



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES – CUAUTITLÁN
PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN EN PRODUCCIÓN DE
OVINOS Y CAPRINOS

CONSERVACIÓN DE SEMEN DE CARNERO EN REFRIGERACIÓN A 5°C EN
UN DILUYENTE ADICIONADO CON MELATONINA COMO ANTIOXIDANTE.

TESINA QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN PRODUCCIÓN DE OVINOS Y CAPRINOS

PRESENTA
PAOLO CÉSAR CANO SUÁREZ

ASESOR
DR. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, MÉXICO. NOVIEMBRE DE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis padres Jesús Cano Aguilar y María Suárez Osornio por siempre apoyar cada una de las decisiones que tome y dar el consejo en cada ocasión en la que así era requerido.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme en sus aulas y darme la oportunidad de continuar con mis estudios de posgrado.

A mi asesor Dr. José Alfredo Medrano Hernández por darme la oportunidad de realizar este trabajo experimental y apoyarme en la realización de mi tesina, a mis sinodales M en C. Rosalba Soto González por su apoyo en el laboratorio y sus comentarios en la revisión del trabajo escrito, al M en C. César Garzón Pérez por la revisión de mi trabajo.

A los profesores que me formaron en la Especialización en Producción de Ovinos y Caprinos, al M en C. Alan Olazábal Fenocho por su apoyo desde que hice el servicio social.

Al Técnico Académico M en C. Francisco Rodolfo González Díaz por la capacitación en las técnicas empleadas en el presente trabajo de tesina, y por su apoyo desinteresado en la realización de este trabajo.

Este trabajo forma parte de la Cátedra de investigación "Reproducción y Etología animal", NCONS-19 del PACIVE.

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Objetivos	17
IV. Materiales y métodos	18
V. Resultados	23
VI. Discusión	28
VII. Conclusiones y recomendaciones	31
VIII. Bibliografía	32
IX. Anexos	41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características del semen de carnero	9
Cuadro 2. Motilidad masal del semen en pequeños rumiantes	11
Cuadro 3. Morfología espermática de carneros	12
Cuadro 4. Valores promedio de las variables del semen fresco de cada macho	23

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Motilidad progresiva de los espermatozoides de carnero sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).	24
Grafica 2. Viabilidad de los espermatozoides de carnero, mediante la tinción Eosina-Nigrosina, sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).	25
Grafica 3. Viabilidad de los espermatozoides de carnero, mediante la prueba del hinchamiento hipo-osmótico (HOST), sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).	26
Grafica 4. Viabilidad de los espermatozoides de carnero, mediante la prueba del hinchamiento hipo-osmótico (HOST), sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).	27

I. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el fin de observar la calidad de semen de carnero refrigerado y diluido en un medio a base de Tris-yema de huevo adicionado con Melatonina como antioxidante. El semen fue colectado de junio a agosto de 2012, de 5 machos ovinos de 18 meses de edad en promedio, éstos fueron alimentados y alojados en el mismo corral, con agua *Ad libitum* el plasma seminal se removió mediante centrifugación, los espermatozoides fueron resuspendidos en un diluyente a base de Tris-yema de huevo, con una concentración de 200×10^6 /mL, se tomaron tres alícuotas del semen diluido en Tris-yema de huevo, cada una de 3.0 mL, enseguida se agregó la Melatonina para tener tres grupos experimentales: uno control y dos experimentales, estos dos últimos con diferentes concentraciones de Melatonina 1mM y 2 mM, respectivamente, los tratamientos se introdujeron en un refrigerador a 5° Centígrados donde permanecieron 48 horas, las variables evaluadas fueron: motilidad progresiva, viabilidad por Eosina-Nigrosina y mediante la prueba del hinchamiento hipo-osmótico (HOST), así como la integridad del acrosoma, en lo que se refiere a motilidad progresiva se observó que a las 48 horas la motilidad de los tratamientos con Melatonina fue mayor que la del grupo testigo ($P < 0.05$), la viabilidad con la prueba del hinchamiento hipo-osmótico a las 48 horas de almacenamiento, mostró que la viabilidad de los tratamientos con Melatonina fue mayor que la del grupo testigo ($P < 0.05$), la integridad del acrosoma de los tratamientos con Melatonina, a las 24 y a las 48 horas de refrigeración, fue mayor que la del grupo testigo ($P < 0.05$), en los grupos con Melatonina no hubo diferencia entre el día 1 y 2, esto significa que la integridad del acrosoma se mantuvo sin cambio en los dos días de refrigeración, los resultados muestran que los espermatozoides de carnero diluidos en un diluyente adicionado con Melatonina tuvieron una mejor supervivencia que los del grupo testigo, después de ser conservados en refrigeración a 5° Centígrados durante 48 horas.

II. INTRODUCCIÓN

A través del tiempo el hombre ha desarrollado diversas actividades que le han permitido alcanzar su subsistencia, dentro de ellas la crianza del ganado ovino constituye parte esencial en el logro de este fin, debido a que representa parte importante en su economía, ya que de este ganado se obtiene carne y leche, componentes fundamentales de la alimentación humana (Arbiza, 1986).

De ahí la importancia de este ganado desde el punto de vista social, ya que representan una fuente de alimento e ingreso para numerosas familias, que tienen acceso a menos de un salario mínimo, encontrándose en las zonas más extremas y pobres; se estima que más de 320, 000 familias participan en esta actividad (Arbiza, 1986).

Por otro lado, la importancia de la ovinocultura es de talla mundial: la producción de carne de ovinos se desarrolla principalmente en China, España, Australia, India y Nueva Zelanda, por nombrar solo a algunos países. Dentro del ámbito mundial, México ocupa el lugar 37, esta actividad se desarrolla dentro de la gran mayoría de los países, principalmente dentro de sistemas de pastoreo. (FAO, 2004).

A los aspectos productivos y reproductivos que engloba esta actividad se suma la comercialización, transformación, distribución y consumo de los productos pecuarios que en su conjunto constituyen los sistemas de producción pecuaria. (Hernández y González., 2010).

La producción ovina en México

México es uno de los diez primeros países ganaderos del mundo; sin embargo, el ganado mexicano enfrenta problemas derivados de la deficiente nutrición, de la sobrepoblación ganadera y en consecuencia sobrepastoreo, y de bajo índice tecnológico de la ganadería ovina que se manifiesta en una baja producción; en cambio en las explotaciones de aves y cerdos se da una situación contraria, con elevados niveles de tecnificación (Hernández, 2010).

La producción de ovejas es una actividad pecuaria que existe en nuestro país desde la época de la conquista española; inicialmente, la producción de ovinos se orientó hacia la obtención de lana para establecer la industria textil (Galina y Guerrero, 1993).

La producción ovina en México se realiza principalmente en el centro sur del país, generalmente se realiza con sistemas de pastoreo tradicionales con escasa tecnología y una productividad limitada (De Lucas *et al.*, 2003).

En México los pequeños rumiantes han estado en manos de los productores más marginados, de bajos recursos económicos y alejados de los recursos de asistencia técnica y tecnología. Sin embargo, en la producción ovina, cada vez es más frecuente el flujo de material financiero, dando origen a una producción pecuaria empresarial muy promisoría. De esta manera, los empresarios echan mano de diferentes tecnologías para aumentar la rentabilidad de la empresa (Andrade, 2007). Los sistemas de producción ovina demandan cada vez más una mayor eficiencia productiva, por lo que se deben optimizar los recursos genéticos, ambientales y de espacio de las explotaciones (De Lucas, 2009).

La producción ovina tiene características regionales: el norte del país basa su producción en ovinos de lana así como de pelo, especializados en producción de carne, se encuentran sistemas de producción tecnificados ocupando por lo general grandes extensiones (De Lucas *et al.*, 2003). Los ovinocultores dedicados a la producción de carne están constituidos, sobre todo, por aquellos que la comercializan en forma de barbacoa, localizados principalmente en el centro del país en los estados de México, Puebla, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala y algunos alejados del altiplano central como Jalisco y San Luis Potosí. Este sistema se caracteriza por un pastoreo con suplemento alimenticio, en los últimos años se han utilizado razas pesadas como la Suffolk, Dorsert y Rambouillet cuyo objetivo es aumentar el tamaño de los corderos con un programa de mejoramiento genético, siendo la principal fuente de ingresos la venta de cordero para abasto (Palma *et al.*, 1995).

La producción de carne de ovino se lleva a cabo principalmente en las regiones tropicales, se realiza mayoritariamente con animales de la raza Pelibuey, alimentados con pastos nativos o introducidos, con una suplementación variable de acuerdo a la época o al productor (Palma *et al.*, 1995).

En nuestro país existe una gran tradición en el consumo de carne de borrego, derivándose de una elevada demanda de la misma tanto en áreas urbanas como

en rurales que en los últimos años a sobrepasado la oferta del nacional (Cruz, 1991).

En los últimos años se ha visto una constante alza en el número de cabezas de ganado ovino desde el año 2001 (6, 164, 757) hasta el 2010 (8, 105, 562) (SAGARPA, 2010). Sin embargo, no se ha podido satisfacer la demanda y en consecuencia se ha hecho necesario importar ovinos de Australia y Nueva Zelanda, debido a que sus sistemas de producción les permiten llegar al mercado nacional a precios bajos (Cruz, 1991; Hernández, 2010; Piña, 2005).

Generalidades de la reproducción ovina

El manejo de la reproducción en los ovinos es esencial tanto para la producción de pie de cría, como para cordero para abasto y lana. Para lograr cualquiera de estos propósitos, es fundamental tener una adecuada eficiencia reproductiva (Alonso, 1981).

La eficiencia reproductiva depende de la tasa de concepción (fecundidad), la tasa de nacimientos (fertilidad) y el número de corderos nacidos por cada 100 hembras. En regiones templadas las ovejas son poliéstricas estacionales de modo que sus crías nacen en la época más favorable del año, la primavera. La estacionalidad reproductiva está regida por el fotoperiodo, esta actividad estrual comienza cuando los días se hacen más cortos (Hafez, 2000; De Lucas *et al.*, 2008), en zonas tropicales en donde las variaciones son menos marcadas las ovejas tienden a reproducirse todo el año (Castillo *et al.*, 1972; Valencia *et al.*, 1981; Cruz *et al.*, 1994; Hafez, 2000).

En la oveja, el inicio de la pubertad está influida por factores genéticos y ambientales tales como la raza, el nivel de nutrición y la época de nacimiento; la edad promedio es entre los seis y nueve meses. La mayor parte de la población mundial de ovejas se encuentran en condiciones de pastoreo por lo que su apareamiento es en forma natural en una relación de 1:30 (macho/hembra); la inseminación artificial en ovejas ha sido, generalmente, limitada debido a su alto costo de mano de obra y a su baja fertilidad, específicamente cuando se usa semen congelado (Hafez, 2000).

El porcentaje de concepción en ovejas de zonas templada es del 85%, el porcentaje promedio de nacimientos es de 150%, la fecundidad disminuye en sitios cercanos al ecuador, hacia el comienzo y el final de la temporada reproductiva (Hafez, 2000), cuando las hembras son viejas o el forraje tiene altas concentraciones de estrógenos, y cuando las hembras sufren parasitosis u otras enfermedades (Hafez, 2000; Quiroz, 2002; Morteo *et al.*, 2004; Cetz *et al.*, 2005). El tiempo de gestación de alrededor de 150 días hace posible que la oveja tenga descendencia más de una vez al año. Sin embargo, debido a su anestro estacional en condiciones templadas, estos animales no experimentan el ciclo después del parto en primavera sino hasta el otoño de modo que sólo es posible una camada al año (Hafez, 2000). Asimismo, se ha reportado que en ovejas explotadas en zonas tropicales, las concepciones ocurren durante todo el año disminuyendo 25% en los primeros meses del año (Sarmiento *et al.*, 1998; Delgadillo, 2003).

Importancia del macho

Los machos son pieza clave en las unidades de producción ovina, sea por su efecto sobre las posibilidades de mejoramiento genético o en la tasa reproductiva del rebaño. Además, al ser los que más se mueven entre explotaciones, hay el riesgo de introducir enfermedades por la movilización de ganado entre diferentes explotaciones (Pérez *et al.*, 2011).

El carnero no muestra una actividad de apareamiento restringida, pero la actividad sexual es máxima en otoño y disminuye a finales del invierno (Hafez, 2000; Macedo y Alvarado, 2005). La actividad sexual se ve influenciada por un estímulo en la secreción de FSH, LH y Testosterona en los días cortos mientras que en los días largos, esta secreción se inhibe (Hafez, 2000).

Para evaluar el potencial reproductivo de un macho se han investigado diferentes etapas de su ciclo reproductivo: la formación de los espermatozoides, la capacitación espermática, y la fertilización. Algunas técnicas que se han empleado para medir dichas etapas son: el tamaño testicular, biopsia e histología de los testículos y la recolección frecuente del semen, la producción total de

espermatozoides, la motilidad y la morfología espermática así como la integridad del ADN espermático (Hahn, 1999; Foote, 2003; Holt, 2009).

Aparato reproductor de carnero

Testículos. Son los órganos primarios del aparato reproductor del macho, cuya función es producir espermatozoides y las hormonas masculinas. Los testículos se encuentran dentro de la piel llamada escroto, éstos deben ser firmes y grandes. Su tamaño va a depender de la edad, de la raza y del tamaño del macho, pero se puede considerar una circunferencia media de 30 cm aproximadamente (Hafez, 2002).

Escroto. Participa en la termorregulación necesaria para la espermatogénesis, ya que este proceso debe llevarse a cabo por debajo de la temperatura corporal. Esta estructura está formada por piel y dos membranas: la túnica dartos y la túnica vaginal; la piel cuenta con gran cantidad de glándulas sudoríparas y sebáceas. La túnica dartos está íntimamente adherida a la piel y contiene tejido muscular el cual se contrae o relaja dependiendo de la temperatura ambiental, buscando siempre mantener la temperatura testicular por debajo de la corporal. Los mecanismos de termorregulación incluyen también al músculo cremaster que conecta a la túnica vaginal con el abdomen, regulando la proximidad del testículo al abdomen (Cervantes, 2012).

Epidídimos. Son los conductos que salen de los testículos, forman una pequeña prominencia debajo de los testículos (cola del epidídimo) dentro del escroto. Sus funciones son las de transporte, concentración, almacenamiento y maduración de los espermatozoides. Están formados por 3 partes que son: la cabeza, el cuerpo y la cola (Suzuki, 2004).

Cordón espermático. Conecta a los testículos con su sistema de nutrición (arteria y venas) y los troncos nerviosos. La arteria espermática envuelve de manera tortuosa a la vena espermática con la finalidad de enfriar la sangre que llega al testículo (Cervantes, 2012).

Conducto deferente. El conducto deferente transporta los espermatozoides desde la cola del epidídimo a la uretra, tiene estrecho contacto con el cuerpo del epidídimo, la porción final de este conducto se ensancha para formar el ámpula, la

cual representa un pequeño reservorio de espermatozoides cuando se compara con la cola del epidídimo (Evans y Maxwell, 1990).

Glándulas accesorias. El macho ovino tiene vesículas seminales, próstata y las glándulas bulbouretrales; estas glándulas producen líquidos que se vierten hacia la uretra al momento de la eyaculación y en conjunto con los espermatozoides conforman el semen. Las vesículas seminales están localizadas en proximidad con la unión del conducto deferente y la uretra. La próstata es una glándula diseminada sobre la uretra y se localiza caudalmente a las vesículas seminales. Las glándulas bulbouretrales se localizan sobre la uretra antes de su salida de la cavidad pélvica (Cervantes, 2012).

Pene. Es el órgano copulador de los machos, presenta una flexura sigmoidea, la que permite que se retraiga dentro del cuerpo y no se observe por fuera del macho durante el descanso. El pene está formado por el cuerpo del pene, el glande y el proceso uretral. El glande es el extremo externo del pene, está formado por tejido fibroelástico, una pequeña cantidad de tejido eréctil y un gran número de terminaciones nerviosas. El proceso uretral es una extensión de la uretra, en forma de una pequeña manguera, que permite que el eyaculado del macho llegue al fondo de la vagina a modo de aspersión (Cervantes, 2012).

Semen

El semen es un líquido generativo del macho que contiene los gametos masculinos (espermatozoides), es depositado en la vagina de la hembra al momento de la copula y puede ser colectado por medios artificiales (vagina artificial, electroeyaculación) para su estudio. La composición varía según la especie, el plasma seminal es secretado por las glándulas sexuales accesorias, sus funciones son las siguientes:

- Actúa como vehículo para los espermatozoides
- Activador para los espermatozoides
- Medio rico en nutrientes
- Tampón una vez depositado en el tracto genital de la hembra.

Las características del semen varían entre las distintas especies; la concentración de espermatozoides y el volumen del eyaculado están relacionados con la

anatomía y los hábitos de monta de una especie determinada. En los ovinos, la eyaculación es espontánea, dada por la presión y la temperatura de la vagina, el semen se deposita en la parte anterior de la vagina. El volumen del eyaculado es bajo y por tanto la concentración alta (Evans y Maxwell, 1990; Ax *et al.*, 2002; Hafez, 2002).

Espermatozoides

Son los gametos masculinos, los cuales son producidos en los túbulos seminíferos. Los espermatozoides son células altamente especializadas, formadas por dos partes principales, la cabeza y la cola (Evans y Maxwell, 1990). Al proceso de producción de semen se le conoce como espermatogénesis, ésta comienza durante la pubertad y se continúa durante la vida adulta del macho en el epitelio seminífero del testículo, donde mediante un proceso de división y diferenciación celular se producen los espermatozoides (Evans y Maxwell, 1990).

La cabeza del espermatozoide es plana y ovoide, ocupada en casi su totalidad por el núcleo que está formado por los cromosomas, responsables de portar la información genética paterna; la cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (ADN) y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. Su número cromosómico y ADN es haploide. La cabeza está envuelta en su parte anterior por el acrosoma, que contiene enzimas necesarias para el proceso de fertilización, estas enzimas son la acrosina, hialuronidasa y otras hidrolíticas (Evans y Maxwell, 1990).

La cola o flagelo es un orgánulo locomotor de los espermatozoides, el movimiento de la cola es el responsable de la propulsión de los espermatozoides la cola se divide en tres regiones:

- Pieza proximal
- Pieza principal
- Pieza terminal

A lo largo del flagelo existe un núcleo axial común formado por una serie de conductos contráctiles o fibrillas. La proximal es la región más gruesa de la cola, donde el eje está rodeado de una lamina mitocondrial, que son las que proporcionan la energía necesaria para la locomoción. La pieza intermedia o

principal es la parte más larga de la cola y contiene la mayor parte de la maquinaria propulsora (Johnson, 1991; Hafez, 2002).

Evaluación de semen

Los métodos para la evaluación de semen deben tener gran precisión y deben ser además sencillos, económicos y rápidos, de manera que permitan detectar a tiempo cualquier cambio en la calidad del semen de los reproductores que pudieran afectar la capacidad fértil del mismo. Cuando se evalúa semen, se está evaluando calidad seminal; la calidad seminal está dada por la comparación de los parámetros obtenidos al evaluar el semen con los valores que son considerados como normales para un reproductor adulto. Los valores normales o estándares del semen fresco se han establecido por el estudio, a lo largo de muchos años, esos valores normales están directamente relacionados con la fertilidad (Evans y Maxwell, 1990).

Los parámetros del eyaculado a evaluar son:

Macroscópico: color, volumen, consistencia

Fisicoquímicas: pH

Microscópico: motilidad masal, motilidad individual, integridad de la membrana plasmática (vivos y muertos), concentración espermática, morfología espermática e integridad del acrosoma.

Antes de proceder a la evaluación del semen es necesario conocer ciertas características que se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Características del semen de carnero

CARACTERÍSTICA	VALORES
Volumen	0.5 – 2.0 mL
Concentración	3.5 - 6.0 x10 ⁹ espermatozoides/ mL
Motilidad (%)	70 – 95
pH	5.9 - 7.3

Adaptado de Balcázar y Porras 2010.

Color

El semen de carnero es de color lechoso o crema pálido, para el caso de que exista un color distinto, por ejemplo color rosa indica sangre, probablemente una lesión del pene durante la recolección, el semen de color gris o pardo indica contaminación o infección en el tracto reproductivo (Ax *et al.*, 2002).

Volumen

Cuando la recolección se hace con vagina artificial, el volumen promedio para carneros es de 1.0 mL. El volumen del eyaculado se puede medir directamente en el tubo colector o con la ayuda de una pipeta calibrada. El volumen del eyaculado depende de las condiciones del macho: los animales jóvenes, o aquellos que se encuentran en condiciones precarias, por lo general presentan eyaculados menos voluminosos. El volumen del eyaculado disminuye con la frecuencia de las recolecciones dentro del mismo día (Robaire *et al.*, 1995).

Evaluación de pH

El test de pH generalmente se incluye en los análisis de rutina como un parámetro orientador. El pH viene dado por las secreciones ácidas provenientes de la próstata y las secreciones alcalinas de las vesículas seminales. El pH en el semen oscila como valor normal entre 6.6 y 6.9 hasta 7.0. Si el pH excede de 7 se puede sospechar de algún tipo de infección y probablemente en ese caso disminuya la secreción de productos ácidos de la próstata, tales como el ácido cítrico. Se pueden medir valores de pH anormales en el caso de eyaculación incompleta; valores de pH extremadamente ácidos (<6.5) se encuentran en casos de agenesia o oclusión de las glándulas vesiculares (Robaire *et al.*, 1995).

Para hacer la medición del pH, se coloca una gota del eyaculado sobre una tira reactiva, se espera unos minutos y se coloca la tira a un costado de la tabla que marca el fabricante para comparar el cambio de colores en la tira (Balcázar y Porras, 2010).

Motilidad masal

La evaluación de la motilidad masal del eyaculado se realiza con semen puro y diluido. Debido a que la motilidad espermática es en extremo susceptible a las condiciones ambientales, es necesario proteger el semen de agentes o

situaciones perjudiciales antes del análisis. En el cuadro 2 se observan las escalas de evaluación para la motilidad masal (Ax *et al.*, 2002):

Cuadro 2. Motilidad masal del semen en pequeños rumiantes.

MOTILIDAD DEL SEMEN EN PEQUEÑOS RUMIANTES		
Motilidad masal o Vigor	Clasificación	Calificación Numérica
Movimiento de ola rápido	Muy bueno	3
Movimiento de ola lento	Bueno	2
Oscilación casi nula	Regular	1

Adaptado de Ax *et al.*, 2002

Motilidad individual

Es la observación del movimiento de los espermatozoides de manea individual, en diferentes campos, se evalúa que los espermatozoides tengan un movimiento lineal y progresivo se determina una calificación progresiva en la escala de 0% a 100% (Evans y Maxwell, 1990).

Concentración

La concentración de espermatozoides se expresa como el número de espermatozoides por mL. La determinación de la concentración espermática se lleva a cabo en forma simple mediante métodos semejantes al recuento de glóbulos rojos realizado en hematología (Balcázar y Porras, 2010)

Morfología

Para observar la morfología de los espermatozoides se tiñe una muestra de semen con Eosina-Nigrosina, esta tinción nos sirve además para poder observar los espermatozoides vivos y muertos.

Las anomalías se clasifican en primarias y secundarias según el lugar en donde se originan; las anomalías primarias representan anomalías durante la espermatogénesis, éstas pueden ser: cabezas dobles, macrocéfalos, microcéfalos, colas enrolladas, colas dobles, gota citoplasmática proximal. En tanto que las anomalías secundarias ocurren en el tránsito a través del epidídimo como son: gota citoplasmática media y distal, colas rotas. El cuadro 3 muestra las principales anomalías espermáticas (Ax *et al.*, 2002).

Cuadro 3. Morfología espermática en carneros.

MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA	
Anormalidades espermáticas primarias	Anormalidades espermáticas secundarias
Cabeza doble	Gota citoplasmática proximal
Cola doble	Gota citoplasmática distal
Macrocéfalo	Cola quebrada
Microcéfalo	Cola alrededor de la cabeza
Cabeza piriforme	
Cabeza lanceolada	
Cabeza angosta o estrecha	
Cabeza desprendida	
Acrosoma desprendido	
Acrosoma rugoso	
Acrosoma pequeño	
Cola enrollada	

Adaptado de Ax *et al.*, 2002

Factores que afectan la supervivencia de los espermatozoides

El semen, que al momento de la recolección puede ser de buena calidad, se deteriora con facilidad conforme avanza el tiempo. Los factores que pueden afectar la supervivencia de los espermatozoides son los siguientes (Evans y Maxwell, 1990; Dadoune y Demoulin, 1993):

- Temperatura
- Luz
- Contacto con agua
- Impurezas y bacterias
- Presión osmótica del diluyente
- Capacidad tamponante del diluyente
- Desinfectantes

Conservación de semen

El fundamento de conservar el semen es prolongar la capacidad de fertilización de los espermatozoides, mediante la reducción de su movimiento y de sus reacciones metabólicas (Foote, 2003). Se sabe que el proceso de refrigeración y congelación afecta particularmente la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide (Locksley *et al.*, 1988; De Leeuw *et al.*, 1990). Otras estructuras como la membrana de las mitocondrias, del acrosoma y el flagelo también se ven afectadas (Hammerstedt *et al.*, 1990; Oestermaier, 2000).

El hallazgo fortuito de las propiedades crioprotectoras del glicerol sobre los espermatozoides de ave, fue el punto de partida de la crioconservación rutinaria del semen de algunos animales domésticos (Polge *et al.*, 1949, citado por Medrano, 2008).

El proceso de crioconservación consta de diferentes etapas: enfriado, deshidratación celular, formación del hielo, descongelación y rehidratación celular (Eriksson *et al.*, 2000); aun cuando en este proceso ocurren cambios que modifican o alteran al espermatozoide, Graham y Mocé (2005) señalan que la mayor desestabilización ocurre durante el proceso de congelación-descongelación, esto debido a que en los lípidos de la membrana plasmática se lleva a cabo una transición de fases. La transición de fases es el cambio físico que sufren los lípidos de la membrana plasmática, la cual se encuentra en un estado líquido-cristalino, pero al congelarse la membrana plasmática se vuelve más rígida y poco elástica al adoptar un estado de gel (Holt, 2000; Chen, 2002). Patist *et al.* (2005) mencionan que este evento puede dañar la membrana plasmática de manera irreversible.

Factores que afectan la conservación de semen

Son muchos los factores que enfrentan los espermatozoides cuando son sometidos a los procesos de enfriado, congelación y descongelación. El espermatozoide es una célula altamente especializada que no está preparada para sobrevivir en un ambiente desfavorable, ha perdido su capacidad de síntesis de compuestos para reparar su membrana plasmática (Medrano, 2008).

La tasa de fertilidad del semen congelado es menor que la del semen fresco (Maxwell y Watson, 1996; Watson, 2000). La baja tasa de fertilidad obtenida al utilizar semen congelado podría ser causada por la desestabilización prematura de las membranas del espermatozoide durante el proceso de criopreservación (Salamon y Maxwell, 2000).

La criopreservación del semen causa cambios en el espermatozoide similares a los que ocurre en la capacitación espermática (Bailey *et al.*, 2002), por esto a este fenómeno se le denomina criocapacitación (Vadnais *et al.*, 2005). Algunos cambios celulares que ocurren con la criocapacitación son aumento de la permeabilidad, decremento de la relación colesterol: fosfolípidos de la membrana plasmática (Langlais y Roberts, 1985), aumento del calcio intracelular y alcalinización citoplasmática (Handrow *et al.*, 1989), generación de especies reactivas de oxígeno (de Lamirande *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997), y fosforilación de la tirosina de las proteínas (Flesch *et al.*, 1999).

Si estos cambios son inducidos prematuramente por la criopreservación, las tasas de concepción se pueden reducir si el semen se usa en la inseminación artificial (Bailey y Buhr, 1994). Cormier *et al.* (1997) y Pérez *et al.* (1997) sugieren que un proceso similar al inducido por la criopreservación puede ocurrir en los espermatozoides cuando el semen diluido se conserva en refrigeración o en fresco por 4 horas o más. En apoyo a lo anterior, Morrier *et al.* (2002) observaron que la presencia de espermatozoides con reacción acrosomal aumentó en el semen de carnero cuando el tiempo de refrigeración aumentó de 16 a 24 horas.

Por lo tanto, se requieren desarrollar alternativas que permitan mejorar la fertilidad mediante la inseminación peri- o intra-cervical. Un aspecto importante podría ser la prevención de la pérdida de la calidad seminal durante el proceso de criopreservación de semen ovino. El uso de antioxidantes podría constituir una alternativa para mejorar los protocolos de criopreservación de semen ovino mediante el bloqueo de la desestabilización espermática y así lograr mejores tasas de fertilidad (Jones *et al.*, 1979).

La alta susceptibilidad de los espermatozoides a los radicales libres de oxígeno se debe a que sus membranas plasmáticas tienen un alto contenido de ácidos grasos

insaturados (Jones *et al.*, 1979), lo cual las hace susceptibles a sufrir peroxidación lipídica (Álvarez y Storey, 1989). Dicha peroxidación lipídica ha sido relacionada además con una disminución en la motilidad espermática y muerte celular (Aitken, 1994). Es por ello que la adición de antioxidantes al medio de dilución podría prevenir la desestabilización temprana del espermatozoide durante el proceso de criopreservación.

Antecedentes del uso de antioxidantes en el semen

La utilización de antioxidantes para la criopreservación de semen aún no está estudiada completamente en ovinos. Algunos reportes indican la utilización de un análogo de la enzima superóxido dismutasa denominado Tempo (2,2,6,6 tetramethyl-1-piperidinyloxy) como antioxidante para prevenir la pérdida de la calidad espermática (Santiani, 2003; Ruiz, 2005).

En el ganado ovino, al igual que en el resto de especies, la inseminación artificial (IA) presenta indudables ventajas de tipo genético, zootécnico y sanitario. La IA cervical en esta especie se hace de forma mayoritaria utilizando semen refrigerado, lo que conlleva la limitación del empleo de esta técnica en el espacio y en el tiempo. la refrigeración a 5°C permite prolongar la supervivencia de los espermatozoides durante varios días, pero no así su poder fecundante que está restringido a unas horas (6-12) (Aguado, 1998).

Se ha comprobado, *in vitro*, la supervivencia del semen ovino refrigerado a 5°C hasta por 6 días, manteniéndose los valores de motilidad individual, integridad acrosomal y resistencia osmótica por encima del 60% durante los dos primeros días (López *et al.*, 1997; Aguado, 1998).

La adición de antioxidantes GSH y ácido ascórbico al semen equino, la taurina y cisteína al semen bovino, ha demostrado que protege los espermatozoides contra los efectos nocivos de ROS y a mejorar después de la criopreservación la motilidad espermática, la viabilidad y la fertilidad (Aurich, 1997; Bilodeau, 2001). Para intentar minimizar la peroxidación se han probado diversos antioxidantes, examinando sus efectos sobre los espermatozoides. En el carnero se han analizado los sistemas enzimáticos superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y citocromo C líquido (CHc), antioxidantes que han mejorado la movilidad y la

integridad acrosomal del espermatozoide (Maxwell y Stojanov, 1996). Los espermatozoides de los mamíferos son extremadamente sensibles al estrés oxidativo que se puede definir como una alteración entre pro-oxidantes y antioxidantes. Es decir produce un aumento en las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que se encuentran en el tracto genital masculino; esta excesiva producción de ROS afecta a las membranas lipídicas de los espermatozoides a causa de la lipoperoxidación y también de la oxidación proteica y al DNA. En cuanto a los agentes antioxidantes, la Melatonina se ha utilizado en forma de implantes exógenos en moruecos y se ha observado un efecto protector del daño oxidativo de los espermatozoides (Gavella *et al.*, 2000).

Kenan *et al.* (2010) adicionaron antioxidantes (Metionina y Dithioerithritol) al semen de carnero refrigerado hasta 72 horas a 5°C encontrando que la motilidad y la integridad de la membrana se ven favorecidas. Recientemente, se ha demostrado la presencia de Melatonina en el plasma seminal del carnero con variaciones en su concentración en temporada reproductiva y fuera de ella (Casao *et al.*, 2009); se observó además que los niveles de Melatonina son mayores en este fluido que en el suero. Por lo tanto, se podría esperar que la adición de Melatonina ejerza un efecto en la motilidad durante la conservación de semen de carnero (Casao *et al.*, 2009). Por lo anterior, se espera que la adición de Melatonina al semen de carnero diluido y refrigerado produzca un efecto positivo en su integridad funcional y estructural durante la refrigeración a 5°C.

III. OBJETIVOS

General

Evaluar la calidad de semen de carnero refrigerado a 5°C y diluido en un diluyente a base de Tris-yema de huevo adicionado con Melatonina como antioxidante.

Específicos

Evaluar la motilidad progresiva, la integridad de la membrana plasmática e integridad de la membrana acrosomal de espermatozoides de carnero a las 24 y 48 horas de refrigeración a 5°C, en un diluyente adicionado con Melatonina como antioxidante.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El presente trabajo se llevó a cabo en el Módulo de Ovinos del Centro de Enseñanza Agropecuaria y en el laboratorio de Reproducción y Comportamiento Animal de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación (UIM), ambos de la Facultad de Estudios Superiores – Cuautitlán, Campo 4. La FES – Cuautitlán está ubicada geográficamente en los paralelos 19°, 39' - 19°, 45' N y con los meridianos 99°, 88' - 99°, 45' W a una altitud de 2250 m.s.n.m; el clima de Cuautitlán se clasifica según Kopen como C (Wo)(W) B (1'') denominado templado el más seco de los templados subhúmedos con una temperatura media anual entre 12° y 18°C, con un régimen de lluvia en verano y menos del 5% de lluvias en invierno (García, 1973).

Animales

Se utilizó un grupo de 5 machos ovinos de los cuales 4 de ellos eran de la raza Columbia y 1 de la raza Texel con un promedio de edad de 18 meses; los machos fueron entrenados previamente para la recolección de semen con el método de la vagina artificial. Los animales se encontraban alojados en un corral comunitario de 24m² con agua y alimento *ad libitum*, básicamente heno de avena. Cada uno de los machos se identificó con un tatuaje y un arete de plástico, se utilizaron diferentes hembras como maniquí, las colecciones de semen se realizaron por la mañana entre las 10:00 y las 12:00 de la mañana.

Colección y transporte de la muestra

El semen se colectó por medio de vagina artificial, dos muestras por día de trabajo; a cada una de las muestras se les identificó con el número de macho, volumen del eyaculado y fecha de colección, enseguida se le agregó al eyaculado una solución de transporte (Evans y Maxwell, 1990) a 36°C en una proporción 1:1 (v/v) y se colocó dentro de una caja térmica y seca para su transporte al laboratorio. La colección del semen se llevó a cabo en el periodo de junio a agosto de 2012.

Evaluación y procesamiento de la muestra

Al llegar al laboratorio las muestras de semen se colocaron en baño María a 33°C, posteriormente se tomó una gota de semen para evaluar la motilidad masal, enseguida se realizó una dilución 1:100 agregando 200 µL de semen a 9.8 mL de solución salina fisiológica (0.9% NaCl p/v) previamente colocada en baño María a 33°C, de esta dilución se evaluaron las siguientes variables:

1) motilidad progresiva, 2) viabilidad (vivos y muertos) mediante la tinción Eosina-Nigrosina, 3) viabilidad mediante la prueba del hinchamiento hipo-osmótico (HOST), 5) porcentaje de anomalías y 6) integridad del acrosoma.

Posteriormente, las muestras de semen fresco (diluido en solución de transporte) fueron centrifugadas a 700xg durante 15 minutos. Enseguida, se retiró el sobrenadante y el botón de células fue resuspendido en 3 mL de diluyente, entonces se hizo la lectura de concentración.

Motilidad masal

Se tomó una gota de semen fresco y se colocó en un portaobjetos atemperado en la platina térmica a 36°C, se observó al microscopio con el objetivo de 4x; se evaluó la presencia y rapidez del movimiento de oleaje de la muestra asignándoles una calificación en una escala de 1 a 3 (Ax *et al.*, 2002).

Motilidad progresiva

Se tomó una gota de la dilución 1:100 y se colocó sobre un portaobjetos atemperado, la gota se cubrió con un cubreobjetos igualmente atemperado, se observó al microscopio con el objetivo de 20x, se asignó una calificación en porcentaje, en múltiplos de 5, de acuerdo a la proporción de espermatozoides que mostraran un movimiento progresivo lineal.

Viabilidad (porcentaje de vivos y muertos) mediante tinción de Eosina-Nigrosina

Se tomó una gota de la dilución 1:100 y se colocó sobre un portaobjetos atemperado, enseguida se colocó una gota de la tinción Eosina-Nigrosina previamente calentada en el baño María a 33°C, se mezclaron ambas gotas, se hizo el frotis y se secó inmediatamente con un ventilador. El frotis se observó al microscopio con el objetivo de 100x, los espermatozoides que mostraban una

tonalidad blanca (no teñidos) se consideraron vivos, los que mostraban una tonalidad rosa (teñidos) se consideraron muertos.

Prueba del hinchamiento hipo-osmótico (HOST)

Se tomaron 100 μ L del semen diluido (1:100) y se mezcló con 100 μ L de la solución hipo-osmótica (60mOsm/Kg) en un tubo de centrifuga con tapa (tipo Eppendorf), esta mezcla se mantuvo 10 minutos en el baño María, posteriormente se fijó la mezcla con 30 μ L de glutaraldehido al 0.4% (v/v); después se tomó una gota y se colocó sobre un portaobjetos cubriéndola con un cubreobjetos, enseguida se observó al microscopio con el objetivo de 100x contabilizando tanto los espermatozoides que presentan hinchamiento hipo-osmótico como los que no lo presentaban. De un total de 200 espermatozoides contabilizados se determinó el porcentaje vivos (hinchados) y de muertos (no hinchados) (Olivera *et al.*, 2010).

Integridad del Acrosoma

Se tomaron 100 μ L de la dilución 1:100 y se mezcló con 30 μ L de glutaraldehido al 0.4% en un tubo tipo Eppendorf, enseguida se tomó una gota que se colocó sobre un portaobjetos cubriéndola con un cubreobjetos; se observó al microscopio con el objetivo de 100x contabilizando tanto los espermatozoides con acrosoma intacto (borde apical liso y bien definido) como aquellos con esta estructura dañada. Se contó un total de 200 espermatozoides y se calculó el porcentaje de intactos y dañados.

Concentración del semen fresco (inicial)

Se mezclaron 1.0 mL del semen diluido 1:100 más 1.0 mL de solución salina formolada (0.3% v/v), así se obtuvo una dilución 1:200; enseguida se llenó la cámara de Neubauer y se dejó reposar 5 minutos previo a la lectura. Se observó al microscopio con el objetivo de 40x y se contabilizaron los espermatozoides contenidos en 5 de los 25 cuadros de cada uno de los extremos de la cámara, se obtuvo la media de ambas cámaras y se calculó la concentración.

Concentración espermática posterior a la centrifugación

Para determinar la concentración de la pastilla resuspendida en diluyente Tris-yema de huevo (Sánchez-Partida *et al.*, 1998), se tomó 10 μ L de la suspensión y se mezcló con 1990 μ L de solución salina formolada (0.3%); el conteo se hizo de

la manera descrita anteriormente. Una vez obtenida la concentración se agregó la cantidad necesaria del diluyente Tris-yema para tener una concentración final de 200 millones de espermatozoides por mililitro.

Tratamientos

Se trabajó con tres grupos experimentales: un grupo testigo y dos grupos con Melatonina (dos diferentes niveles). Se tomaron 3 alícuotas del semen diluido en Tris-yema de huevo, cada una de 3.0 mL, enseguida se agregó la Melatonina de la siguiente manera:

Grupo	Tratamiento
Testigo (sin Melatonina)	50 μ L de DMSO+PBS (1+9 v/v) por mL de semen diluido
Melatonina 1 (1 mM)	25 μ L de DMSO+PBS (1+9 v/v) + 25 μ L de Melatonina en DMSO+PBS (1+9 v/v) por mL de semen diluido
Melatonina 2 (2 mM)	50 μ L de Melatonina en DMSO+PBS (1+9 v/v) por mL de semen diluido

De esta forma el nivel de DMSO utilizado fue el mismo en cada grupo. Una vez que se agregaron los tratamientos se evaluó nuevamente la motilidad progresiva de la manera descrita anteriormente. Los tubos con el semen de cada tratamiento fueron tapados con parafilm, se colocaron en un vaso de precipitados con agua a temperatura de cuarto y se introdujeron a un refrigerador a 5°C.

A las 24 y 48 horas de almacenamiento, los tubos se retiraron del refrigerador (dentro del vaso de precipitados) y se tomó una muestra de 1000 μ L de cada uno de los tratamientos, estas muestras se colocaron en tubos de ensayo debidamente identificados y se mantuvieron a temperatura de cuarto. Diez minutos después se preparó una dilución 1:10 mezclando 100 μ L de la muestra con 900 μ L de Solución Salina Fisiológica (0.9% NaCl), enseguida se evaluó la motilidad progresiva de cada uno de los grupos experimentales. De esta dilución también se

evaluó la viabilidad por Eosina-Nigrosina y por HOST, además de la integridad del acrosoma.

Análisis estadístico

Las variables del semen fresco: volumen, motilidad masal, motilidad progresiva, viabilidad, concentración, anormalidades e integridad del acrosoma, se analizaron mediante estadística descriptiva.

Cada una de las variables de los tratamientos: motilidad progresiva, viabilidad por Eosina-Nigrosina, viabilidad por HOST y la integridad del acrosoma, se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas. En primer lugar se hizo un análisis de medidas repetidas (ANOVA de Friedman) para ver el efecto del tiempo de almacenamiento dentro de tratamientos, en segundo lugar se hizo una ANOVA de Kruskal-Wallis para ver posibles diferencias entre tratamientos en un momento dado del periodo de almacenamiento, y como complemento de este análisis se hizo, en caso necesario, la prueba de pares de Wilcoxon. Para estos análisis se empleó el programa estadístico Stats versión 5.0 (Statsoft Ltd, Reino Unido. 1997).

V. RESULTADOS

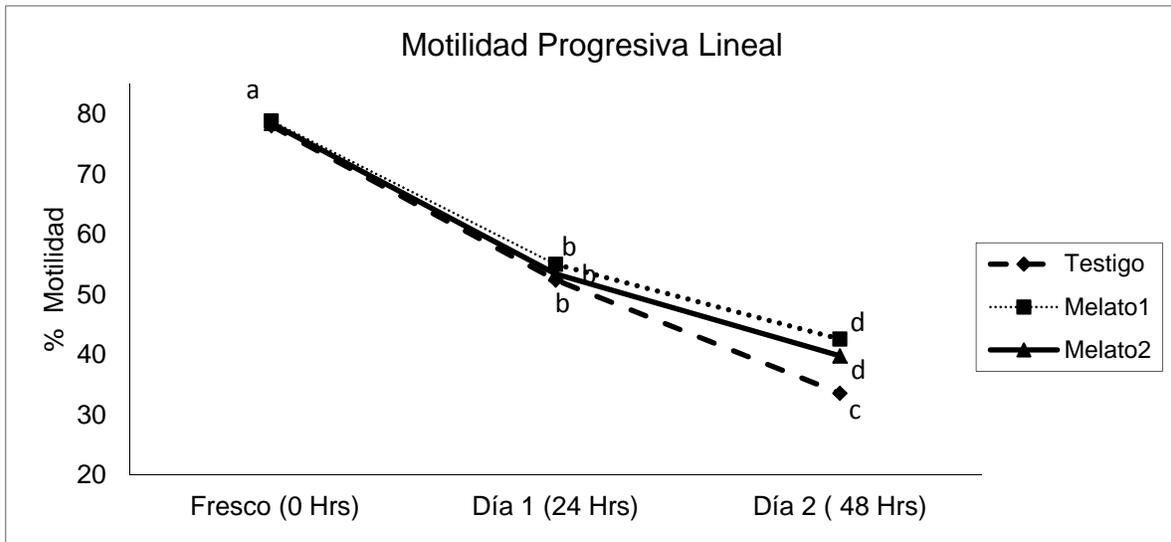
En el cuadro 4 se muestran los valores promedio de las variables del semen fresco de cada macho. Se puede observar que los valores de cada variable son muy similares entre machos.

Cuadro 4. Valores promedio de las variables del semen fresco de cada macho

Macho (Eyaculados)	Volumen (mL)	Motilidad Masal	Motilidad Progresiva (%)	Vivos (%) Eosina/Nigrosina	Vivos (%) HOST	Normales (%)	Acrosoma Intacto (%)
189 (n=5)	1.2 ± 0.5	2.0 ± 0.5	52 ± 12.6	73.5 ± 12.8	66.6 ± 23.1	84.2 ± 2.6	85.1 ± 3.2
533 (n=5)	1.1 ± 0.1	2.4 ± 0.4	55 ± 15.4	79 ± 4.9	70.2 ± 22.8	80.6 ± 2.0	83.8 ± 3.8
90 (n=5)	1.2 ± 0.4	2.2 ± 0.5	66 ± 6.5	80.5 ± 6.6	80.7 ± 2.9	82.4 ± 5.1	81.8 ± 3.8
101 (n=5)	1.3 ± 0.2	2.1 ± 0.4	72.5 ± 9.4	86 ± 7.3	85.2 ± 2.5	85.2 ± 4.6	82.7 ± 1.9
119 (n=5)	1.1 ± 0.3	2.0 ± 0.4	73 ± 5.7	74 ± 5.9	76.4 ± 2.3	85.6 ± 4.0	76.1 ± 2.8

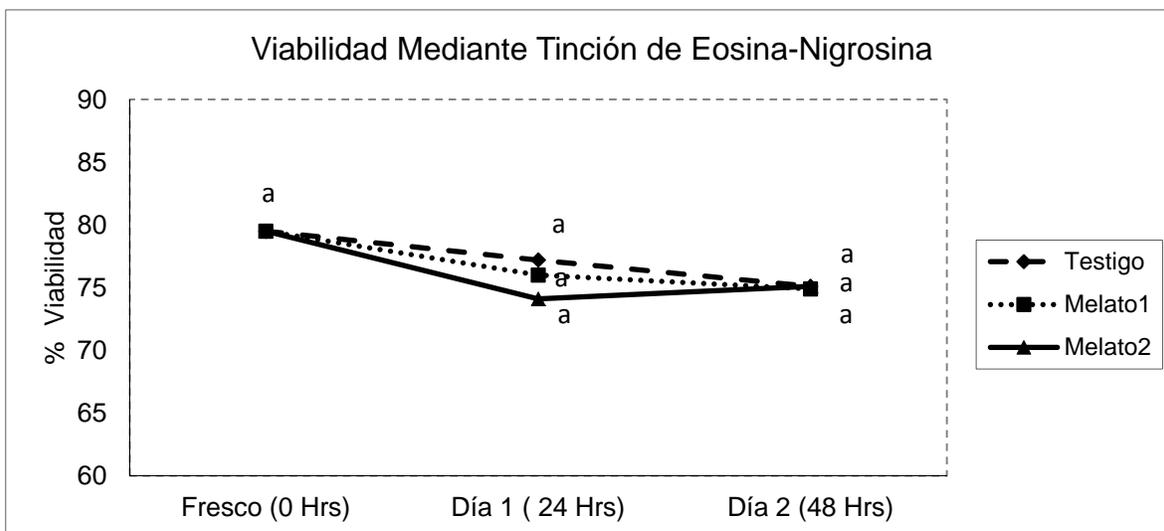
Los valores son promedio ± Desviación estándar.

En relación al efecto del almacenamiento (refrigeración) sobre la motilidad progresiva, se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) en los días 1 y 2 en comparación con el semen fresco; además hubo diferencia significativa entre el día 1 y 2 ($P < 0.05$) para todos los tratamientos. En relación al efecto del tratamiento (sin Melatonina, Melatonina 1mM y 2mM), a las 24 horas de refrigeración no hubo diferencias, sin embargo a las 48 horas la motilidad de los tratamientos con Melatonina fue mayor ($P < 0.05$) que la del grupo testigo (Gráfica 1).



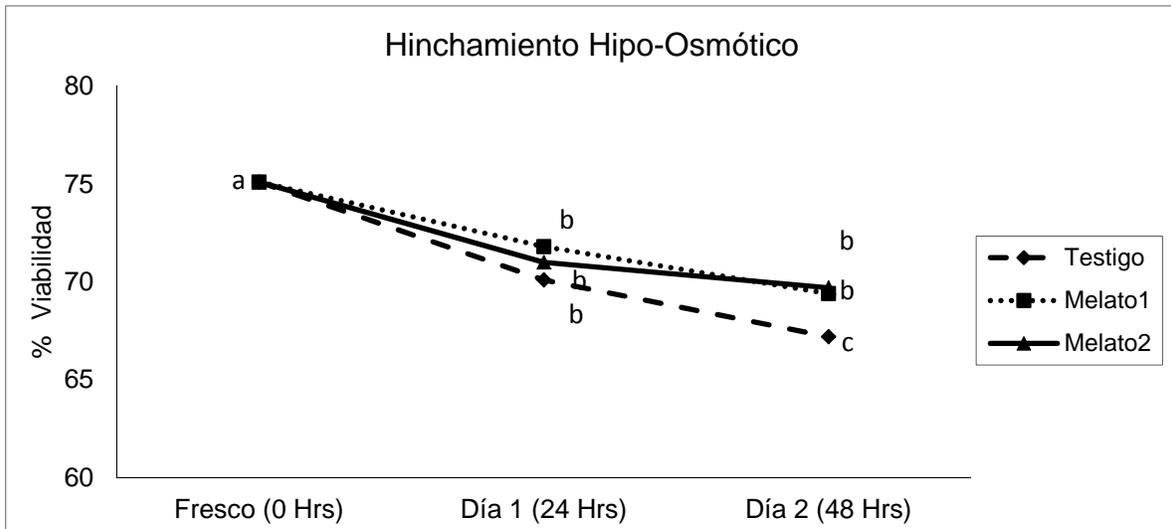
Gráfica 1. Motilidad progresiva de los espermatozoides de carnero sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).

En lo que se refiere a la viabilidad de los espermatozoides, medida por la tinción Eosina-Nigrosina, no hubo diferencias significativas ocasionadas por el efecto de la refrigeración ni por el efecto del tratamiento (Gráfica 2).



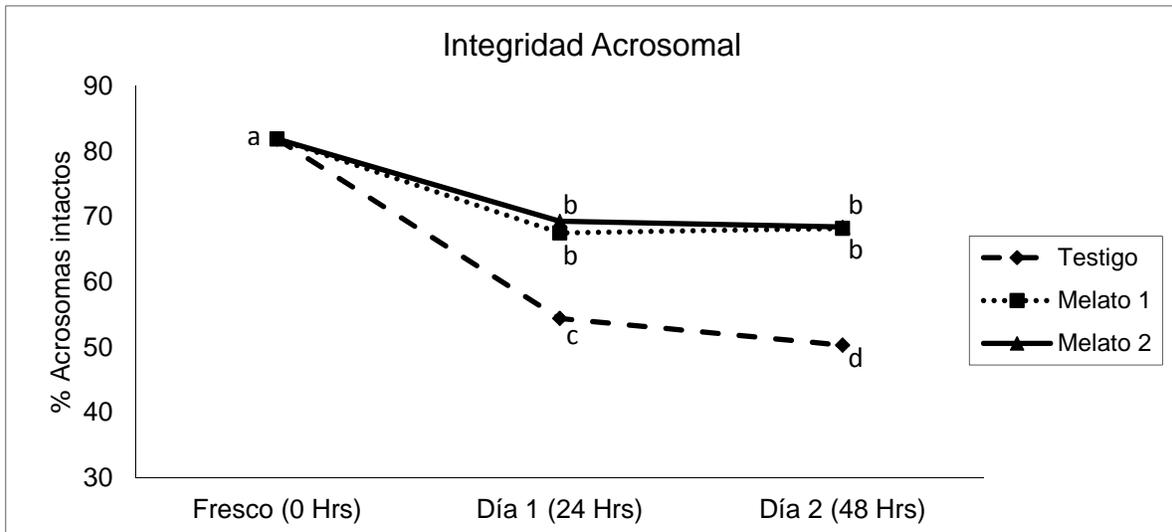
Gráfica 2. Viabilidad de los espermatozoides de carnero, mediante la tinción Eosina-Nigrosina, sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).

En lo que se refiere a la viabilidad de los espermatozoides, medida por la prueba del hinchamiento hipo-osmótico, la refrigeración ocasionó una disminución significativa ($P < 0.05$) en los días 1 y 2 en comparación con el semen fresco en todos los tratamientos; además hubo diferencia significativa entre el día 1 y 2 ($P < 0.05$) en el grupo testigo. En contraste, en los grupos con Melatonina no hubo diferencia entre el día 1 y 2, esto significa que la viabilidad se mantuvo sin cambio en los dos días de refrigeración. Es importante notar que a las 48 horas de almacenamiento, la viabilidad de los tratamientos con Melatonina fue mayor ($P < 0.05$) que la del grupo testigo (Gráfica 3).



Gráfica 3. Viabilidad de los espermatozoides de carnero, mediante la prueba del hinchamiento hipo-osmótico (HOST), sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).

Respecto a los espermatozoides con acrosoma intacto, la refrigeración ocasionó una disminución significativa ($P < 0.05$) en los días 1 y 2 en comparación con el semen fresco en todos los tratamientos; además hubo diferencia significativa entre el día 1 y 2 ($P < 0.05$) en el grupo testigo. En contraste, en los grupos con Melatonina no hubo diferencia entre el día 1 y 2, esto significa que la integridad del acrosoma se mantuvo sin cambio en los dos días de refrigeración. La integridad del acrosoma de los tratamientos con Melatonina, a las 24 y a las 48 horas de refrigeración, fue mayor ($P < 0.05$) que la del grupo testigo (Gráfica 4).



Gráfica 4. Espermatozoides de carnero con acrosoma intacto sometidos a los distintos tratamientos durante la refrigeración a 5°C. Los valores son promedios, literales diferentes indican diferencias significativas dentro y entre tratamientos ($P < 0.05$).

VI. DISCUSIÓN

Los resultados que se obtuvieron del presente trabajo fueron afectados quizá, además del tratamiento con Melatonina, por la época del año en que las muestras de semen se colectaron, debemos recordar que esta especie es fotodependiente en su actividad sexual, por lo que la calidad del semen no es de la calidad que se podría esperar en la época de reproducción que es cuando los días son más cortos en la cantidad de horas luz., aun así los resultados muestran que el uso de Melatonina favorece a los espermatozoides de carnero. En un trabajo similar al presente, la adición de Melatonina 1 mM mejoró la motilidad progresiva de espermatozoides de carnero, refrigerados durante 48 horas, en comparación con el grupo testigo sin Melatonina (Ashrafi *et al.*, 2011); en el mencionado trabajo, solamente se evaluó la movilidad espermática. En otro trabajo con semen de carnero, se evaluó la adición de distintos niveles de Melatonina, al diluyente de congelación, sobre la supervivencia espermática al descongelado; se observó que la adición de Melatonina (0.1 y 1 mM) afectó de manera positiva la viabilidad espermática, distintos parámetros de la motilidad, la concentración intracelular de ATP, la integridad del ADN y su habilidad fertilizante (Succu *et al.*, 2011). A diferencia de los trabajos anteriores, en los que se ha evaluado el efecto de la adición de Melatonina en el semen refrigerado y congelado, otros autores han evaluado dicho efecto durante la incubación de los espermatozoides. Casao *et al.* (2010) probaron el efecto de 3 dosis de Melatonina, durante la incubación por 3 horas a 37°C, sobre la motilidad, viabilidad, estado de capacitación, translocación de fosfatidilserina y la fertilidad *in vitro*. Estos autores observaron que ninguna de las dosis estudiadas afectó la motilidad y la viabilidad, en cambio hubo una disminución en la proporción de espermatozoides capacitados y en aquellos con exposición de fosfatidilserina (cambio similar a la apoptosis). Además, con la dosis más baja (100 pM) se observó un incremento en las tasas de fertilización y posterior segmentación de los embriones.

Espermatozoides de cerdo fueron tratados con Melatonina (100 nM) y mantenidos a 37°C durante un periodo que varió de 3 a 12 horas; la motilidad, integridad de la

membrana y actividad mitocondrial fueron mayores en los grupos tratados con Melatonina que en aquellos sin Melatonina, además la tasa de desarrollo de los embriones provenientes de la fertilización *in vitro* con semen tratado con Melatonina se incrementó de manera significativa (Jang *et al.*, 2010). En espermatozoides de humano, incubados a 37°C en 5% de CO₂ durante 2 horas, la adición de Melatonina 2 mM aumentó el porcentaje de células móviles y el porcentaje de células con membrana plasmática intacta, asimismo redujo la cantidad de Oxido Nítrico (NO); sin embargo, no produjo cambios en la cantidad de ROS (du Plessis *et al.*, 2010).

Respecto a la administración de Melatonina directamente al macho para evaluar su efecto sobre el semen, Gavella *et al.* (2000) la administraron en forma de implantes exógenos en moruecos observando un efecto protector del daño oxidativo de los espermatozoides; asimismo, Ramadan *et al.* (2009) reportaron que la combinación de un tratamiento de fotoperiodo (día largo) y la administración de Melatonina (2 mg/animal/día) a machos cabrios maduros, mejoró la calidad del semen en términos de motilidad y concentración espermática, volumen del eyaculado, producción total de espermatozoides y la concentración sanguínea de testosterona.

El mecanismo por el cual la Melatonina mejora la calidad espermática cuando se adiciona al semen no está claro. Se ha propuesto que los efectos positivos de la Melatonina sobre la motilidad espermática y otras variables de calidad espermática se deben a su marcado efecto antioxidante, que previene los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno (Ashrafi *et al.*, 2011; Succu *et al.*, 2011). En apoyo a lo anterior se ha demostrado la presencia de Melatonina en el plasma seminal de carneros; su concentración mostró una alta correlación con la actividad de tres enzimas antioxidantes: glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa (Casao *et al.*, 2010).

Los receptores para Melatonina se han localizado a lo largo del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y recientemente en espermatozoides de hámster, hombre y carnero (Casao *et al.*, 2012). Estos autores sugieren que dichos receptores podrían tener múltiples funciones en los espermatozoides, de acuerdo a las diferencias en la distribución relativa de dichos receptores en la membrana plasmática.

La inseminación artificial con semen refrigerado es una alternativa viable siempre y cuando el periodo de refrigeración no se prolongue más allá de 48 horas (Purdy *et al.*, 2010). Salamon y Maxwell (2000) reportaron tasas de parición de 45–50%, 25–30% y 15–20% con semen almacenado durante 24, 48 y 72 horas, respectivamente. Ante este panorama, el empleo de antioxidantes como la Melatonina en la conservación de semen de carnero abre una posibilidad de aumentar la fertilidad.

VII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados muestran que la adición de Melatonina a espermatozoides de carnero, diluidos en un medio a base de Tris-yema de huevo, afecta positivamente su supervivencia después de ser conservados en refrigeración a 5° Centígrados durante 48 horas, en cuanto a los parámetros de Motilidad, Integridad de la membrana Plasmática (HOST) e Integridad del Acrosoma.

De los dos niveles de Melatonina empleados (1mM y 2 mM) se sugiere utilizar el 1 mM ya que los resultados no reflejan diferencia significativa entre ellos, por lo cual sería más económico la adición de este nivel de Melatonina.

Se recomienda continuar con esta línea de investigación en cuanto a probar el efecto de la adición de Melatonina durante el proceso de crioconservación; asimismo, probar la fertilidad del semen refrigerado o descongelado mediante la inseminación artificial de un número suficiente de ovejas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Aguado MJ, Cervigón M, Manso A, Pérez-Guzmán MD, Garde J. y Montoro V.1998 Estudio Preliminar del Poder Fecundante del Semen de Ovino Manchego Mantenido Durante 24 Horas en Refrigeración. *Producción Ovina y Caprina* • XXIII: 521-524
2. Aitken RJ. 1994. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fert. Dev.* 6:19-24.
3. Álvarez, JG, y Storey BT. 1989. Role of glutathione peroxidase in protectinbg mammalian spermatozoa from loss of motility caused by lipid peroxidation. *Gamete Res.*23:77-90.
4. Andrade AM, 2007.Concentraciones séricas de minerales y algunos parámetros productivos en ovejas Pelibuey lactando bajo cuatro mezclas de complementación mineral. Universidad Veracruzana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia.
5. Arbiza A. S.I.1986. Los caprinos en México. En *Producción de caprinos en México*. Cap. 2 Editor S.I. Arbiza A., AGT Editor, S.A. México D.F. pág. 47-75.
6. Ashrafi I, Kohram H, Naijian H, Bahreini M, Poorhamdollah M. 2011. Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5° C. *African Journal of Biotechnology* 10 (34): 6670-6674.
7. Aurich, U. Schonherr, H. Hoppe, C. Aurich.1997. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology* 48, 185–192.
8. Ax RL, Dally MR, Didion BA, Lenz RW, Love CC, Varner DD, Hafez B, Bellin ME.2002. Evaluación de semen e Inseminación artificial. De Hafez ESE Y Hafez b. “Reproducción e inseminación artificial en animales”. Séptima edición. Mc Graw Hill: 375-386.
9. Bag S, A. Joshi, P. S. Rawat, y J. P. Mittal. 2002. Effect of initial freezing temperature on the semen characteristics of frozenthawed ram spermatozoa in a semi-arid tropical environment. *Small Ruminant Res.* 43:23-29.

10. Bailey JL, A. Morrier and N. Cormier. 2002. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *In: Amino Acids: Meat, Milk and More Improving Animal Production with Reproductive Physiology. Symp. Can. Soc. Animal Sci., Quebec, Canada. pp: 87-95.*
11. Bailey JL y Buhr MM. 1994. Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci. 74: 45-51.*
12. Balcázar JA y Porras A. 2010. Manual de prácticas en manejo reproductivo en ovinos y caprinos. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad De Medicina Veterinaria y Zootecnia.
13. Bongiorno D, Ceraulo L y Ferrugia M. 2005. Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models. *J Pineal Res. 38:292-8.*
14. Casao A, Mendoza N, Perez R, Abecia J, Forcada F, Cebrian J y Muino T. 2009. Melatonin prevents capacitation apoptotic-like changes of spermatozoa and increases fertility rat. *J. Pineal research 2010; 48:49-46.*
15. Casao A, Vega S, Palacín I Pérez-Pe, R., Laviña, A., Quintín, F. J., Sevilla, E., Abecia, J. A., Cebrián-Pérez, J. A., Forcada, F., y Muino-Blanco, T. 2009. Effects of melatonin implants during non breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa aragonesa rams. *Reprod Domest Anim 45, 425-432.*
16. Casao A, Cebrian I, Asumpcao M, Perez-Pe R, Abecia J, Forcada F, Cebrian-Perez J y Muino-Blanco T. 2010a. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reproductive Biology and Endocrinology 8, 59.*
17. Casao A, Gallego M, Abecia JA, Forcada F, Perez-Pe R, Muino-Blanco T, y Cebrian-Perez JA. 2012. Identification and immunolocalisation of melatonin MT1 and MT2 receptors in Rasa Aragonesa ram spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development 24, 953-961.*
18. Castillo RH, Valencia ZM y Berruecos VJM. 1972. Comportamiento reproductivo del borrego Tabasco mantenimiento en clima tropical y subtropical. I. índices de fertilidad. *Tec. Pec. 20:52-56.*

19. Cervantes M. J. amalteafmvz.unam.mx/.../Anatomia%20y%20Fisiologia%20Aparato%20Reproductor.pdf. 2012
20. Cetz UFH, Cervantes TJI, Sauri DE, Bores QRA, y Castellanos RAF. 2005. Impacto en el empleo de microminerales quelados en la alimentación de rumiantes. *Livestock research for rural development*, 17 (9).
21. Chen T, Bhowmick S, Suttekk A y Toner M. 2002 the glass transition temperature of mixture of trehalose and hydroxyethyl starch. *Cryobiology* 44: 301-306.
22. Cormier N, Sirard MA y Bailey JL. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Andrology* 18: 461-468.
23. Cruz LC, Fernández-Baca S, Álvarez, LJA y Pérez RH. 1994. Variaciones estacionales en la presentación de la ovulación, fertilización y sobrevivencia embrionaria en ovejas Tabasco en el trópico húmedo. *Veterinaria. México*. 25:23-27.
24. Cruz. C 1991. Engorda de borregos Pelibuey en condiciones tropicales. Memorias de la tercera reunión de producción animal tropical CIEEGT-UNAM Martínez de la Torre, Veracruz, México. Pág. 29-37.
25. Dadoune JP y Demoulin A. 1993. Structure and functions of the testis. In: Thibault C, Levasseur MC, Hunter RHF, eds. *Reproduction in mammals and man*. Paris Ellipses.
26. De Lamirande E, Tsai C, Harakat A y Gagnon C. 1998. Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J. Andrology* 19:585-594.
27. De Leeuw F, Chen H y Colenberd L. 1990. Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*; 27: 172-183.
28. De Lucas TJ, Zarco QLA, González PE, Tórtora PJ, Villa GA y Vásquez PC. 2003. Crecimiento presdestete en corderos en sistemas intensivos de pastoreo y manejo reproductivo en el altiplano central de México. *Veterinaria México* 34:3

29. De Lucas J, Zarco LA, González PE, Tórtora PJ y Vásquez PC. 2009. Evaluación biológica de dos sistemas de apareamiento en ovinos de raza Columbia en producción intensiva. *Veterinaria*. México. 2009, vol.40, n.2 pág. 105-122.
30. De Lucas J, Zarco LA y Vásquez PC. 2008. El efecto macho como inductor de la actividad reproductiva en sistemas intensivos de apareamiento en ovinos. *Veterinaria*. México. 39, 117-127.
31. Delgadillo SJA, Flores CJA, Véliz DFG, Duarte MG, Vielma SJ, Poindron MP y Malpoux B. 2003. Control de la reproducción de los caprinos del subtrópico mexicano utilizando tratamientos fotoperiódicos y el efecto macho. *Veterinaria*. México. 34:1. Pág. 69-79.
32. Du Plessis SS, Hagenaar K y Lampiao F. 2010. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia* 42, 112–116.
33. Eriksson B y Rodríguez- Martínez H. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatbacks and maxi-straws. *Anim Reprod Sci* 63:205-220.
34. Evans G, Maxwell WMC. (1990) inseminación artificial de ovejas y cabras. Ed. Acribia S.A. Zaragoza España.
35. Flesch FM, Colenbrander B, van Golde LM y Gadella BM. 1999. Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar sperm plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262:787-792.
36. Foote Robert H 2003. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*. 75 119-139.
37. Galina MA y Guerrero M. 1993. La Ganadería Mexicana. Características y perspectivas del sector. *Avances e Investigación Agropecuaria* 1 (2) 13-40.
38. García E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, pág., 137.
39. Gavella M y Lipovac V. 2000 Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. *Arch Androl* .44:23–7.

40. Graham JK y Mocé E. 2005 Fertility evaluation on frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64:492-504.
41. Hafez, 2000. Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición. Editorial McGraw Hill.
42. Hammerstedt RH, Graham JK y Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Andrology*; 11:73-88.
43. Handrow RR, First NL y Parrish JJ. 1989. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. *J. Exp. Zoo*. 252:174-182.
44. Hanhn J, Stouffer JR y Foote RH. 1990. Ultrasonographic and other testicular characteristics of Holstein bulls revised. *J. Reprod. Dev.* 45, 4005-410.
45. Hernández A y González EU. 2010. Evaluación y mejoramiento de los sistemas de producción en pequeños rumiantes (*Capra hircus* y *Ovis aries*) en 5 Municipios del Estado de Michoacán. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
46. Hernández JL. 2010. Fertilidad en ovejas de pelo sincronizadas con Acetato de Medroxiprogesterona y Gonadotropina Corionica Equina. Universidad Veracruzana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
47. Holt WV 2009. Is Semen Analysis Useful to Predict the Odds that the Sperm will Meet the Egg? *Reprod Dom Anim* 44 (Suppl. 3) 31-38.
48. Holt WV. 1996. Can we predict fertility rates? Making sense of sperm motility. In: Rath D, Johnson LA, Weitze KF, eds. *Reproduction in domestic animals*. Blackwell science; 3:37-47.
49. Holt WV. 2000. Fundamental aspects as sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53 (1), 47-58.
50. Johnson L. 1991. Spermatogenesis. In: Cupps PT, ed. *Reproduction in domestic animals*. 4th ed. San Diego, CA: Academic Press. 174-2006

51. Jones R, Mann T y Sherins R. 1979. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 31:531-537.
52. Jou MJ, Peng TI y Reiter RJ. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress induced apoptosis in rat brain astrocytes. *J Pineal Res* 2004;37:55-70
53. Kenan Cayan, Nuri Baspınar, Mustafa Numan Bucak, Pınar Peker Akalın, Mehmet Bozkurt Ataman, Ali Dog an Omur, Sukru Gungor, Sadık Kucukgunay, Birol Ozkalp y Serpil Sarıozkan. 2010 Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. *Research in Veterinary Science* 89 (2010) 426-431
54. Langlais J y Roberts KD. 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res.* 12:183-224.
55. Locksley E, Yang H y Walterson M 1988. Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology.* 25: 178-185.
56. López A, Ortiz N, Gallego, L y Garde J. Efecto comparativo de tres diluyentes sobre la viabilidad del semen de morueco conservado a 5° C. II: 59-66 I. 1997. *I Congreso Ibérico de Reproducción Animal.* Estoril (Portugal). II 61-66.
57. Luboshitzky R, Shen-Orr Z y Herer P 2002. Seminal plasma melatonin and gonadal steroids concentrations in normal men. *Arch Androl* 2002; 48:225-232.
58. Macedo y Alvarado, 2005. Efecto de la época de la monta sobre la productividad de ovejas Pelibuey bajo dos sistemas de alimentación en Colima, México. *Arch. Zoot.* 54:51-62.
59. Maxwell W, Watson P. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Repro Sci* 42: 55-65.
60. Maxwell y Stojanov, 1996. Liquid Storage of Ram Semen in the Absence or Presence of Some Antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1996, 8, 1013-20.

61. Medrano 2008. Principios y perspectivas de la conservación de espermatozoides. En reproducción de ovejas y cabras de Soto y Medrano, 2008 ED. UNAM.
62. Morrier A, Castonguay F, y Bailey, J. 2002. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. *Can. J. Anim. Sci.* 82:347-356.
63. Morteo GR, González GR, Torres HG, Nucio OG, Becerril PCM, Gallegos SJ y Aranda IE. 2004. efecto de la variación fenotípica en la resistencia de corderos Pelibuey a la infestación con nematodos gastrointestinales. *Agrociencia*, 38: 395-404.
64. Oestermaier G, Saitor R, Susko JK y Parrish JJ. 2000. Bull fertility and sperm nuclear shape. *Andrology*. 22:45,595-603.
65. Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, Varago FC Y Lagares MA. 2010. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 118:2,194-200.
66. Palma. J. M; Rosado J; Galina. M. y Espinoza R. 1995. Algunas observaciones sobre la producción de carne de ovino en trópico. *Memorias del curso producción animal en trópico*. Colima, Col. México pág. 29-35.
67. Patist A, Zoerb H. 2005. Preservation mechanism of threalose in food and biosystems. *Colloids and surface B. biointerfaces* 40:107-113.
68. Pérez CR y Porras AA 2009. Ovinos. En reproducción de animales domésticos de Galina y Valencia. ED Limusa.
69. Pérez, LJ, Valcárcel A, de las Heras M. A, Moses D y Baldassarre H. 1997. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of espermatozoa. *Theriogenology* 47:549-558.
70. Purdy PH, Mocé E, Stobart R, Murdoch WJ, Moss GE, Larson B, Ramsey S, Graham JK y Blackburn HD. 2010. The fertility of ram sperm held for 24 h at 5°C prior to cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 118, 231–235.

71. Piña Cárdenas Benjamín A. 2005. Situación actual y perspectivas en México y Veracruz, ovinocultura de carne. *Agroentorno*, 61 (8): 24-25
72. Polge C, Smith AU y Parks AS. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Citado por Medrano 2008. Principios y perspectivas de la conservación de espermatozoides. En reproducción de ovejas y cabras. ED UNAM.
73. Quiroz Romero Héctor. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos Noriega Editores. México D.F. pág. 24-27
74. Ramadan TA, Taha TA, Samak MA y Hassan A. 2009. Effectiveness of exposure to long day followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology* 71, 458–468.
75. Robaire B, Pryor JL y Trasler JM 1995. What is semen? How does semen analysis assist in understanding the reproductive status of the male? Eds. *Handbook of andrology*. Am Soc Andrology.
76. Ruiz GL, Santiani AA, Sandoval MR, Huanca LW, Delgado CA, Coronado SL y Alzamora PC. 2005. Efecto de dos antioxidantes (Tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleando un dilutor en base a tris. *Veterinaria Perú* 18:2, 99-106.
77. Salamon, S. y Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:77-111.
78. Sandoval RM, Santiani AA, Ruiz GL, Leyva VV, Coronado SL y Delgado CA. 2007. Ovine Semen Cryopreservation Using Three Extenders and Four Combinations of Permeants and Non Permeant Agents *Rev Vet Peru* 2007 18: 107-114.
79. Santiani, A. 2003. Criopreservación de semen ovino: Efecto de la adición de antioxidantes al diluyente Tesis de Maestría en Ciencias. Temuco, Chile. Facultad de Medicina Universidad de la Frontera 95 pág. Citado en Efecto de dos antioxidantes (Tempo y tempol) en la criopreservación de semen ovino empleado en base a tris. 2005. De Ruiz GR, Santiani AA, Sandoval

- MR, Huanca LW, Delgado CA, Coronado SL y Alzamora PC. Veterinarioa Perú 18:2, 99-106.
80. Sarmiento FL, Aguayo AA, Montes PR, Segura SJ y Rodríguez RO. 1998. Efecto de la presencia del macho sobre la aparición del primer estro posparto en ovejas Pelibuey. Rev. Biomed. 9: 97-102.
81. Shang X, Huang Y, Ye Z, Yu X y Gu W. 2004. Protection of melatonin against damage of sperm mitochondrial function induced by reactive oxygen species. Zhonghua Nan Ke Xue. 10:604-7.
82. SIAP-SAGARPA. 2010 Estadísticas del Sector Agropecuario. Coordinación General de Ganadería. <http://www.sagarpa-siap.gob.mx>
83. Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG y Naitana S. 2011. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. J. Pineal Res. 50, 310-318.
84. Suzuki k, Drevet J, Hinton BT, Huhtaniemi I, Lareyre JJ, Matusik RJ, Pons E, Poutanen M, Sipila P y Orgebin-Crist MC. 2004. Epididymis-specific promoter-driven gene targeting: a new approach to control epididymal function? Mol Cell Endocrinol. Mar 15; 216 (1-2): 15-22.
85. Vadnais ML, Kirkwood RN, Specher DJ y Chow K. 2005. Effects of extender, incubation temperature, and added seminal plasma on capacitation of cryopreserved, thawed boar sperm as determined by chlortetracycline staining. Anim. Reprod. Sci. 90:347-354
86. Valencia ZM, Heredia AM y González PE. 1981. Estacionalidad reproductiva en hembras Pelibuey. Memorias de la VII reunión de la asociación Latinoamericana de producción animal (ALPA) Santo Domingo 10-14 (8). Republica Dominicana.
87. Vera http://www.avpa.ula.ve/docuPDFs/libros_online/libro_reproduccionbovina/cap15.PDF
88. Wang, 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology*, 49, 921-925.
89. Watson PF. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim Repro Sci 60-61: 481-492.

IX. ANEXOS

SOLUCIÓN DE TRANSPORTE	
Tris (hidroximetilamino-metano)	5.814 g
Glucosa	0.800 g
Acido Cítrico (Monohidratado)	3.184 g
Penicilina	100,000 UI
Agua destilada (aforar a)	100 mL
Tomado de Evans y Maxwell (1990)	

DILUYENTE TRIS-YEMA DE HUEVO	
Tris (hidroximetilamino-metano)	300 mM
Glucosa	28 mM
Acido Cítrico	95 mM
Yema de huevo	15 %
Bencil-Penicilina	0.06mg/ml
Modificado de Sánchez-Partida <i>et al.</i> (1998)	

SOLUCIÓN HIPOSMÓTICA (60 mOsm/Kg)
Preparación a partir de una solución isosmótica de NaCl (SSF 0.9%) 300mOsm/kg.
Dilución con agua destilada 1 + 4 v/v (SSF + agua destilada)
Preparación de 100ml:
20 mL de solución salina fisiológica + 80 mL de agua destilada.