) establecen que los diluyentes más frecuentemente utilizados para semen de carnero son algunos azúcares simples como ser glucosa, fructosa, lactosa, rafinosa.

Estos azúcares también intervienen en el mantenimiento de la presión osmótica del medio (Fernández Abella, 1987).

Coincidiendo con este último autor, Salisbury (1978) estableció que el beneficio resultante de su adición no solo se debía al hecho de suministrar un sustrato inmediatamente utilizable, sino también al hecho de aportar electrolitos para el mantenimiento del equilibrio osmótico.

Los azúcares di y trisacáridos no pueden ser metabolizados por los espermatozoides, no obstante cumplen funciones como criopreservadores, ya que contribuyen al equilibrio osmótico aportando electrolitos (Salisbury, 1978).

Sin embargo, la fertilidad del semen congelado con azúcar como crioprotector utilizando yema de huevo, fue inferior que cuando se incluía alguna cantidad de glicerina (Nagase, et al., 1968).

Salamon y Ritar (1982) observaron que los espermatozoides de semen caprino sometidos a congelación toleran una variación importante de concentración de TRIS, sin embargo la sobrevivencia de las células dependía enormemente del tipo de azúcar utilizado. Glucosa y Fructosa se comportarían mejor que Lactosa y Rafinosa.

c. Presión osmótica y equilibrio electrolítico

Los componentes, solutos, disueltos en el medio, ejercen cierta presión sobre la membrana celular. Este fenómeno se conoce como presión osmótica y aumenta o disminuye según la concentración de solutos en el medio (Evans y Maxwell 1990). Las células espermáticas se comportan como osmómetros y son capaces de experimentar amplias modificaciones de tamaño, dependiendo de la tonicidad del medio en que se encuentren. Los espermatozoides son capaces de tolerar un rango moderado de osmolaridades sin disminuir la fertilidad, no obstante se sugiere utilizar diluyentes isotónicos para no producir alteraciones morfológicas ni funcionales (Salisbury, 1978).

La osmolalidad - número de partículas suspendidas como soluto - influyen no solamente sobre la presión osmótica de la solución, sino también sobre el punto de congelación del solvente. Una concentración osmolal de un soluto en agua disminuye su punto de congelación en 1.86 °C, es decir un miliosmol disminuye el punto de congelación en 0,00186 °C (Salisbury, 1978).

d. Acción amortiguadora y pH.

Las variaciones del pH, ya sea hacia la alcalinidad o acidez, disminuirán la viabilidad de los espermatozoides por lo que los diluyentes de semen más recomendados contienen amortiguadores, es decir sustancias capaces de mantener el pH del medio cercano al óptimo (Evans y Maxwell, 1990).

El pH óptimo varía con la temperatura de conservación y con los otros componentes del diluyente, de forma tal que el óptimo para un tampón Fosfato es 7.5 y para los diluyentes Tris y Citrato es de 6.5-7.0 (Salisbury, 1978).

Salamon y Ritar (1982) trabajando con semen de chivos de angora sometidos a procesos de congelación profunda detectaron interacción entre concentración de TRIS y tipo y concentración de fuente de energía. Con diferentes concentraciones de TRIS-Glucosa o TRIS-Fructosa se lograron mejores resultados que con TRIS-Lactosa o TRIS-Rafinosa. La mejor tasa de sobrevivencia para las diferentes fuentes de energía se obtuvo con 450 mM de TRIS. Las combinaciones más satisfactorias para esa concentración de TRIS fueron 41.625 o 83.250 mM. de glucosa y 83.250 o 124.825 mM. de fructosa.

e. Inhibición del crecimiento de microorganismos.

Los diluyentes corrientemente utilizados, normalmente constituyen un riquísimo medio para la proliferación de microorganismos, los cuales dan lugar a la liberación de sustancias que pueden ser perjudiciales para los espermatozoides. Debido a esto se sugiere la utilización de antibióticos como ser penicilina y estreptomina para controlar dichos microorganismos (Evans y Maxwell 1990).

En coincidencia con esto López (1987) establece que todos los diluyentes deben contener una proporción de antibiótico para controlar los diferentes microorganismos patógenos o no que compiten con el espermatozoide por fuentes de energía y producen catabolitos tóxicos para este.

f. Protección de los espermatozoides contra el frío.

Cuando las células son enfriadas a 5 °C, las mismas son sometidas a un choque térmico que determina la pérdida de enzimas intracelulares, potasio, lipoproteína, ATP y otras sustancias. Además disminuye la motilidad y el flagelo puede llegar a curvarse y se reduce marcadamente la actividad respiratoria y la glicólisis. El ácido etilendiamino tetracético (EDTA) puede disminuir los efectos del denominado choque de frío y si las células se enfrían lentamente, especialmente por debajo de 20 °C la lesión es menos grave, lo que indica que los espermatozoides pueden experimentar variaciones adaptativas (Salisbury, 1978).

Este mismo autor señaló que se produce choque a frigore cuando los espermatozoides bovinos son sometidos a enfriamiento súbito. La magnitud del efecto depende de la temperatura final, de la velocidad de disminución de la misma, de la relación de dilución y de la longitud de tiempo en que los espermatozoides se hallan expuestos a la temperatura final.

Existen dos grandes grupos de diluyentes para protección contra el choque de frío, los que contienen yema de huevo y los que contienen leche que reflejan las orientaciones de las escuelas australianas y francesas respectivamente (Azzarini, 1991). No obstante López (1987) sugirió que se podrían considerar dos grupos adicionales, los que no contienen ninguno de los ingredientes anteriormente mencionados y los que contienen ambos.

Según Salisbury (1978) los medios más eficaces para proteger los espermatozoides frente a lesiones por enfriamiento, son aquellos que contengan lecitina, proteínas, lipoproteínas y complejos similares que se encuentran en la yema de huevo. El mecanismo protector puede ser la estabilización de la membrana celular, que determina la reducción de la permeabilidad de la membrana lo que permite soportar las alteraciones espectaculares producidas por el denominado choque a frigore.

Philips (1939) fue el primero en señalar que la yema de huevo unida con el tampón fosfatos conservaba la motilidad y la fertilidad de los espermatozoides de toro refrigerado. La fórmula era: 0,2 g de KH_2PO_4 , 2,0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 100 ml. de agua destilada y 100 ml. de yema de huevo.

Salisbury (1978) por su parte, trabajando con semen de toro, indicó que el citrato de sodio favorecía la viabilidad de los espermatozoides cuando se le adicionaba un volumen igual de yema de huevo. El citrato sódico tiene la ventaja sobre el tampón fosfatos de que es un agente quelante y tiene la capacidad de dispersar los glóbulos grasos de la yema de huevo, mejorando así la visibilidad cuando se examinan los espermatozoides al microscopio.

Más allá de las bondades que presenta la yema de huevo en lo que respecta a protección contra frío existen otras sustancias, tales como la leche, que ya fuera mencionada, cuyas proteínas (caseína) y lipoproteínas son las responsables de la

prevención contra el choque por frío (Salisbury, 1978). Este diluyente tiene la enorme ventaja de que tiene un costo reducido y es de muy fácil obtención (López, 1987).

No obstante, previo a su utilización, debe ser sometida a un tratamiento destinado a anular la presencia de lactenina, componente termolábil, asociado a la fracción albúmina, de acción espermicida (Fernández Abella, 1987). Esto se logra mediante calentamiento de la leche a 95 °C por espacio de diez minutos, debiéndose evitar que la temperatura alcance los +100 °C lo que inactivaría los efectos protectores de la misma por coagulación de las proteínas (López, 1987).

2. Alternativas de conservación del semen

a. Conservación a temperatura ambiente.

Este método fue desarrollado por Van Demark (1957), citado por Salisbury (1978) quien intentó prolongar la vida de los espermatozoides provocando una anaerobiosis ácida mediante el agregado de una solución saturada de anhídrido carbónico. El diluyente desarrollado, conocido como IVT (Illinois Variable Temperature), se constituye sobre la base de 2,00 g de citrato sódico deshidratado, 0,21g de bicarbonato sódico, 0,04g de cloruro potásico 0,30g de glucosa y 0,30 g de sulfanilamida en un volumen de 100 ml. de agua destilada y 20 partes de yema de huevo.

Melrose, citado por Salisbury (1978) obtuvo un 56% de tasa de no-retorno a 112 días trabajando con esperma de toro sobre la base de diluyente IVT, empleado a 5 °C, durante un período de 2 - 6 días. Otro diluyente utilizado como testigo, con 9,0% de leche desnatada en polvo glicerina dio un valor medio de solamente el 40% durante el mismo período, lo que demuestra que el diluyente IVT gaseado con CO₂ puede utilizarse con éxito para conservación de semen durante varios días a temperaturas de 5 °C.

En sus ensayos, Malikov, citado por Durán del Campo (1980) logró un 76,9% de fertilidad conservando el semen mediante anaerobiosis ácida utilizando un diluyente constituido sobre la base de: citrato de sodio (2,85 g), glucosa (0,82 g), bicarbonato de sodio (0,22 g), cloruro de potasio (0,35 g), sulfamilamida (0,20 g), penicilina (100.000 U), estreptomina (100 mg) y agua destilada 100 cc. El diluyente luego de preparado debe ser gasificado durante 10 a 12 minutos con anhídrido carbónico, agregándose finalmente 11 g de yema de huevo.

Otra investigación realizada a los efectos de comparar la conservación en frío a 0 °C mediante dilución sobre la base de citrato, yema de huevo y glucosa y la conservación a temperatura ambiente (7 a 20 °C) durante dos días diluido en base a ácido cítrico, no mostró diferencia alguna entre ambas metodologías (67,2% contra 67,9% de preñez). De esto se desprende que este es un método tan eficaz como la conservación mediante

enfriado, con la ventaja de que no es necesario la utilización de hielo, lo que reviste importancia para algunos países o regiones tropicales (Durán del Campo, 1980).

Padilha (1965), citado por Durán del Campo (1980) por su parte, trabajando con ambas técnicas logró un índice de fertilidad del 45,17 % para conservación a temperatura ambiente y un índice de fertilidad del 53,59% para conservación mediante enfriado en ovejas de la raza Merino. Para la raza Corriedale, los índices de fertilidad alcanzaron un 86,96% y 78,70% respectivamente.

No obstante, Evans y Maxwell (1990) consideran que dicha técnica no ha permitido lograr resultados exitosos, hecho que ha determinado que la misma no haya sido difundida ampliamente.

b. Conservación durante poco tiempo o en frío.

La técnica de preservación de semen por enfriamiento es de relativa utilidad, desde el momento que la capacidad fecundante del semen se pierde rápidamente. De hecho, no es conveniente utilizar períodos de conservación mayores de 10 a 15 horas, lo cual hace necesario que el semen sea utilizado el mismo día de recogido (Azzarini, 1991). La mayor ventaja de esta forma de conservación del semen ovino, radica en que los porcentajes de parición que se pueden obtener, suelen ser mayores que los que se obtienen con semen congelado. Maxwell y Salamon (1993) publicaron una completa revisión sobre conservación de semen ovino refrigerado.

Fernández Abella (1992), coincidiendo con lo anteriormente mencionado, detectó diferencias significativas entre resultados obtenidos con semen fresco y conservado, estableciendo que en el semen conservado a temperaturas de 10 - 15 °C por períodos de 10 - 12 horas se dan disminuciones de fertilidad como consecuencia de reducciones en la sobrevivencia de los espermatozoides en el tracto genital, ocurriendo pérdidas de movilidad y capacidad fecundante, así como aumento en las pérdidas embrionarias.

Este mismo autor estableció que considerando los menores porcentajes de parición logrados con el uso del semen conservado respecto al fresco y el costo de los diluyentes, sólo se justifica en aquellos casos en que exista imposibilidad de traslado de los machos y/o hembras a un mismo predio.

Debido a las razones detalladas, según Azzarini (1991), esto significaría una limitante importante en la mayoría de las situaciones, ya que:

1) Se debe disponer del reproductor a utilizar solamente en un radio relativamente cercano a su lugar de uso.

2) Puede emplearse sólo en las épocas más propicias para la recolección del semen, fundamentalmente en las razas con estacionalidad reproductiva acentuada.

3) Se ve limitada la posibilidad de uso, a la vida del reproductor.

Sin embargo, Córdoba Soto (1987), estudiando la fertilidad obtenida al inseminar ovejas con semen fresco y refrigerado durante 8 horas a 15 °C, utilizando dos diluyentes diferentes (citrato de sodio y ácido cítrico y leche ultrapasterizada con antibióticos) no encontró diferencias significativas entre semen fresco y el conservado ni tampoco entre diluyentes.

Por su parte en España, Garcés (1988), trabajando con periodos de conservación de 8 - 12 horas a 15 °C concluye que el tiempo de almacenamiento del semen no afectó la fertilidad.

El método referido consiste en enfriar el semen diluido desde 30 °C (temperatura de dilución) a 15 °C o más frecuentemente a 5 °C, manteniéndolo en esta temperatura hasta el momento de su utilización.

El enfriamiento del semen debe realizarse en forma gradual, poniendo especial atención entre los 18 y 5 °C, debido a que en este margen los espermatozoides son especialmente sensibles al shock de frío, por lo que deberán evitarse descensos bruscos de temperatura. Corrientemente se aconseja un tiempo de 1,0-1,5 horas para enfriarlo a 15 °C y 2,0-3,0 horas para enfriarlo a 5 °C (Evans y Maxwell, 1990).

Para la conservación del semen a temperaturas por encima de la congelación, el enfriamiento lento ha demostrado ventajas frente al enfriamiento rápido en cuanto a la conservación de la motilidad y capacidad del espermatozoide para metabolizar sustratos (Salisbury, 1978).

Las técnicas de preservación del semen en estado líquido, con buenas posibilidades de mantener su capacidad fecundante, se basan en dos elementos que se usan como protectores de los espermatozoides: la proteína de la leche o de la yema del huevo (Azzarini, 1991).

La técnica de rutina utilizada en Francia, emplea un diluyente isotónico sobre la base de leche descremada reconstituida o leche entera sometida a calentamiento a 92 - 95 °C en baño María durante 8 a 10 minutos para desnaturalizar ciertas proteínas perjudiciales para la supervivencia del espermatozoide. Los diluyentes en base a yema de huevo y una solución buffer son más usados en Australia, donde el efecto beneficioso del mismo parece radicar en alguna molécula proteica o lipoproteica que se adhiere a la membrana del espermatozoide y lo protege del proceso de enfriado. A diferencia de la anterior técnica, esta permite realizar un enfriado a menor temperatura (4 °C), aunque sin embargo no se recomienda conservarlo por más de 12 a 24 horas (Azzarini, 1991).

Los diluyentes a utilizarse deben brindar protección contra el shock de frío, consecuencia del enfriamiento, entre los que se destacan Yema de huevo - TRIS - Fructosa, Yema de huevo - Citrato - Glucosa o Leche de vaca, Leche entera calentada, leche en polvo reconstituida o leche UHT (Evans y Maxwell, 1990). Estos mismo autores sostienen que es necesario adicionar 1000 UI de penicilina sódica y 1 mg de sulfato de estreptomina por cada ml de diluyente a los efectos de contralar el crecimiento microbiano.

Van Demark (1950) y Foote y Bratton (1949), citados por Salisbury (1978) demostraron que la fertilidad del semen líquido se mejoraba significativamente mediante la adición de un diluyente que contenga yema de huevo antes del enfriamiento. Sin embargo no es el único aspecto a considerar, debido a que la tasa de enfriamiento puede afectar marcadamente la fertilidad.

c. Conservación mediante congelado

La congelación del semen, determina que las reacciones metabólicas permanezcan detenidas, o por lo menos muy reducidas, esto permite la conservación del mismo durante largo tiempo lo que ha tenido, sin lugar a dudas, importantes repercusiones (Evans y Maxwell, 1990).

A través del método de congelación, se puede preservar una célula a temperaturas extremadamente bajas, permitiendo que el metabolismo se reduzca absolutamente, sin que pierda su potencial de vida. A temperaturas de -196°C no hay reacciones bioquímicas ni energía térmica dentro de la célula espermática, aún más, no hay evidencia de que puedan haber cambios de índole genética (Palacios, 1994).

Azzarini (1991) por su parte estableció que mediante estos métodos, semejantes a los que se emplean para conservar el semen de toro, la actividad metabólica de los espermatozoides se suprime completamente cuando son llevados a la temperatura del nitrógeno y teóricamente pueden ser conservados indefinidamente.

Los procesos de congelación y descongelación determinan que un porcentaje variable de los espermatozoides no sobreviva a este proceso, existiendo tres causas fundamentales que explican estos hechos:

- 1) La formación de cristales de hielo internos que afectan la estructura del espermatozoide.
- 2) Deshidratación de las células espermáticas.
- 3) Interacción de ambos factores.

Se ha comprobado que al reducir la temperatura por debajo de los 20°C , el espermatozoide comienza a presentar cambios biofísicos, principalmente en la membrana plasmática, pero no es sino cuando se la somete a temperaturas entre los 0°C y los -20°C

°C, o hasta los - 60 °C, que el espermatozoide sufre efectos de descompensación iónica y de líquidos, suficientemente graves como para causar un choque térmico. Esto se puede detectar al microscopio por la presencia de espermatozoides con la cola doblada, con pérdida de motilidad por la disminución de energía, o realizando movimientos en círculo, lo cual se debe al aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática y a la salida de iones y moléculas (Palacios, 1994).

Según este último autor, el problema en la crioconservación no es la habilidad del espermatozoide para mantenerse viable a - 196 °C, sino sortear el daño que ocurre durante el congelamiento y descongelamiento, al pasar la célula por una zona de temperatura crítica entre - 15°C y - 60 °C durante la cual se producen fenómenos que se derivan del proceso de enfriamiento, tales como formación de cristales intra y extracelularmente, deshidratación y distorsión de la membrana.

Las principales consecuencias físicas y químicas de la congelación son la separación del agua pura de la solución para formar hielo y la creciente concentración de solutos resultante del líquido residual, lo que determina la deshidratación de los espermatozoides. Estos hechos y sus efectos sobre las células se hallan influidos por el nivel y los diferentes tipos de agentes crioprotectores, por la osmolalidad y el pH del diluyente así como por la velocidad de congelación (Salisbury, 1978).

El punto de congelación de una solución determinada depende de la concentración de partículas que contiene como soluto. De esta manera, un peso molecular dado de un electrolito capaz de disociarse al disolverse, disminuirá el punto de congelación más que el mismo peso proporcional de una molécula que no se disocia. El descenso de la temperatura determina que el agua se congele, lo que condiciona que la concentración de partículas aumente en la solución remanente lo que trae aparejado un descenso continuo del punto de congelación de la misma. Las concentraciones crecientes de soluto producen la deshidratación de las células espermáticas lo que a su vez se potencializa si las velocidades de congelación son excesivamente lentas. En el mismo sentido, evitando este tipo de lesiones, se aconsejan velocidades de descongelación rápidas (Salisbury, 1978).

La congelación determina la formación de cristales de hielo extracelulares, que no constituye causa de lesiones extremadamente perjudiciales, más allá de las simples lesiones que pueda ocasionar. Sin embargo, con pocas excepciones, el hielo intracelular es letal (Salisbury, 1978).

Durante la congelación, la temperatura a la que se dañan los espermatozoides bovinos se ha hallado más baja en un diluyente hipotónico que en otro isotónico (Yassen y Foote, 1967).

La concentración de soluto, la rapidez de sus modificaciones y los efectos perjudiciales sobre los espermatozoides dependen de la temperatura y de su velocidad de cambio (Salisbury, 1978).

Palacios (1994) establece que con un ritmo de congelamiento lento (reducción de temperatura menor a 5 °C/minuto) se puede evitar el congelamiento celular, porque este ritmo permite que el agua intracelular y extracelular encuentren su equilibrio, ya que el agua intracelular puede salir continuamente, mientras el exterior se va congelando. Llega un momento, el de la temperatura de nucleación de hielo de la célula en que ésta prácticamente no tiene agua y no se congela. Hay evidencias que indican que cuando aproximadamente el 90% del agua es removida, el 10% restante no es capaz de congelarse a ninguna temperatura.

Durante la congelación lenta, las células se hallan expuestas durante periodos prolongados a concentraciones de solutos que aumentan con relativa lentitud y puede producirse cierta deshidratación celular. Con la congelación rápida disminuye la longitud de exposición a las concentraciones perjudiciales de soluto y puede evitarse de esta manera las lesiones por deshidratación (Salisbury, 1978).

Sin embargo la congelación rápida da lugar a la formación de cristales intracelulares, que afectan la membrana, como consecuencia de que velocidades de descenso de la temperatura muy altas determinan que se agote el tiempo necesario para que el agua congelable difunda desde la célula (Salisbury, 1978).

Cuando el ritmo de enfriamiento es rápido (reducción de temperatura mayor a 10-20 °C/minuto), el agua intracelular no tiene tiempo a salir, por lo que se forman cristales que, al aumentar el ritmo de congelamiento, se hacen cada vez más pequeños, hasta hacerse imperceptible aún con el microscopio electrónico. Esto es saludable para la célula mientras permanezca en ese estado. No obstante, esos microcristales son termodinámicamente inestables, por lo que al ser descongelados, tienden a ser reagrupados (recristalización) y formar cristales más grandes, que sí son letales para la célula, por lo que la solución es un ritmo de descongelación rápido (Palacios, 1994).

Picotee y Komarek (1967), citado por Palacios (1994), observaron una pérdida de lípidos durante la congelación posiblemente por permeabilización de las membranas celulares.

La lesión de la membrana puede explicar también la mayor pérdida de enzimas de los espermatozoides tras la congelación sin glicerina (Graham y Pace, 1967).

Tales alteraciones son posiblemente los resultados del aumento de las concentraciones de solutos que determinan la desnaturalización de las proteínas.

◆ Crioprotectores.

En respuesta a los daños derivados de la dilución y congelación del semen, se ha buscado disminuir los mismos desarrollando técnicas adecuadas de congelación y fundamentalmente utilizando los denominados agentes crioprotectores.

Teóricamente se podría hacer más resistente a un espermatozoide reduciéndole el número de poros en la membrana y reduciéndole las funciones ATP-dependientes, así como la agregación proteínica y formación de bloques lipídicos. Presumiblemente ésta es la acción de las lipoproteínas de la yema de huevo o de la leche en los diluyentes y de los crioprotectores, como por ejemplo del dimetil sulfóxido, la betaina y el glicerol (Palacios, 1994).

En 1949, investigadores ingleses, Polge, Smith y Parker introducen el glicerol en los diluyentes habitualmente utilizados y descubren accidentalmente, que este elemento evita la formación de cristales de hielo lo que indudablemente marcó un paso importante en materia de congelación de semen, lográndose por primera vez sorprendentes recuperaciones de los espermatozoides sometidos a este tratamiento (Durán del Campo, 1980).

A partir de este momento, el glicerol se ha constituido en el agente crioprotector más difundido (Visser, 1974; Salisbury, 1978).

El glicerol es el agente crioprotector más frecuentemente utilizado el que actúa sobre las propiedades del diluyente, provocando un descenso del punto crioscópico minimizando entonces el daño osmótico (Mazur, 1980).

La crioprotección proporcionada por la glicerina, se atribuyó en principio a la alteración que la misma inducía sobre el tamaño y forma de los cristales de hielo, lo que posiblemente disminuía su efecto de daño mecánico (Salisbury, 1978).

Posteriormente se concluyó que la glicerina actúa mediante un mecanismo de tamponamiento salino, uniéndose con el agua y disminuyendo el punto de congelación de las soluciones, por lo que a una temperatura dada se forma menos hielo. En consecuencia, la concentración de solutos en el líquido residual se reduce en forma proporcional. La influencia perjudicial de los solutos concentrados parece depender de la temperatura, de aquí que la glicerina, al reducir la temperatura a la que se obtienen tales concentraciones perjudiciales de solutos disminuye sus efectos (Salisbury, 1978).

Además de la glicerina, existen otros agentes crioprotectores, sin embargo ningún sustituto ha dado resultados tan satisfactorios. Entre ellos podemos citar el etilen glicol, el propilen glicol y el DMSO (dimetil sulfóxido) que penetra rápidamente en la célula y es más eficaz durante congelación lenta. Existen además algunos disacáridos y trisacáridos, que han mostrado también efectos criopreservadores, que no penetran en la célula y parecen ser más eficaces cuando se emplean en congelaciones rápidas (Salisbury, 1978).

Evans y Maxwell (1990) señalaron que de los agentes crioprotectores disponibles ninguno ofrece mejor protección que el glicerol.

Por su parte Curiel y Méndez (1981), al congelar semen de carnero encontraron que el daño celular en espermatozoides congelados fue menor cuando utilizaron glicerol que cuando utilizaron DMSO.

♦ Proporción de glicerol en el diluyente.

Uno de los más importantes factores que determinan la concentración de glicerol necesaria para una óptima criopreservación es la velocidad de congelado. No obstante la concentración óptima de glicerol puede estar influenciada por otros componentes del diluyente utilizado entre los que se destacan: contenido de sólidos totales en diluyentes a base de leche, contenido de yema de huevo y concentraciones de citrato de sodio, Tris y lactosa (Fiser y Fairfull, 1986).

Estos mismos autores señalaron que existe una fuerte interacción entre concentración de glicerol y velocidad de congelación de manera tal que si se disminuye el porcentaje de glicerol será necesario incrementar la velocidad de congelación para obtener resultados satisfactorios.

Conforme la función que la glicerina desempeña, el nivel óptimo de la misma en el diluyente aumenta de acuerdo a los aumentos de tonicidad del mismo (Salisbury, 1978).

First et. al. (1961) utilizando concentraciones de glicerol de 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% y 15% en un diluyente sobre la base de leche, observaron que la mejor recuperación espermática se logró con concentraciones de 6% a 8% de glicerol.

Por su parte Graham, Crabo y Pace (1978) concluyeron que 7% de glicerol permitía obtener mejores resultados que 3,5% o 14%. Reafirmando estas conclusiones estos mismos autores determinaron que la supervivencia espermática fue significativamente mayor utilizando niveles de glicerol de 6% a 8%, que trabajando con niveles por debajo de 6% o por encima de 10%, utilizando un diluyente sobre la base de leche.

No obstante otros investigadores sugieren que no existiría diferencia utilizando concentraciones de glicerol de 3,75% o 7,5% en cuanto a supervivencia espermática (Jones, 1969).

López (1987) trabajando con TRIS - yema de huevo y 3%, 6% y 9% de glicerol obtuvo diferencias significativas entre los tres niveles, logrando los mejores resultados con 3% y luego con 6% tanto para motilidad al descongelado como para porcentaje de acrosomas intactos.

Jones (1969) encontró que en el rango de 3% a 7% de glicerol, un incremento del mismo aumentaba la motilidad pero disminuía la proporción de espermatozoides con acrosoma normal.

Das y Rajkonwar (1994) estudiando los cambios morfológicos del acrosoma durante el proceso de congelado de semen caprino con diluyente basado en fructosa, yema de huevo y diferentes niveles de glicerol (5,6 y 7%) observaron que no existían diferencias significativas entre los distintos porcentajes de glicerol, no obstante los resultados fueron sensiblemente superiores trabajando con 7% de glicerol.

El incremento en los porcentajes de acrosomas dañados conforme disminuye la concentración de glicerol coincidió con los hallazgos de Jainudeen y Dass (citado por Das y Rajkonwar, 1994)

♦ Adición de glicerol.

1) Temperatura.

Se ha sugerido que el glicerol es levemente tóxico para el espermatozoide ovino, aún trabajando con concentraciones tan bajas como 4%, no obstante los efectos tóxicos disminuyen cuando la adición se hace a temperaturas cercanas a 0 °C (Colas, 1975)

Este mismo autor también concluyó que la tasa de recuperación de los espermatozoides es función de la temperatura a la que es agregado el glicerol

Se ha comprobado que los efectos del glicerol disminuyen si el mismo se enfría rápidamente (Entwistle y Martin, 1972; Colas, 1975).

Polge (1953), citado por Salisbury (1978), trabajando con semen de toro, señaló que el reavivamiento de los espermatozoides después de la congelación era mayor si la glicerina se añadía a 5 °C, que cuando la misma se agregaba a 20 °C.

Por su parte Miller y Van Demark (1954), citado por Salisbury (1978) obtuvieron un porcentaje de motilidad de los espermatozoides ligeramente más alto cuando la glicerina se añadió a 4,5 °C que cuando se realizó a 10 °C y que a su vez se lograron resultados superiores que cuando la glicerina se agregó a 15,5 °C.

No obstante, y más allá de la evidencia en favor de esta metodología, Graham, Crabo y Pace (1978) informaron que no existían diferencias en cuanto al agregado de glicerol a 3 °C o 35°C.

Coincidiendo también con estos resultados, López (1987) señaló que no detectó diferencias en el porcentaje de acrosomas intactos, agregando el glicerol a 5 °C como a 35 °C, trabajando con un diluyente sobre la base de TRIS - yema de huevo - glicerol.

Los efectos perjudiciales de la exposición a la glicerina a temperaturas altas son reversibles, al menos parcialmente tras la posterior equilibración a 5 °C. Esto indicaría que la

supervivencia podría afectarse en mayor grado en muestras glicerizadas a temperaturas altas cuando el tiempo de equilibración se reducía (Salisbury, 1978).

En favor de esta observación, Crabo, Brower y Brown (1971) señalaron que la tasa de liberación de la enzima glutámico oxalacética (GOT) no difería con glicerización a 5 °C o 37 °C, luego de equilibrado durante cuatro horas.

Foote (1970) trabajando con diluyente sobre la base de TRIS - yema de huevo y un equilibrado de tres horas señaló que no detectó disminución de la fertilidad por la adición de glicerina a 35 °C.

Por su parte, Jones (1969) trabajando con semen ovino, señaló que existe interacción entre la concentración de glicerol y el tiempo de equilibrio.

ii) Tasa de dilución.

Salisbury (1978) observó que existe cierto beneficio en la adición de glicerina en varias etapas al semen de toro, pero no se detectaron ventajas con más de cuatro adiciones.

Apoyando estas observaciones, Wickersham y Almquist (1959), citados por Salisbury (1978), señalaron que la viabilidad de los espermatozoides en el semen líquido se veía favorecida por la adición de glicerina sucesivamente en partes de 20, 30 y 50% con intervalos de 10 minutos, en lugar de añadirla en una sola operación.

No obstante, Entwistle y Martin (1972) trabajando con semen de carnero no detectaron diferencias significativas comparando el glicerizado en una sola fracción contra glicerizado en tres fracciones con intervalo de veinte minutos entre una y otra.

iii) Tiempo de equilibrio.

El período de equilibrio es el período que media desde que se produce el agregado de glicerol hasta que se inicia el proceso de congelación.

Ciertos investigadores han demostrado que la motilidad y la fertilidad tras la descongelación de los espermatozoides bovinos se favorecen aumentando el intervalo entre la adición de glicerina y el comienzo de la congelación (Salisbury, 1978).

Inicialmente se le dio mucha importancia a este aspecto, pero luego se observó que lo esencial no es el tiempo en que está presente el glicerol, sino que es necesario que los espermatozoides permanezcan por un lapso de tiempo dado a una temperatura de 5 °C, previo a su congelación (López, 1987).

Algunos autores encontraron que el tiempo de equilibrio no tenía efecto significativo (Ojones, 1969; Kalatharn, Ewin y Easwaran, 1986).

supervivencia podría afectarse en mayor grado en muestras glicerizadas a temperaturas altas cuando el tiempo de equilibración se reducía (Salisbury, 1978).

En favor de esta observación, Crabo, Brower y Brown (1971) señalaron que la tasa de liberación de la enzima glutámico oxalacética (GOT) no difería con glicerización a 5 °C o 37 °C, luego de equilibrado durante cuatro horas.

Foote (1970) trabajando con diluyente sobre la base de TRIS - yema de huevo y un equilibrado de tres horas señaló que no detectó disminución de la fertilidad por la adición de glicerina a 35 °C.

Por su parte, Jones (1969) trabajando con semen ovino, señaló que existe interacción entre la concentración de glicerol y el tiempo de equilibrio.

ii) Tasa de dilución.

Salisbury (1978) observó que existe cierto beneficio en la adición de glicerina en varias etapas al semen de toro, pero no se detectaron ventajas con más de cuatro adiciones.

Apoyando estas observaciones, Wickersham y Almquist (1959), citados por Salisbury (1978), señalaron que la viabilidad de los espermatozoides en el semen líquido se veía favorecida por la adición de glicerina sucesivamente en partes de 20, 30 y 50% con intervalos de 10 minutos, en lugar de añadirla en una sola operación.

No obstante, Entwistel y Martin (1972) trabajando con semen de carnero no detectaron diferencias significativas comparando el glicerizado en una sola fracción contra glicerizado en tres fracciones con intervalo de veinte minutos entre una y otra.

iii) Tiempo de equilibrio.

El periodo de equilibrio es el periodo que media desde que se produce el agregado de glicerol hasta que se inicia el proceso de congelación.

Ciertos investigadores han demostrado que la motilidad y la fertilidad tras la descongelación de los espermatozoides bovinos se favorecen aumentando el intervalo entre la adición de glicerina y el comienzo de la congelación (Salisbury, 1978).

Inicialmente se le dio mucha importancia a este aspecto, pero luego se observó que lo esencial no es el tiempo en que está presente el glicerol, sino que es necesario que los espermatozoides permanezcan por un lapso de tiempo dado a una temperatura de 5 °C, previo a su congelación (López, 1987).

Algunos autores encontraron que el tiempo de equilibrio no tenía efecto significativo (Ojones, 1969; Kalatharn, Ewin y Easwaran, 1986).

Por su parte Graham, Crabo y Pace (1978) señalaron resultados contradictorios en cuanto al efecto de la duración del período de equilibración y la recuperación de los espermatozoides luego de la congelación. Estos investigadores atribuyeron los resultados a la posible ocurrencia de interacción entre la duración del período de equilibrio, la concentración de glicerol, la tasa de dilución y la tasa de enfriamiento.

Das y Rajkonwar (1994) obtuvieron los mejores resultados, en cuanto a porcentaje de acrosomas intactos, con periodos de equilibración de una hora, y que inclusive se detectó que periodos de equilibración de seis horas resultaron menos favorables que periodos de una hora.

Estos datos coinciden con los hallazgos de Aguirre et al (1978), citado por Das y Rajkonwar (1994), quien detectó menores porcentajes de daño acrosómico con periodos de equilibración de 2 a 4 horas que con periodos de 5 a 22 horas.

González (1974) por su parte, citado por Das y Rajkonwar (1994) registró porcentajes de concepción más altos con periodos de equilibración de una hora, trabajando con semen ovino.

iv) Enfriamiento.

Como norma general se ha recomendado que el enfriamiento del semen comience inmediatamente después de la recogida y dilución. En cualquier caso debe añadirse al semen un diluyente que contenga sustancias que puedan impedir el choque a frigore (Salisbury, 1978).

Este mismo autor también señaló que la tasa de enfriamiento puede afectar marcadamente la fertilidad, siendo preferible enfriamientos lentos a enfriamientos rápidos.

El tiempo empleado para disminuir la temperatura desde 35 °C a 5 °C no presenta muchas diferencias entre los diferentes autores, Dziuk et al. (1972) utilizaron una hora, Visser (1974) 2 a 2,5 horas y Colas (1975) 2 horas.

Jones (1969) por su parte, encontró una interacción entre tasas de enfriamiento y tiempo de equilibrio. Cuando el tiempo de enfriado del semen desde 30 °C a 5 °C aumento de 1 a 3 horas la proporción de espermatozoides móviles era mayor en el menor tiempo.

Deka y Rao (1987) trabajando con semen caprino y enfriando desde 35 °C a 5 °C en 0,5, 1 y 2,5 horas concluyeron que aparentemente los cambios acrosómicos resultaron menos importantes cuando se realizó enfriamiento lento. No obstante si bien el porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles y la incidencia de los diferentes cambios acrosómicos difirió significativamente ($P < 0,01$) entre los diferentes estados del procesamiento del semen (Fresco, Enfriado a 5 °C, Equilibrado y Descongelado) pero no entre las diferentes velocidades de enfriamiento.

Esto es totalmente coincidente con Westhuysen (1978) citado por Deka y Rao (1987) quien no observó ningún efecto de la duración del enfriamiento de semen caprino (0,5,1,2 horas) sobre la motilidad posdescongelado utilizando un diluyente basado en TRIS.

H. METODOS DE CONGELACION.

La preservación del semen ovino a temperaturas ultra bajas se realiza hace ya muchos años. Mediante estos métodos, semejantes a los que se han utilizado para conservar semen de toro, la actividad metabólica queda detenida y teóricamente pueden conservarse indefinidamente (Azzarini, 1991).

Visser (1974) asevera que el semen de toro congelado puede ser conservado por varios años sin que decrezca su capacidad fertilizadora, se han obtenido buenos resultados luego de tres años hasta doce años.

Salamon (1972) obtuvo una tasa de procreo del 53% trabajando con semen congelado por varios años. Por su parte Visser (1974) estableció que la fertilidad del semen de carnero, congelado en nitrógeno líquido, no decrece con el paso del tiempo.

Cuanto más baja es la temperatura de congelación, más tiempo puede conservarse la motilidad y fertilidad (Salisbury, 1978).

Las dos grandes formas de congelación son sobre la base de hielo seco con una temperatura de 78.8°C bajo cero y nitrógeno líquido con una temperatura de 196°C bajo cero (Fernández Abella, 1987).

Este mismo autor considera, que en razón de que los perjuicios debidos a la presión osmótica finalizan aproximadamente a los 50°C bajo cero, teóricamente no existirían diferencias entre usar uno u otro.

Las dos técnicas disponibles para el congelamiento de semen ovino son: las que utilizan pajas o las que emplean pastillas (pelets) y en general se acepta que los resultados obtenidos con uno u otro método son semejantes (Azzarini, 1991).

Para congelar el semen por el método de los pelets, se precisa un bloque de hielo seco (nieve carbónica o dióxido de carbono sólido, -79°C). Utilizando un aparato apropiado, de acero inoxidable y esterilizado por alcohol, se hacen agujeros de tamaño conveniente en la superficie del bloque, en los que se depositarán volúmenes adecuados de semen diluido y enfriado a 5°C . Una vez congelada la gota y transformada en pastilla, la misma es sumergida en nitrógeno (Fernández Abella, 1987; López, 1987; Evans y Maxwell, 1990; Azzarini, 1991).

Alternativamente, se puede utilizar una bandeja de plástico, provista de agujeros en su superficie y enfriada a una superficie de -79°C a -14°C , por inmersión en nitrógeno.

líquido. Este método tiene el inconveniente de que es difícil de controlar la temperatura de la placa y consecuentemente el ritmo de enfriamiento, pero proporciona una alternativa válida para congelar el semen en forma de pelets, en zonas donde no se dispone de hielo seco (Evans y Maxwell, 1990).

La congelación en pajuelas, requiere que las mismas, una vez llenas con semen diluido, sean enfriadas a 5 °C en el término de 1,5 a 2,0 horas y luego se congelan.

Algunos autores consideran que no existen diferencias significativas entre el tipo de envasado (pajuelas o pelets), no obstante los diferentes resultados obtenidos estarían dependiendo del tipo de diluyente utilizado y de los métodos de descongelado (Aamdal y Andersen, 1968; Maxwell et al, 1980).

Fernández Abella, Pizarrosa y Villegas (1992) por su parte, no observaron diferencias significativas en los resultados de fertilidad obtenidos, comparando ambos tipos de envasado.

No obstante estos mismos autores (1992) encontraron que el método de congelación en base a pajuelas logró los mejores resultados, mientras que la congelación por medio de pelets, no es tan efectiva cuando el diluyente utilizado se constituyó en base a leche descremada, lo que estaría indicando cierta interacción entre el método de congelación y el tipo de diluyente empleado.

Sin embargo, ciertos resultados permitieron concluir que la congelación en pajuelas es más homogénea que la realizada en pelets por proveer la primera una mayor superficie de contacto, lo que disminuiría el grado de daño celular (Fernández Abella, 1987).

Más allá de los numerosos resultados en favor de la congelación en base a pajuelas, Visser (1974) obtuvo mejores resultados trabajando con pelets congelados en hielo seco, que con pelets congelados en nitrógeno líquido o en pajuelas. El autor sugiere que la diferencia entre pajuelas y pelets podría estar dada por las diferentes velocidades de congelación y/o el efecto benéfico que la solución de descongelación ejerce sobre los espermatozoides congelados en pelets.

Por su parte Huton (1987) observó que existen diferencias entre los distintos tamaños de pelets, detectándose una mejor performance en cuanto a porcentaje de preñez de los pelets de 0,1 ml. frente a los pelets de 0,2 ml.

S. Salamon (1967) comparando los tres sistemas de congelación, pelets, pajuelas y ampollas, no encontró diferencias de fertilidad estadísticamente representativas, más allá de que los resultados fueron muy pobres.

Azzarini (1991) concluyó que las experiencias que han comparado los dos métodos de congelación (pajuelas y pelets) indican que son igualmente efectivos desde el punto de vista de la fertilidad, no obstante las pajuelas admiten mejores formas de identificación, lo

que constituye un requisito imprescindible que contempla la legislación de algunos países importadores de semen.

1. Descongelado del semen.

La descongelación del semen es un punto crítico. Aparte de las injurias por la congelación, los espermatozoides también se pueden lesionar si el proceso de descongelación no se lleva a cabo de una forma apropiada. No existen medios técnicos o resulta sumamente difícil medir el grado y proporción de las lesiones atribuibles a los procesos de congelado y descongelado por separado (Evans y Maxwell, 1990).

La recuperación y supervivencia de los espermatozoides después del congelamiento están fuertemente influidas por el proceso de descongelación aplicado, pudiéndose provocar un daño adicional a las células si el proceso no es el óptimo requerido (Visser, 1994).

Por otra parte la tasa a la que se produce la descongelación depende del tamaño y forma del recipiente (ampolla, pajueta, pildora) en que se conserva el semen, de la composición del recipiente (plástico, vidrio), del medio de descongelación (agua, aire), de la temperatura impuesta y del sistema de descongelación (Pickett, 1971).

Fukui (1979) trabajando sobre la técnica de congelación y descongelación de semen ovino en pelets, concluyó que los mejores resultados de recuperación espermática se obtuvieron con semen diluido en TRIS - glucosa - yema de huevo - glicerol y descongelado en recipientes de vidrio o de aluminio a una temperatura de 37 °C y sin solución de descongelación.

Esta técnica proporciona resultados satisfactorios, incluso tan buenos como los obtenidos con solución descongeladora, contando además con la gran ventaja de que no diluye más el semen (Evans y Maxwell, 1990).

No obstante, la descongelación de pelets en solución ha sido beneficiosa en semen ovino, detectándose un tipo de acción reparadora provocada por la solución de descongelado sobre las células espermáticas sometidas a congelamiento (Visser, 1974).

La solución descongelante aumenta el ritmo de descongelación y puede proporcionar algún grado de protección a los espermatozoides que no se encuentran letalmente alterados por el proceso de la congelación (Evans y Maxwell, 1990).

Estos mismos autores señalaron que aunque una solución descongelante puede tener un efecto beneficioso sobre la recuperación de las células espermáticas, puede, sin embargo, que no sea el medio óptimo para el mantenimiento de la viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación. Existe una relación entre composición del

diluyente pre-congelado y la solución descongelante. Por tanto, cuando se elija un diluyente y una solución descongelante se debe tener en cuenta la composición de ambos medios.

Lightfoot y Salamon (1969) y luego Visser (1974), determinaron interacciones entre la composición del diluyente para descongelado y la tasa de dilución.

Las diferentes soluciones para la descongelación de semen congelado en rafinosa-citrato (TRIS) han sido inositol citrato, citrato de sodio o glucosa citrato, siendo la primera la de preferencia (Visser, 1974).

Por su parte Graham, Crabo y Pace (1978) realizaron un trabajo comparando soluciones electrolíticas y soluciones no electrolíticas con citrato de sodio, para comparar la supervivencia al descongelar pelets de semen ovino diluido sobre la base de rafinosa citrato, encontrándose que la solución no electrolítica tuvo una mejor performance que inositol, glucosa, lactosa o rafinosa.

El descongelado se puede realizar de tres formas diferentes: lenta (en agua con hielo, 4 - 6 °C), rápida (a temperaturas superiores a 35 °C) y a temperatura ambiente (Fernández Abella, 1987).

Teóricamente, cuanto más deprisa se congela una muestra, más rápidamente debe descongelarse para obtener una supervivencia óptima (Salisbury, 1978; Evans y Maxwell, 1990).

Salisbury (1978) señaló que como consecuencia de que las células pueden estar expuestas a concentraciones perjudiciales de soluto durante el recalentamiento, la descongelación rápida puede ser beneficiosa.

Por su parte, Aamdal y Andersen (1968) y Colas (1979) concluyeron que realizando una descongelación rápida se producen menos daños a nivel de células espermáticas.

Más allá de los resultados favorables obtenidos por Colas (1979) son igualmente válidos los planteamientos por el realizados en el sentido de que debe considerarse seriamente si las ventajas obtenidas con esta técnica justifican los riesgos que implica descongelar por espacio de 8 a 10 segundos a una temperatura de alrededor de 75 °C en la cual pequeñas variaciones en el tiempo de descongelación pueden provocar daños irreversibles.

Valencia, Méndez, González y Trejo (1993) trabajando con semen caprino congelado en pajuelas de 0,25 y 0,50 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura determinaron que no existieron diferencias significativas en cuanto a la motilidad progresiva al descongelar rápida o lentamente, e incluso detectaron menor daño acrosomal con pajuelas de 0,5 ml descongeladas lentamente.

Estos mismos autores determinaron entonces que si bien algunos investigadores han obtenidos buenos resultados trabajando con descongelación rápida, la descongelación lenta es más adecuada debido a que tiene menores riesgos que la rápida.

Los principios implicados en la descongelación del semen conservado en pajuelas deben ser similares a los que se aplican al semen conservado en ampollas. Sin embargo, los caracteres de transferencia de calor de un recipiente de plástico delgado y largo exigen técnicas de descongelación diferentes (Salisbury, 1978).

Aamdal y Anderesen (1968) utilizaron una técnica de tinción para valorar los resultados de la descongelación del semen en pajuelas. La descongelación en agua a 4 °C o en agua o aire a 20 °C determinó resultados inferiores a la descongelación en agua a 35 °C, y la descongelación a 35 °C durante 30 segundos fue inferior a la descongelación a 75 °C durante 12 segundos.

Visser (1974) obtuvo también mejores resultados para descongelaciones a 72 - 75 °C contra descongelaciones a 35 °C obteniendo un porcentaje de preñez del 70%. Para el caso de los pelets, este mismo autor concluyó que la temperatura ideal para descongelado sería de 37 - 60 °C dependiendo del tipo de descongelación que se realice.

Sin embargo, Fukui (1979), utilizando pajuelas obtuvo mayor motilidad al descongelado con temperaturas de 37 °C que con temperaturas de 75 °C.

Deka y Rao (1986), trabajando con semen caprino congelando por el método de las pajuelas, detectaron diferencias significativas en lo referente a la motilidad y sobrevivencia espermática en favor del método de descongelado rápido (37 a 40 °C por espacio de 12 - 15 segundos) en comparación con el método lento (5 °C por espacio de 2 minutos). Dicho efecto se debería fundamentalmente a que la congelación rápida condicionará menores periodos de exposición a concentraciones crecientes perjudiciales de la solución.

González y Méndez (1990) trabajando con semen caprino congelado y descongelado a dos ritmos de temperatura, 37 °C durante 12 - 15 segundos y 55 °C durante 4 segundos, obtuvieron 59,06 % de motilidad progresiva al descongelado y 10,44 % de daño acrosomal para el primer caso y 59,95% y 10,01 % de motilidad progresiva y daño acrosomal respectivamente para el segundo caso. Las diferencias no resultaron significativas, sin embargo la descongelación a 37 °C resulta más fácil e implica menor riesgo cuando se trabaja a campo.

No obstante, Urea Jiménez (1990) trabajando también con dos ritmos de descongelación diferentes, 75 °C por espacio de 12 segundos y 35 °C por 30 segundos, detectó mejores resultados con la primera técnica de descongelado tanto en términos de motilidad progresiva al descongelado como en porcentaje de acrosomas intactos.

Más allá de los satisfactorios resultados que se han obtenido con descongelaciones rápidas, normalmente la descongelación de pajuelas se efectúa mediante inmersión en agua a 37 - 38 °C durante 30 a 40 segundos (Fernández Abella, 1987).

I. FACTORES QUE AFECTAN LA FERTILIDAD EN LA I.A.

Según Evans y Maxwell (1990), en un programa de I.A. y siempre y cuando los animales estén sanos y libres de anomalías en su aparato genital, hay un número de factores que pueden influenciar notablemente los resultados:

1) Número de espermatozoides: El número de espermatozoides óptimo varía según el estado de conservación (fresco, refrigerado, congelado) y de la técnica de inseminación. Un número de espermatozoides viables y normales por debajo del límite mínimo afecta la fertilidad.

2) Método y técnica de inseminación: La fertilidad varía según el método de inseminación. La inseminación intrauterina, proporciona mejores resultados que la inseminación cervical o vaginal, particularmente si se utiliza semen congelado. Al aumentar la profundidad de la inseminación se mejora la fertilidad.

3) Momento de la inseminación: La inseminación practicada demasiado temprano o demasiado tarde, con relación al momento de la ovulación, altera la fertilidad. El tiempo de inseminación es mucho más crítico cuando se utiliza semen refrigerado o congelado que cuando se utiliza fresco, dado que los espermatozoides conservados tienen un período de viabilidad más corto en el aparato reproductor de la hembra.

4) Tipo de estro, natural o controlado: La fertilidad de la oveja, después de la inseminación cervical, es a menudo, más baja cuando se ha sincronizado el estro mediante la utilización de fármacos. El tipo y nivel de tratamiento con fármacos puede afectar la fertilidad.

5) Edad de las hembras: Generalmente, la fertilidad es más baja en las hembras jóvenes o primíparas que en los animales maduros.

6) Factores estresantes: La poca atención o un manejo inadecuado de las hembras durante la inseminación o en el momento de establecerse la gestación, puede afectar la fertilidad.

7) Mortalidad embrionaria o fetal: El estrés ambiental o nutricional, o las enfermedades, durante la gestación pueden afectar la mortalidad embrionaria o fetal.

8) Higiene: El manejo descuidado o la contaminación del equipo puede reducir, notablemente, la viabilidad de los espermatozoides o propagar las enfermedades del aparato reproductor.

Estos mismos autores sostienen que hace relativamente poco tiempo el semen de carnero congelado y conservado estaba limitado a los programas de investigación de I.A.

Esto se debía a los bajos coeficientes de corderos obtenidos tras la aplicación del semen congelado en el cérvix.

Aparentemente la fertilidad relativamente baja del semen congelado, después de la inseminación cervical, está relacionada con la reducida viabilidad de los espermatozoides congelados - descongelados. Existen muchas dificultades para obtener suficiente población de espermatozoides viables en el cérvix y su transporte a través de éste y del útero para llegar al oviducto. En último caso son pocos los espermatozoides viables y/o sin dañar que son capaces de llegar al lugar de fertilización, por lo que la fertilidad se ve muy disminuida (Evans y Maxwell, 1990).

Coincidiendo con estas afirmaciones, Azzarini (1991) estableció que lamentablemente el uso de estas técnicas ha estado limitado en la especie ovina debido a los bajos índices de fertilidad que habitualmente se logran cuando el semen, luego de descongelado, es depositado en el cuello uterino (cérvix) de la oveja, accediendo al mismo por vía vaginal.

Durán del Campo (1980) sostiene que es evidente que la fertilidad del semen de carnero, es aproximadamente 20 a 25 % inferior a la del semen congelado de toro y que en los bovinos, a través del método recto vaginal, el semen puede introducirse profundamente en el cérvix o en el útero, mientras que en los ovinos, el mismo no puede ir más allá de la entrada del cérvix.

Azzarini (1991) haciendo referencia a investigadores australianos, determinó que el cérvix de la oveja constituía una barrera importante y muy eficaz para bloquear el paso de los espermatozoides que habían sido sometidos al proceso de congelamiento.

Wu Arthur (citado por Durán del Campo, 1980), demuestra que la posibilidad de congelación del espermatozoide difiere según la especie, lo cual se debe seguramente a diferencias en la estructura de su propia membrana y a la presencia o ausencia de una cápsula post-nuclear.

Por su parte Jones (citado por Durán del Campo, 1980) realizó un estudio con semen de toro, carnero y cerdo, a los efectos de verificar que posibilidad de cambios estructurales podía existir en los espermatozoides antes y después de la congelación. Dicho autor llega a la conclusión de que la membrana que cubre el acrosoma es sumamente sensible y en el caso del espermatozoide de carnero, lo es mucho más aún que en el toro. Los resultados pobres obtenidos congelando el semen de carnero, son atribuidos por varios investigadores a su reducida viabilidad en el tracto de la oveja.

Para el caso de que se utilice la inseminación cervical con semen congelado y según Evans y Maxwell (1990), la problemática de la fertilidad puede soslayarse por:

- 1) Aumentar la profundidad de la inseminación en el cérvix.

2) Utilización de semen que contenga una alta concentración de espermatozoides móviles.

En lo que respecta al primer caso, se han intentado desarrollar numerosas técnicas que permitan de una forma u otra aumentar los índices de fertilidad. Los investigadores soviéticos, han puesto mucho esfuerzo en lo relacionado con la profundidad de la inseminación, llegando a obtener un corderaje de 60 a 65 % después de colocar el semen a una profundidad de 2,5 a 3,0 centímetros dentro del cérvix, mediante el uso de pipeta helicoidal, no obstante este tipo de pipeta no es fácil de usar y solo puede ser utilizada en una pequeña proporción de animales (Evans y Maxwell, 1990).

Estos mismos autores también consideran, como forma de mejorar el transporte de los espermatozoides en el aparato genital de las hembras, tratar las ovejas en el momento de la inseminación con oxitocina, prostaglandina o estímulo eléctrico, con la finalidad de aumentar las contracciones uterinas, no habiéndose constatado éxito en la aplicación de esta tecnología. La aplicación de relaxina o cocaína para relajar el cérvix, a fin de permitir una deposición del semen a mayor profundidad, tampoco ha dado resultados satisfactorios.

Considerando el efecto positivo de la prostaglandina intramuscular sobre la contractibilidad del útero y cérvix y su consecuente efecto sobre el transporte espermático, Gustafsson (citado por Durán del Campo, 1980) agregaron al semen previo a la congelación 300 microgramos de aquella por ml de semen diluido, logrando notoria mejoría en el índice de preñez. En Uruguay, Castrillejo y col. (citado por Durán del Campo, 1980) trabajando con semen fresco diluido 1 en 1 más 10 microgramos de prostaglandina por dosis, lograron aumentar un 13 % la fertilidad.

Recientemente se ha encontrado una solución práctica al problema de obtener buenos índices de fertilidad con semen congelado de carnero. La misma consiste en la aplicación de la técnica de inseminación intrauterina con la ayuda de laparoscopia (Evans y Maxwell, 1990). Este método se ha hecho rutinario en Australia para inseminar ovejas con semen congelado-descongelado, no obstante esta técnica no ha alcanzado mayor difusión en nuestro país.

En lo que respecta a la concentración de espermatozoides, Evans y Maxwell (1990) consideran que es necesario utilizar una dilución baja antes de la congelación y una buena reanimación al momento de descongelar el semen o bien reconcentrar mediante centrifugación del semen descongelado.

Totalmente coincidente con estas afirmaciones, Durán del Campo (1980) demuestra la clara necesidad del establecimiento de una buena población de espermatozoides en el cérvix, de donde se desprende la conveniencia de la técnica de centrifugación.

Autores escandinavos (Olafsson, 1980) han publicado buenos resultados de fertilidad con semen de carnero congelado con un diluyente a partir de leche y que en su procesamiento requiere la centrifugación del semen para separar el plasma seminal.

Watson (1995) propuso como una explicación de los pobres resultados que se obtienen con semen congelado, que el procesamiento del semen significa una interrupción de las transformaciones que sufre el espermatozoide desde su pasaje por el epidídimo hasta la fertilización. Luego de la descongelación los espermatozoides deberían continuar dichas transformaciones, pero las alteraciones sufridas a nivel de membrana durante el procesamiento de los espermatozoides provocan cambios que determinan una rápida capacitación de los mismos (Maxwell y Watson, 1996). Esto hace que los espermatozoides estén prontos para la fertilización antes de estar en contacto con los ovocitos y que cuando se encuentran con ellos ya hallan perdido su poder fecundante. Esto también estaría de acuerdo con los buenos resultados obtenidos con la IA intrauterina ya que la misma evitaría todo el pasaje de los espermatozoides por el tracto de la hembra, alcanzando a los ovocitos en un momento más oportuno. La centrifugación del semen posiblemente permita regular más adecuadamente estos procesos. Podría volver a agregarse plasma seminal en el momento de la descongelación como una forma de demorar la capacitación espermática.

Por estos motivos es sumamente interesante investigar sobre las posibilidades de centrifugar al semen de carnero durante su procesamiento y las consecuencias de dicha metodología.

III. MATERIALES Y METODOS

A. LOCALIZACION Y ANIMALES.

El trabajo se realizó en la Facultad de Agronomía, Montevideo (35° LS). Se utilizaron tres carneros adultos, andrológicamente sanos, y previamente entrenados a servir la vagina artificial (VA), de la raza Merino Australiano. Los animales se mantuvieron pastoreando bajo fotoperíodo natural durante el ensayo.

A cada carnero se le colectaron nueve eyaculados utilizando la técnica de VA durante dos meses (marzo y abril).

B. MANEJO DEL SEMEN.

Antes de la extracción, se preparaban los diluyentes 1 (leche, yema de huevo y antibióticos), 2 (leche, yema de huevo, glicerol, fructosa y antibióticos) y 3 (mezcla de 1 más 2) (por más información ver el apéndice I). Estos últimos se ponían en el cuarto frío a una temperatura promedio de 5°C. El Baño María se programaba para mantener una temperatura constante de 35 °C y en él se colocaba el diluyente 1. En el baño María, también eran colocados tres tubos identificados, uno para cada carnero, donde se procedía a diluir el semen.

Inmediatamente después de cada colección, se registraba el volumen del eyaculado, se evaluaba la motilidad progresiva y se tomaba una muestra para determinar la concentración espermática. Luego se colocaba el semen en los tubos anteriormente mencionados donde se procedía a iniciar la dilución, agregando diluyente 1 hasta completar 7,5 ml. La motilidad progresiva se evaluó en semen diluido con el diluyente 1 en un microscopio con contraste de fase (Leitz Dialux 20) a 400 x usando platina caliente (37°C). La evaluación fue realizada por el mismo técnico durante todo el ensayo. La motilidad progresiva se expresó en porcentajes en una escala de 10 en 10. La concentración espermática se estimó por el método de hemocitómetro (López y Valencia, 1982). Solo se utilizaron eyaculados con un mínimo de 60% de motilidad progresiva y de 0,5 ml de volumen.

Terminada la primera dilución, los tubos se enfriaban hasta alcanzar 5° C. La temperatura era descendida a razón de 2° C cada tres minutos, mediante inmersión de los tubos en vasos de plástico conteniendo agua a diferentes temperaturas (37, 35, 33 etc. hasta llegar a 5°C).

Una vez alcanzada la temperatura indicada (5° C), el semen diluido era llevado al cuarto frío. En ese lugar, se realizaba la segunda dilución mediante agregado de diluyente 2

hasta completar un volumen final de 15 ml. En esas condiciones, el semen era mantenido durante dos horas.

Una vez transcurrido este periodo se procedía a tomar tres alícuotas de cada eyaculado, las cuales eran centrifugadas a 3 velocidades diferentes: 700 G, 1500 G, y 2500 G durante 10 minutos. Para ello, las alícuotas eran colocadas en tubos eppendorf de 2,5 ml y llevadas a una centrifuga refrigerada a 5°C.

Finalizada la centrifugación, se extraía el sobrenadante y se agregaba a cada pellet (el remanente) 2 ml de diluyente 3. Posteriormente, se llenaban tres pajuelas de 0,25 ml por carnero y por tratamiento (total: 9 pajuelas por carnero). El proceso de congelación se realizaba mediante tres pasos: primero las pajuelas eran colocadas en vapor de nitrógeno líquido (NL) a 14 cms. del nivel del mismo por espacio de 2 minutos; segundo se disminuía la altura a 2 cms. del nivel de NL y las pajuelas permanecían a esa altura durante 3 minutos; tercero y último se procedía a la inmersión de las pajuelas en NL.

La descongelación de las pajuelas se realizó mediante inmersión en agua a 37°C durante 20 segundos. En el semen congelado-descongelado se evaluó la motilidad progresiva con el mismo procedimiento que se usó con el semen fresco. El porcentaje de acrosomas intactos y anomalías de colas, fueron evaluados utilizando una gota de semen fijada con formol salino y aplastada con cubreobjetos. Las preparaciones se observaban con microscopio de contraste de fase, sin ninguna coloración. En cada preparado se contaron 100 espermatozoides. Las evaluaciones fueron realizadas por el mismo técnico durante todo el ensayo. En cada pajuela, se estimó también, la concentración espermática utilizando el hemocitómetro. Esto hizo posible estimar el número de espermatozoides que se perdían en el sobrenadante después de la centrifugación a las tres velocidades utilizadas.

C. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS ESTADISTICO.

Considerando que de cada eyaculado se utilizó una alícuota para cada tratamiento, el diseño experimental fue parcelas divididas. Los datos fueron analizados utilizando análisis de varianza para medidas repetidas. Se estudiaron los efectos de la velocidad de centrifugación, macho y día de la congelación o eyaculado y la interacción macho y día de congelación. La variación entre machos dentro de tratamientos fue incluida dentro del error experimental cuando los tratamientos (velocidad de centrifugación) fueron comparados.

Cuando el tratamiento fue significativo, las medias fueron separadas utilizando el método de diferencia mínima significativa ($P < 0,05$). Los análisis fueron realizados utilizando SAS 6,08 (Statistical Analysis System Institute, 1993, procedimiento PROC GLM). Los resultados se expresan en medias \pm d.e.

IV. RESULTADOS

En los cuadros 1 y 2 se presentan las medias y desviaciones estándar (DE) de los volúmenes de los eyaculados obtenidos por macho y por día de colección, respectivamente.

CUADRO N° 1 Volumen (ml) de los eyaculados por carnero.

CARNERO	N° OBS.	MEDIA	DE
1	9	0,77	0,13
22	9	0,74	0,17
110	9	0,87	0,18

CUADRO N° 2 Volumen (ml) de los eyaculados por día de colección.

DIA	N° OBS.	MEDIA	DE
8 de marzo	3	1,10	0,15
11 de marzo	3	0,93	0,13
12 de marzo	3	0,70	0,09
14 de marzo	3	0,73	0,05
15 de marzo	3	0,67	0,05
16 de marzo	3	0,63	0,05
18 de marzo	3	0,87	0,13
20 de marzo	3	0,73	0,05
7 de abril	3	0,77	0,10

La motilidad progresiva del semen fresco por macho y por día de colección se muestra en los cuadros 3 y 4, respectivamente. Uno de los carneros (1) tuvo sistemáticamente menor motilidad progresiva que los otros dos animales utilizados a lo largo del ensayo.

CUADRO N° 3 Motilidad progresiva (%) de los eyaculados por carnero.

CARNERO	N° OBS.	MEDIA	DE
1	9	70,0	0
22	9	82,2	4,2
110	9	82,2	4,2

CUADRO N° 4 Motilidad progresiva (%) de los eyaculados por día de colección.

DIA	N° OBS.	MEDIA	DE
8 de marzo	3	83,3	10,0
11 de marzo	3	80,0	8,7
12 de marzo	3	76,7	5,0
14 de marzo	3	76,7	5,0
15 de marzo	3	76,7	5,0
16 de marzo	3	76,7	5,0
18 de marzo	3	76,7	5,0
20 de marzo	3	76,7	5,0
7 de abril	3	80,0	8,7

En los cuadros 5 y 6 se presentan las medias y DE de las concentraciones espermáticas de los eyaculados obtenidos por macho y por día de colección, respectivamente.

CUADRO N° 5 Concentración espermática (millones de espermatozoides /ml) de los eyaculados por carnero.

CARNERO	N° OBS.	MEDIA	DE
1	9	4623,0	1024,7
22	9	5817,8	2132,3
110	9	6644,4	1152,1

CUADRO N° 6 Concentración espermática (millones de espermatozoides /ml) de los eyaculados por día de colección.

DIA	N° OBS.	MEDIA	DE
8 de marzo	3	5186,7	477,9
11 de marzo	3	7333,3	3187,0
12 de marzo	3	4153,3	738,2
14 de marzo	3	5866,7	812,7
15 de marzo	3	4968,9	680,8
16 de marzo	3	4666,7	1611,6
18 de marzo	3	6226,7	845,9
20 de marzo	3	7013,3	1532,2
7 de abril	3	5840,0	1264,8

En los cuadros 7 y 8 se presenta el ANVA para motilidad progresiva del semen en pajuelas congeladas- descongeladas.

CUADRO N° 7

MODELO	
Pr>f	0,001
R2	0,737
CV(%)	33,8
MEDIA	20,7

CUADRO N° 8

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	Pr>f
CARNERO	2	0,0718
DIA	8	0,0001
CARNERO*DIA	16	0,0001
TRATAMIENTO	2	0,1066

En los cuadros 9 y 10 se presenta el ANVA para porcentaje de daño acrosómico.

CUADRO N° 9

MODELO	
Pr>f	0,0014
R2	0,580
CV(%)	8,63
MEDIA(%)	71,5

CUADRO N° 10

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	PR>f
CARNERO	2	0,5296
DIA	8	0,0148
CARNERO*DIA	16	0,0017
TRATAMIENTO	2	0,2376

En los cuadros 11 y 12 se presenta el ANVA para porcentaje de colas deformadas del semen en pajuelas congeladas-descongeladas.

CUADRO N° 11

MODELO	
Pr>f	0,013
R2	0,585
CV(%)	36,4
MEDIA	15,0

CUADRO N° 12

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	Pr>f
CARNERO	2	0,7155
DIA	8	0,0529
CARNERO*DIA	16	0,0005
TRATAMIENTO	2	0,2964

En los cuadros 13 y 14 se presenta el ANAVA para concentración espermática (millones/ml) en pajuelas congeladas-descongeladas.

CUADRO N°13

MODELO	
Pr>f	0,0001
R2	0,886
CV(%)	12,76
MEDIA	79,22

CUADRO N° 14

FUENTE	GRADOS DE LIBERTAD	Pr>f
CARNERO	2	0,0001
DIA	8	0,0001
CARNERO*DIA	16	0,0001
TRATAMIENTO	2	0,00221

En los cuadros 15 y 16 se presentan las medias y desviaciones estándar (DE) de las motilidades progresivas del semen en pajuelas congeladas-descongeladas obtenidas por machos y por día de colección, respectivamente.

CUADRO N° 15 Motilidad progresiva del semen congelado-descongelado (%) por macho.

CARNERO	N° OBS.	MEDIA	DE
1	27	19,44	10,13
22	27	19,44	10,59
110	27	23,33	12,17

CUADRO N°16 Motilidad progresiva del semen congelado-descongelado(%) por día de colección.

DIA	N° OBS.	MEDIA	DE
8/3	9	20,56	14,24
11/3	9	15,56	12,61
12/3	9	17,78	6,67
14/3	9	30,56	11,84
15/3	9	15,00	7,07
16/3	9	24,44	6,35
18/3	9	28,33	13,23
20/3	9	18,89	7,41
7/4	9	15,56	6,82

En los cuadros 17 y 18 se presentan las medias y desviaciones estándar del daño acrosómico (%) del semen en pajuelas congeladas-descongeladas obtenidas por macho y por día, respectivamente.

CUADRO N° 17 Daño acrosómico (%) del semen congelado-descongelado por macho.

CARNERO	N° OBS.	MEDIA	DE
1	27	72,56	5,79
22	27	70,93	8,93
110	27	70,89	8,20

CUADRO N° 18 Daño acrosómico (%) del semen congelado-descongelado por día de colección.

DIA	Nº OBS.	MEDIA	DE
8/3	9	66,22	6,74
11/3	9	77,67	3,77
12/3	9	69,00	12,12
14/3	9	69,33	6,18
15/3	9	71,78	10,50
16/3	9	72,00	6,89
18/3	9	75,11	5,01
20/3	9	71,33	6,56
7/4	9	70,67	4,44

En los cuadros 19 y 20 se presentan las medias y desviaciones estándar de las colas deformadas (%) del semen en pajuelas congeladas-descongeladas obtenidas por macho y por día de colección, respectivamente.

CUADRO N° 19 Anormalidades de colas (%) en el semen congelado-descongelado por macho.

CARNERO	Nº OBS.	MEDIA	DE
1	27	14,33	5,05
22	27	15,52	7,63
110	27	15,19	7,76

CUADRO N° 20 Anormalidades de colas (%) en el semen congelado-descongelado por día de colección.

DIA	Nº OBS.	MEDIA	DE
8/3	9	18,56	7,38
11/3	9	11,00	3,94
12/3	9	18,67	11,26
14/3	9	15,33	5,45
15/3	9	14,00	8,22
16/3	9	16,44	6,64
18/3	9	11,89	4,23
20/3	9	15,11	6,33
7/4	9	14,11	3,33

La motilidad progresiva del semen congelado-descongelado no fue afectada significativamente ($P>0,1$) por los tratamientos (velocidad de centrifugación). La motilidad progresiva del semen descongelado fue afectada significativamente ($P<0,0001$) por el efecto del día de colección y por la interacción entre el macho y el día de congelación.

El porcentaje de acrosomas dañados tampoco fue afectado por la velocidad de centrifugación ($P>0,1$), el porcentaje de colas deformadas no fue afectado por la velocidad de centrifugación ($P>0,1$) pero sí lo fue, por el día de colección ($P=0,05$) y por la interacción entre el macho y el día de colección ($P=0,0005$).

En los cuadros 21 y 22 se presentan las medias y desvíos estándar de la concentración (millones/ml) del semen congelado-descongelado obtenidas por macho y por día de colección, respectivamente.

CUADRO N° 21 Concentración (millones/ml) del semen congelado-descongelado por macho

MACHO	N° OBS.	MEDIA	DE
1	27	68,89	21,17
22	27	92,07	22,55
110	27	76,69	22,76

CUADRO N° 22 Concentración (millones/ml.) del semen congelado-descongelado por día de colección.

DIA	N° OBS.	MEDIA	DE
8/3	9	44,50	14,02
11/3	9	96,50	20,71
12/3	9	59,89	21,23
14/3	9	80,00	10,61
15/3	9	77,56	10,03
16/3	9	78,28	25,57
18/3	9	81,89	14,73
20/3	9	84,23	16,04
7/4	9	110,00	9,74

Los resultados obtenidos con las diferentes velocidades de centrifugación para las variables motilidad progresiva, porcentaje de acrosomas dañados y porcentaje de colas deformadas se observan en los cuadros 23, 24 y 25, respectivamente.

CUADRO N° 23 Motilidad progresiva en el semen congelado-descongelado (%) utilizando tres velocidades distintas de centrifugación.

VELOCIDAD DE CENTRIFUGACION	N° OBS.	MEDIA	DE
700G	27	18,89	12,04
1500G	27	22,96	10,76
2500G	27	20,37	10,18

CUADRO N° 24 Acrosomas dañados en el semen congelado-descongelado (%) por tratamiento utilizando tres velocidades distintas de centrifugación.

VELOCIDAD DE CENTRIFUGACION	N° OBS.	MEDIA	DE
700G	27	69,81	8,23
1500G	27	72,04	6,50
2500G	27	72,52	8,25

CUADRO N° 25 Anormalidades de cola en el semen congelado- descongelado (%) utilizando tres velocidades distintas de centrifugación.

VELOCIDAD DE CENTRIFUGACION	N° OBS.	MEDIA	DE
700G	27	16,26	7,05
1500G	27	13,93	6,02
2500G	27	14,85	7,47

Por su parte, la concentración espermática en las pajuelas congeladas-descongeladas se vio afectada por las distintas velocidades de centrifugación utilizadas ($P < 0,03$). Cuando el semen fue centrifugado a 700G, un mayor número de espermatozoides se perdió en el sobrenadante y por lo tanto las pajuelas quedaron con una concentración de espermática menor.

CUADRO N° 26 Concentración espermática (millones de espermatozoides / ml) en las pajuelas congeladas-descongeladas utilizando tres velocidades distintas de centrifugación.

VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN	700G	1500G	2500G
N° OBS.	27	27	27
MEDIA	74,59a	81,78b	81,28b
DE	22,99	24,99	24,03

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$)

V. DISCUSION

A los efectos de facilitar la comprensión del proceso de discusión y organizar el mismo, se encaró la misma estableciendo tres puntos fundamentales para el ensayo: motilidad al descongelado, morfología y concentración.

La motilidad al descongelado, con una media de 20,7%, resultó baja, muy por debajo de lo esperado para esta técnica, y de lo publicado por otros autores con la misma técnica de congelación (Söderquist, et al 1997). Sin embargo el resultado obtenido no dista mayormente de los porcentajes de motilidad logrados con otras técnicas, a nivel nacional, e incluso es oportuno resaltar que se obtuvo una motilidad muy similar a la lograda por Aznárez y Menéndez(1994). Cabe resaltar que las condiciones e infraestructura, donde se realizó el ensayo, no permitieron un perfecto ajuste de la técnica, lo que seguramente actuó desfavorablemente sobre los resultados logrados.

La utilización de velocidades de congelación mejor controladas y el ajuste de algunos detalles durante la preparación de los diluyentes permitió incrementar considerablemente los porcentajes de motilidad progresiva del semen descongelado en el mismo laboratorio, posteriormente a la realización de este ensayo. Los resultados de motilidad obtenidos no afectarían a los efectos de la evaluación de las diferentes velocidades de centrifugación que se realizó en este experimento.

De acuerdo con los resultados de este experimento, la motilidad al descongelado fue influenciada por el efecto día y la interacción macho - día, no detectándose efecto de las variables independientes tratamiento y macho. Se deduce que efectos ambientales de diferente índole podrían explicar estos resultados debido a que la técnica aún no ha sido estandarizada.

Los sementales fueron tratados de igual forma a lo largo de todo el periodo, sin que se hubieran detectado problemas sanitarios, y además la corta duración del ensayo (30 días) determina que no se puedan atribuir las diferencias de motilidad a efectos estacionales.

La variable analizada no fue afectada por el macho ni por los diferentes tratamientos de centrifugación estudiados.

De los cuadros 9 y 11 se desprende que las medias para las variables porcentaje de acrosomas dañados y porcentaje de espermatozoides con colas deformadas, resultaron 71,5% y 15,0% respectivamente. El elevado porcentaje de acrosomas dañados está muy lejano de los resultados obtenidos por Söderquist et al (1997) que obtuvo entre 30 y 35%. Este resultado hace pensar en que no se podría esperar buenos resultados de preñez con el semen congelado de esta forma. Debe considerarse lo ya expresado en el sentido de las dificultades encontradas para ajustar la técnica y el incremento en la recuperación espermática obtenido con posterioridad a este experimento.

La variable independiente día mostró efecto significativo sobre las mencionadas anteriormente. Estos datos, y al igual que sucedió con la variable anterior, pueden ser explicados en parte por efectos ambientales no identificados.

Las variables macho y tratamiento no expresaron ningún efecto sobre la variable en estudio, de esto se desprende que los diferentes sementales no mostraron daños morfológicos entre los distintos eyaculados para cada día y que las diferentes velocidades de centrifugación tampoco afectaron los resultados obtenidos. Esto estaría indicando que aún velocidades de centrifugación de 2500g no afectaron significativamente la morfología espermática y que por lo tanto, por lo menos en lo que se refiere a esta variable, no habría inconveniente en utilizar los referidos tratamientos.

La variable concentración al descongelado, tiene una media de 79,22 millones por ml según se expresa el cuadro 13. La misma resultó afectada por las variables día, macho e interacción macho*día, resultando para las mismas altamente significativo.

Por su parte los diferentes tratamientos afectaron la variable en consideración en forma significativa, lo que nos permite deducir que las distintas concentraciones logradas responden, entre otras cosas, a las diferentes velocidades de centrifugación.

Las medias obtenidas para los tratamientos 1, 2 y 3 fueron de 74,59(millones/ml), 81,78(millones/ml.) y 81,28(millones/ml), respectivamente. Esto coincide con lo esperado, donde velocidades mayores permiten una mayor recuperación espermática: si bien las mismas no fueron suficientes y los bajos valores obtenidos son como consecuencia de las elevadas pérdidas de los mismos al desechar los sobrenadantes, (las mismas oscilaron entre 37,56% y 93,78%, con una media de 69,87%).

Es conveniente resaltar que de acuerdo con las concentraciones logradas no se estaría cumpliendo con uno de los objetivos del presente trabajo, en el sentido que la centrifugación no permitió una adecuada recuperación de espermatozoides para viabilizar la técnica y mejorar los porcentajes de preñez con I.A. cervical, que justifiquen su uso a nivel comercial permitiendo capitalizar los beneficios de la misma. Las concentraciones obtenidas no son suficientes ni para ser utilizadas en I.A. intrauterina, donde de acuerdo al máximo volumen posible de ser utilizado por cuerno(0,10ml) y el mínimo nº de espermatozoides móviles requeridos (20 millones) debería obtenerse concentraciones mínimas de 200 millones de espermatozoides móviles/ ml.

Para cumplir con el objetivo planteado de viabilizar la técnica de I.A. cervical atendiendo al máximo volumen que puede retener el cérvix (0,20 ml) y al mínimo nº de espermatozoides móviles necesarios para tener éxito(180 millones) deberían obtenerse concentraciones mínimas de 900 millones de espermatozoides móviles/ ml. Contrastando con esto y de acuerdo a la motilidad media obtenida en el presente trabajo tan sólo se estarían obteniendo concentraciones medias de 16,40 millones de espermatozoides móviles /ml. Por lo que sería necesario ensayar velocidades de centrifugación superiores u

otras alternativas, para tratar de reducir el porcentaje de pérdida de espermatozoides, siempre que dichas modificaciones no dañen significativamente a los espermatozoides.

Por otro lado, sumado a la posibilidad incierta de poder utilizar mayores velocidades de centrifugación, para el logro de pajuelas con mayor concentración espermática, se debería reducir el volumen de diluyentes a agregar al semen fresco y a los pelets (resultantes de la centrifugación y desecho de los sobrenadantes en el semen enfriado); teniendo en cuenta para ello, el n° de hembras a servir, la concentración de los eyaculados, el volumen de los mismos y el tipo de inseminación a practicar.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de movilidad al descongelado obtenidos fueron inferiores a lo esperado (media =20,7%), no viéndose afectada esta variable por las diferentes velocidades de centrifugación utilizadas en el experimento.

Se verificaron importantes daños acrosómicos, según confirma la media para dicha variable (71,5%), para las tres velocidades de centrifugación utilizadas (700G, 1500G y 2500 G) no existiendo diferencias significativas entre los tratamientos empleados.

La variable tratamiento solamente resultó significativa para explicar la concentración al descongelado, obteniéndose diferencias entre los tratamientos 1 y 2 y entre los tratamientos 1 y 3, sin que se detectaran diferencias entre los tratamientos 2 y 3; esto concuerda con lo esperado, donde las velocidades mayores de centrifugación permitirían una mayor recuperación de espermatozoides en el pelét. Sin embargo las mismas no fueron suficientes y se produjeron pérdidas en los sobrenadantes que oscilaron entre 37,56% y 93,78% con una media de 69,87%, por lo que sólo se obtuvo pajuelas con una concentración espermática media de 79,22 millones /ml. Por lo expresado anteriormente la técnica empleada no permitió la obtención de pajuelas con una adecuada concentración espermática que justifique su utilización para inseminación cervical.

Cabía la interrogante de si es posible continuar aumentando las velocidades de centrifugación a utilizar sin aumentar los daños espermáticos y reducir la motilidad.

Sumado a esto, la reducción del agregado de diluyentes en el semen fresco y en los pellets (remanentes del semen enfriado y centrifugado) contribuirá al logro de pajuelas más concentradas.

VII. RESUMEN

En el experimento se planteó la técnica de centrifugación, mediante la utilización de tres velocidades con el fin de lograr una alta concentración de espermatozoides móviles a nivel del cérvix, como forma de incrementar los bajos niveles de fertilidad obtenidos con este tipo de inseminación empleando semen congelado.

Para lo cual se centrifugaron muestras a 700, 1500 y 2500 G, con el objetivo de detectar diferencias en:

- ◆ Concentración de espermatozoides en el semen(%) - Las diferencias en este punto se deberían a que las velocidades mayores determinarían una mayor concentración de espermatozoides en el pelet, reduciéndose las pérdidas de espermatozoides al desechar el sobrenadante; determinando por lo tanto una mayor concentración de espermatozoides en el semen congelado-descongelado.
- ◆ Espermatozoides con acrosomas dañados(%) - Cabría esperar mayor daño acrosómico con la utilización de altas velocidades de centrifugación.
- ◆ Anormalidades de cola(%)
- ◆ Motilidad progresiva de los espermatozoides en el semen congelado-descongelado(%).

De estas cuatro variables que se evaluaron, únicamente se encontró diferencias significativas en concentración de espermatozoides en el semen ($P=0.0221$), observándose los valores mayores para las velocidades de centrifugación más elevadas (1500 y 2500G).

Si bien estas velocidades de centrifugación permitieron obtener pajuelas con una mayor concentración espermática, las mismas son consideradas muy bajas (81,78 millones/ml y 81,28 millones/ml), respectivamente y por lo tanto no permitirían obtener buenos resultados con inseminación cervical. Esto se debe a que la recuperación espermática con cualquiera de las velocidades utilizadas fue muy pobre, desechándose un porcentaje muy elevado de los espermatozoides en el sobrenadante. Cabría la interrogante, de si es posible utilizar velocidades mayores intentando obtener concentraciones más elevadas sin que esto perjudique la motilidad progresiva y produzca mayores daños espermáticos.

Como forma adicional para la obtención de pajuelas más concentradas, debería reducirse el volumen de diluyentes a agregar al semen fresco y a los pelets (resultantes de la centrifugación y desecho de los sobrenadantes en el semen enfriado).

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. AHMAD, K., FOOTE R.H. Y KAPROTH, M. 1987. Postthaw motility, acrosomal integrity and fertility of antibiotic - treated frozen bull spermatozoa. *Theriogenology* 27 (6): 923 - 930.
2. ACUÑA, R.P. 1982. Evaluación de los diluyentes para congelar semen de borrego Peliebuey, Tesis de Licenciatura, México FES-C UNAM.
3. AZZARINI, M. 1991. Tecnologías disponibles para modificar la reproducción de los ovinos. Primera Parte. *Revista Agropecuaria (Uruguay). Bovinos - Ovinos - Pasturas*, 7: 87 - 101.
4. AZZARINI, M. 1992. Reproducción en ovinos en América Latina. *Producción Ovina*, Secretariado Uruguayo de la Lana. Departamento de Investigación de la Producción Ovina, 5: 7 - 56.
5. AZZARINI, M y PONZONI, R. 1979. Aspectos modernos de la producción ovina. Primera contribución. Uruguay, Paysandú. E.E.M.A.C.
6. COLAS, G. 1975. Effects of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 42: 277-285.
7. COLAS, G., COUROT, 1977. Storage of ram semen. *Sheep breeding*. Butterwrths. Tomes, D.E. Robertson y R.J. Lightfoot.
8. COLAS, G. 1979. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. *Livestock Production Science* 6: 153-160.
9. CORDOBA SOTO, M.I. 1987. Comparación de dos diluyentes diferentes para inseminación artificial en ovejas. *Veterinaria México*. 18 (4): 376.
10. CURIEL, G.B. y MENDEZ, J. V. 1981. Acción del sulfoxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. *Veterinaria México*. 12 (4): 211 - 216.
11. DAS, K.K. and RAJKONWAR, C.K. 1994. Morphological changes of acrosome at different estafes of buck semen during freezing with fructose egg yolk glycerol extender. *Indian Journal of Agriculture Research* 15 (1): 67-70.
12. DEKA, B.C. and RAO, A.R. 1986. Effect of glycerol level in Tris - based extender and equilibration period on quality of frozen goat semen. *Theriogenology* 26 (2): 231 - 238.

13. DEKA, B.C. and RAO, A.R. 1987. Effect of cooling time on quality of frozen goat semen. *Indian Journal of Agriculture Research* 8 (1): 25-27.
14. DEKA, B.C. and RAO, A.R. 1987. Effect of extenders and thawing methods on post thawing preservation of goat semen. *Indian Veterinary Journal* 64: 591-594.
15. DURAN DEL CAMPO, A. 1980. Anatomía y Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur.
16. DURAN DEL CAMPO, A. 1995. Manual práctico de reproducción e inseminación artificial en ovinos. Montevideo, Hemisferio Sur.
17. DZIUK, P.J., EWIS, J.M. GRAHAM, E.F. and MOYER, R.H. 1972. Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at appointed time in the ewe. *University of Illinois Journal of Animal Sciences*, 35 (3): 572.
18. ENTWISTLE, K.W. and MARTIN, I.C.A. 1972. Effects of composition of diluent, method of addition of glycerol, freezing rate and storage temperature on the revival of ram spermatozoa after deep-freezing. *Australian Journal Biol. Science*, 5: 379.
19. EVANS, G. y MAXWELL, W.M.C. 1990. Steven Salamon Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza. ACRIBIA
20. FERNANDEZ ABELLA, D., ABELLA, O., RODRIGUEZ PALMA, R. y ZANOTTA, G. 1992. Efecto de la dosis, la dilución y la conservación del semen en la fertilidad obtenida con inseminación cervical. *Boletín Técnico de Ciencias Biológicas*, 2 (1): 21 - 37. Uruguay. Salto, EEAFS
21. FERNANDEZ ABELLA, D. 1987. Temas de reproducción ovina. Facultad de Agronomía. Uruguay. Salto. EEAFS.
22. FERNANDEZ ABELLA, D. 1993. Principios de fisiología reproductiva ovina. Montevideo, Hemisferio Sur.
23. FIRST, N.L., HENNLMAN H.A., MAGEE W.T; WILLIAMS, J.A. 1961. The frozen storage of ram semen. *Journal Animal Science* 20: 74.
24. FISER, P.S. and FAIRFULL, R.W. 1986. Combined effects of glicerol concentration, cooling velocity and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation ram spermatozoa. *Theriogenology* 25 (3): 473 - 483.
25. FISER, P.S., AINSWORTH, L. and FAIRFULL, R.W. 1987. Evaluation of a new diluent and diferent processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 28 (5): 599 - 607.

26. FISER, P.S. and FAIRFULL, R.W. 1983. Influence of glycerol concentration and cooling rate on survival of ram sperm frozen in straws. *Cryobiology* 20, Abs: 160.
27. FOOTE, R.H. 1970. Influence of extender, extension rate and glycerolation technique on fertility of frozen bull semen. *J. Dairy Science* 53 (10): 1478.
28. FUKUI, Y. 1979. Effects of different diluents, thawing temperatures and materials of thawing containers on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Journal Animal Reproduction* 25: 160.
29. GONZALEZ, G. Y MENDEZ, V. 1990. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajilla francesa de 0,25 ml y descongelado a diferentes ritmos de temperatura. Tesis. Veterinaria México 21 (3): 344.
30. GRAHAM, E.F., CRABO, B.G. and PACE, M.M. 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *Journal of Animal Science*, 47 supl II: 80 - 118.
31. JOHNSON, L. 1974. Optima of glycerol, iris and thaw rate in freezing ram semen. *Journal of Animal Science* 39: 213.
32. JONES, R.C. 1969. Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep frozen ram spermatozoa. *Australian Journal Biol. Science*, 22: 995.
33. LIGHTFOOT, R.J. and SALAMON S. 1970. Fertility ram spermatozoa by the pellet metodo. The effects of dilution, dilution rate, glycerol concentration and duration of storage at 5 °C prior to freezing on survival of spermatozoa. *Australian Journal Biol. Science* 22: 1547.
34. LOPEZ, PEREZ, A. 1987. Evaluación de diferentes técnicas para la congelación de semen ovino. Tesis M. Sc. México. UNAM. Facultad de Estudios Superiores.
35. LOPEZ, A y PEREZ, R 1984. Inseminación artificial en ovinos. Memorias del curso bases de la cría ovina. Toluca. UAEM: 52-58.
36. MARLEY, P.B., MORRIS, S.R. and WHITE, I.G. 1977. Concentration of prostaglandina e and f, fructose and glycerylphosphorylcoline in ram semen obtained by electroeyaculation or artificial vagina and in vesicular fluid. *Theriogenology* 8 (1): 33.
37. MAZUR, P. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. In Conference Animal Reproduction Artificial. (9th, 1980, Madrid, España): 99.

38. ORIZAGA, VAZQUEZ, DEL MERCADO, J.A. 1984. Efecto del congelamiento sobre la movilidad progresiva y la estructura acrosomal del espermatozoide de morueco. *Veterinaria México*. 14 (2): 123.
39. PEACE, M.M. and GRAHAM, E.F. 1974. Components in egg yolk wich protect bovine spermatozoa during freezing. *Journal Animal Science* 39(6): 1144.
40. SALISBURY, G.W., VAN DEMARK, N.L. and LODGE, J.R. 1978. Fisiología de la reproducción e inseminación artificial en los bóvidos. Zaragoza, Acriba.
41. TASSERON, F., AMIR, D. and SCHINDLER, H. 1977. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *Journal Reproduction Fertility*. 51: 461-462.
42. VALENCIA, J., GONZALEZ G., GONZALEZ, M.E. y TREJO, A. 1993. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajuelas de 0,25 y 0 50 ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *Veterinaria México* 25 (2): 127 - 131.
43. VISSER, D. and SALAMON, S. 1973. Fertility of ram spermatozoa frozen in a TRIS-based diluent. *Australian Journal Biol. Science* 26: 513-516.
44. VISSER, D., 1974. Recent Advances in the deep-freeze preservation of ram semen. *Journal of Animal Science* 4: 275-288.
45. URREA, J.E. 1990 Tesis. Efecto del glicerol y ddos técnicas de descongelación sobre la motilidad progresiva y la integridad del acrosoma del espermatozoide de carnero. Tesis. *Veterinaria México* 21 (2): 198.
46. WATSON, P.F. and MARTIN, I.C.A. 1972. A comparision of changes in the acrosomes of deep frozen ram and bull spermatozoa. *Journal Reproduction Fertility* 28: 99.
47. WATSON, P.F. and MARTIN, I.C.A. 1976. Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology* 6 (5): 559-564.
48. WATSON, P.F. and MARTIN, I.C.A. 1976. Artificial insemination of sheep: the fertility of semen extended in diluents containing egg yolk and inseminated soon after dilution or stored at 5 °C for 24 or 48 hours. *Theriogenology* 6 (5): 553 - 558.
49. WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7: 871-891.

APENDICE I

DESCRIPCION DEL DILUYENTE

Solución de leche:

44 gramos de leche en polvo descremada diluidos en 400 ml de agua destilada y calentada a 95 °C por espacio de diez minutos.

Diluyente 1:

220 ml de la solución de leche
12 ml de yema de huevo
0.07 gramos de penicilina
0.1 gramos de estreptomycinina

Diluyente 2:

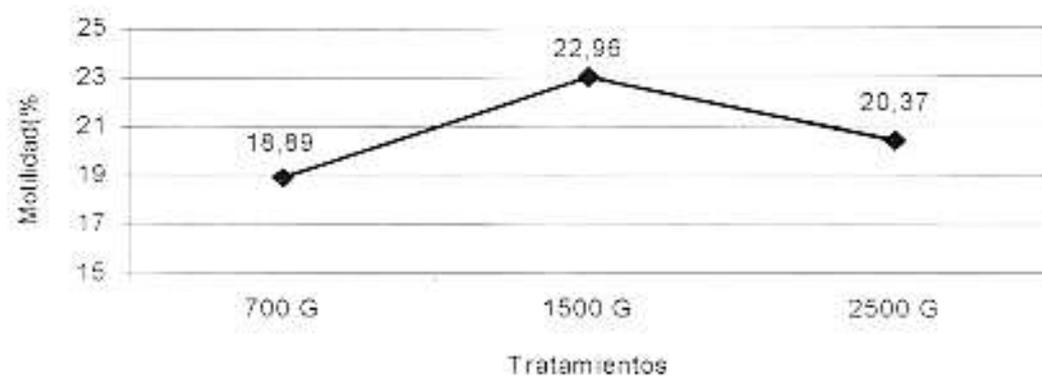
200 ml de la solución de leche
35 ml de glicerol
10 gramos de fructosa
12.5 ml de yema de huevo
0.07 gramos de penicilina
0.1 gramos de estreptomycinina

Diluyente 3:

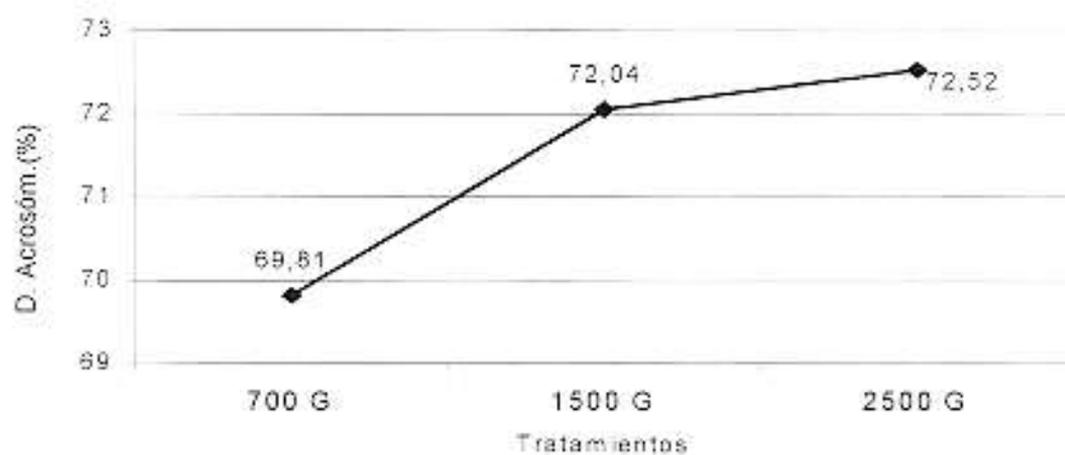
Partes iguales de diluyente uno y dos.

APENDICE 2

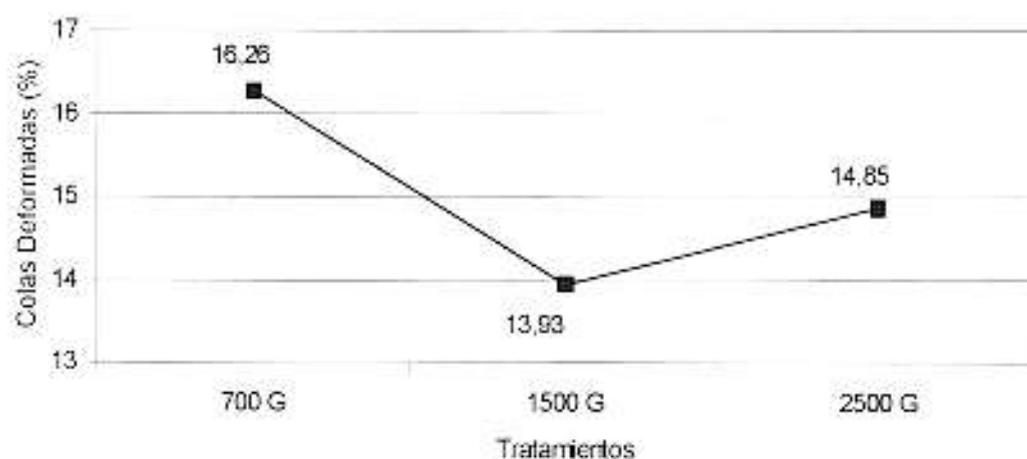
Motilidad según tratamiento



Daño acrosómico según tratamiento



Colas deformadas según tratamiento



Concentración según tratamiento

