

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE TEMUCO  
FACULTAD DE ACUICULTURA Y CIENCIAS VETERINARIAS  
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA.



**EFFECTO DE LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA SOBRE LA CALIDAD DE SEMEN DE  
CARNERO CONGELADO.**

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos  
para optar al grado de Licenciado en Medicina Veterinaria.

**EUGENIO FELIPE GARCÍA RUIZ**  
**TEMUCO-CHILE**  
**2004**

**Profesor Guía**

Dr. Néstor Sepúlveda Becker.

\_\_\_\_\_

**Profesor co-guía**

Marcela Rosa Andaur Rademacher

\_\_\_\_\_

**Informante interno**

Marco Antonio Berland Olea

\_\_\_\_\_

**Informante externo**

Jennie Marianne Risopatrón González

\_\_\_\_\_

**Unidad académica**

Reproducción Animal.

## ÍNDICE DE MATERIAS

---

<b>CONTENIDO</b>	<b>PÁGINA</b>
1. Resumen	09
2. Summary	10
3. Introducción	11
4. Hipótesis	14
5. Objetivo general	14
6. Objetivos específicos	14
7. Revisión bibliográfica	15
7.1 Antecedentes generales	15
7.2 Factores que influyen en la producción de espermatozoides	16
7.2.1 Edad	16
7.2.2 Raza	16
7.2.3 Estación reproductiva	17
7.2.4 Nutrición	17
7.2.5 Sanidad	18
7.3 Factores de manejo que influyen en la calidad seminal	18
7.3.1 Métodos de extracción de semen	18
7.3.2 Criopreservación del semen	19
7.3.3 Técnicas de selección espermática	21
8. Material y método	24
8.1 Lugar de estudio	24

8.2 Inicio y duración del estudio	24
8.3 Animales	24
8.4 Obtención de la muestra	24
8.5 Medio d cultivo	25
8.6 Preparación de la muestra	25
8.7 Métodos de selección espermática	26
8.7.1 Swim-up	26
8.7.2 Filtración con fibra de vidrio	28
8.8 Evaluación espermática	29
8.8.1 Concentración	29
8.8.2 Motilidad	29
8.8.3 Viabilidad (VI), Integridad acrosomica (VAI)	30
8.9 Método de congelación	31
8.10 Descongelación del semen	32
9. Análisis estadístico	33
10. Resultados	34
10.1 Concentración total media pre-congelación	34
10.2 Motilidad progresiva pre-congelación	35
10.3 Viabilidad e integridad acrosomica pre-congelación	36
10.4 Concentración total media post-descongelado	38
10.5 Motilidad progresiva post-descongelado	38
10.6 Viabilidad post-descongelado	40
11. Discusión	42

12. Conclusiones	47
13. Anexos	48
14. Bibliografía	54

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Porcentajes de motilidad progresiva previo al proceso de congelación.	36
2. Porcentajes promedio de espermatozoides viables previo al proceso de congelación.	37
3. Porcentajes de motilidad progresiva post-descongelado.	39
4. Porcentajes de viabilidad post-descongelado.	41
.	
.	

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Sistema de Valoración de la motilidad en masa para semen ovino (Ax y col., 2000).	25
2. Categorías de espermatozoides de ovino con doble tinción.	30
3. Efecto de los métodos de selección espermática en la concentración total media de espermatozoides ovinos previo al proceso de congelación.	34
4. Efecto del método de selección espermática en la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos previo al proceso de congelación.	35
5. Efecto de los métodos de selección espermática en la viabilidad sobre la viabilidad e integridad acrosómica previo al proceso de congelación.	37
6. Efecto de los métodos de selección espermática en la concentración total media de espermatozoides ovinos descongelados.	38

7. Efecto de los métodos de selección espermática en motilidad progresiva de espermatozoides ovinos descongelados. 39
  
8. Efecto de los métodos de selección espermática en la viabilidad e integridad acrosómica de espermatozoides ovinos descongelados. 40

## 1. Resumen

El propósito de este trabajo fue comparar el efecto de dos métodos de selección espermática sobre la calidad del semen de ovino antes y después del proceso de congelamiento-descongelamiento. Se obtuvieron 20 eyaculados por medio de vagina artificial de cuatro carneros y se utilizaron aquellos con concentraciones superiores a  $2,0 \times 10^9$  y una motilidad (M) superior al 70%. Posteriormente las muestras fueron diluidas en medio de cultivo HTF en relación 1:3 y fraccionadas para formar tres grupos: un grupo control (C) sin selección espermática, un segundo grupo sometido a filtración con fibra de vidrio (FV) y un tercero seleccionado por swim-up (SU). Los resultados mostraron una mejor motilidad y viabilidad (V) ( $p < 0,05$ ) en el semen seleccionado por FV (M=86,3%; VI=80,4%) y en el semen seleccionado por swim-up (M=85,0%; V=77,7%) comparado con el grupo control (M=75,6%; V=73,3%). Posteriormente, el semen fue diluido y congelado utilizando yema de huevo, leche descremada y glicerol (2M) como crioprotector. El semen se mantuvo congelado por 24 horas en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), descongelado y evaluado nuevamente. Los resultados obtenidos después de la descongelación mostraron una mejor calidad de seminal ( $p < 0,05$ ) en el grupo FV (M=39,4%; V=44,1%) comparado con el grupo control (M=34,4%; V=36,4%) y el grupo SU (M=20,6%; V=24,1%). En conclusión la selección espermática utilizando el método de fibra de vidrio fue un método eficiente para mejorar la calidad seminal antes y después del proceso de congelación y descongelación.

Palabras claves: ovino, semen, espermatozoides, selección espermática.

## 2.SUMMARY

The aim of this study was to comparing two methods of spermatic selection in relation to a semen quality before and after the process of frozen-thawed. From 4 rams were obtained 20 ejaculated using an artificial vagina. Were utilized ejaculated with a concentration up to  $2.0 \times 10^9$  and motility up to 70%. The semen sample were diluted in HTF medium 1:3 and divided in three groups: no selected semen (control group=C); spermatic selection using glass wool (FV) and spermatic selection using swim up (SU). Results obtained show a better ( $p < 0.05$ ) motility (M) and viability (V) in semen selected by FV (M=86.3%; V=80.4%) and selected by SU (M=85.0%; V=77.7%) compared with in control group (M=75.6%; V=73.3%), After this, semen was diluted and frozen using egg yolk, milk and glycerol (2M). 24 hours after the straws were thawed and evaluated. Results obtain after thawed show a better ( $p < 0.05$ ) semen quality in FV group (M=39.4%; V=44.1%) compared with control group (M=34.4%; V=36.8%) and swim-up group (M=20.6%; V=24.1%). In conclusion the spermatic selection using glass wool method was a efficient methods for improve the seminal quality before and after the process of frozen-thawed.

### 3. Introducción

La producción de carne ovina en Chile en la última década ha experimentado fuertes fluctuaciones, ya que el consumo interno per capita no ha tenido un comportamiento homogéneo en su demanda. Sin embargo, hoy en día existe conciencia del potencial que representan los tratados de libre comercio (TLC) con los Estados Unidos y la comunidad económica europea sobre la demanda de carne ovina, la cual en el caso del TLC con EE.UU, gozara de la liberación inmediata de aranceles sin pago extraordinario de cuotas. Por estas razones, Chile deberá en un mediano plazo, aumentar la población ovina, mejorar la calidad de sus animales y de las condiciones sanitarias de los mataderos de modo de poder cumplir las exigencias de los mercados internacionales. De igual manera, los países que hoy lideran el manejo, comercialización y gestión empresarial del cordero, tienen la fortaleza económica de ofrecerlo al mercado en toda la temporada, y no en forma estacional como en Chile.

Lo anterior demuestra el alto interés científico y económico que tiene este animal para el desarrollo del país. Por estas razones, el avance en genética ganadera ovina tendrá que tener un gran desarrollo en los próximos años, para así mejorar los caracteres hereditarios de interés productivo, como mayor calidad y producción de carne, leche y lana, entre otros. En este ámbito, la inseminación artificial es una herramienta que permite realizar un manejo reproductivo eficiente y que juega un rol importante en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, una de las mayores limitantes para el desarrollo de la inseminación

artificial ovina, son las malas tasas de fertilidad que presenta el semen crioconservado con respecto al semen fresco. Es por ello que la inseminación artificial con semen congelado no es un método ampliamente utilizado en esta especie.

La explicación para la baja fertilidad al usar semen congelado es que la proporción de espermatozoides viables es reducida como consecuencia de procesos como enfriamiento, congelamiento y descongelamiento, ya que estos procesos generalmente tienden a disminuir el porcentaje de células móviles como resultado del daño celular (Quinn y col., 1969). Por lo anteriormente expuesto, es fundamental partir con una buena calidad inicial del semen antes de congelarlo, esto implica una buena motilidad, concentración y formas normales de los espermatozoides del eyaculado. La calidad seminal del carnero se encuentra influenciada por diversos factores tales como: estacionalidad reproductiva, método de colección de semen, estado nutricional, sanidad, entre otros. En este sentido, en los procesos de colección de semen se han encontrado diferencias tanto físicas como químicas del eyaculado. Por ejemplo, la colección con electroeyaculador produce muestras de bajo volumen muy contaminadas con bacterias, células y desechos, en comparación a la extracción con vagina artificial que entrega semen de mejores características (Mc Donald, 1991).

Las técnicas de selección espermática son métodos que permiten la recuperación y selección de espermatozoides móviles y de formas normales desde el eyaculado. Para ello diferentes métodos de selección espermática han sido descritos en las diferentes especies, siendo los más utilizados: los lavados

repetidos (Fukuda y col., 1990); swim-up (Parrish y col., 1987); gradiente de percoll (Bielanski y col., 1992); y filtración a través de fibra de vidrio (Stabbing y col., 1991). De igual manera, las técnicas de selección espermática, permiten mejorar la longevidad del semen fresco, como también mejoraría la calidad del semen crioconservado (Sieme y col., 2003). Por estas razones, es indispensable el estudio de técnicas de selección espermática, ya que estas no sólo permitirían mejorar la calidad del semen crioconservado, además, permiten la recuperación de espermatozoides de alta calidad desde el eyaculado independientemente del método de extracción de semen utilizado y del estadio reproductivo en que se encuentre el carnero.

De igual manera, en la aplicación de técnicas reproductivas, como es la fecundación in vitro (FIV) y la inseminación artificial (IA), también se requiere de técnicas de selección espermática que permitan la recuperación de espermatozoides móviles, de formas normales e integridad funcional y libres de plasma seminal, parámetros que se correlacionan eficientemente para predecir la capacidad fecundante de los espermatozoides (Carlsson y col., 1997).

En ovinos, a diferencia de otras especies, la literatura no describe la utilización de técnicas de selección espermática. Es por ello que el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la selección espermática, sobre la calidad del semen antes y después del proceso de congelamiento-descongelamiento. Para este trabajo se eligieron los métodos de selección espermática swim-up y filtrado con fibra de vidrio, ya que estas dos técnicas presentan un bajo costo de ejecución, como también un relativo grado de sencillez su montaje.

#### **4. Hipótesis.**

La aplicación pre-congelación de las técnicas de selección espermática swim-up y filtrado con fibra de vidrio, mejoran la calidad del semen ovino antes y después del proceso de congelación.

#### **5. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la aplicación pre-congelación de dos métodos de selección espermática distintos, sobre la calidad del semen ovino antes y después del proceso de congelación.

#### **6. Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto de la técnica de selección espermática swim-up, realizada pre-congelación, sobre la calidad del semen antes y después del proceso de congelación.
2. Determinar el efecto de la técnica de selección espermática filtración con fibra de vidrio, realizada pre-congelación, sobre la calidad del semen antes y después del proceso de congelación.
3. Comparar la tasa de recuperabilidad y calidad seminal, entre ambas técnicas de selección espermática, antes y después del proceso de congelación.

## **7. Revisión bibliográfica.**

### **7.1 Antecedentes generales.**

El ovino es un animal de producción múltiple entre las que cuentan la lana, la carne, leche y piel, para no decir de otras tan dispares como el cebo y el proporcionar materiales para la producción de jabón (Bywater y Rowlands, 1970).

Hoy día se distribuyen en el mundo más de novecientas razas ovinas. Nuestra región se caracteriza por tener alrededor de 400 mil cabezas ovinas, las cuales en su mayoría pertenecen a una raza criolla, derivada de las razas europeas introducidas hace varios siglos (Sepúlveda, 1993).

Hasta hace poco los estudios sobre los factores que controlan la actividad reproductiva en el ovino, principalmente aquellos que ponen especial atención en el desarrollo de métodos para superar la estacionalidad de cría normal se han concentrado en gran parte en la oveja. Sin embargo, es evidente que los problemas de menor fertilidad que pueden presentarse en programas de reproducción controlada, en particular aquellos que involucran reproducción fuera de la estación de cría, no se limitan a la hembra, sino que involucran al carnero, el cual también sufre fluctuaciones estacionales en su actividad reproductiva (Lincoln y Short, 1980).

La variación en la capacidad reproductiva puede atribuirse a factores tales como la cantidad y calidad de semen producido, el impulso y la actividad sexual

influenciados hormonalmente, la eficiencia copulatoria, las preferencias copulatorias, las preferencias en el apareamiento y a otros factores no menos importantes como la edad, salud o el excesivo engrasamiento de los machos (Fraser y Stamp, 1987).

## **7.2 Factores que influyen en la producción de espermatozoides.**

El semen esta constituido por una mezcla de espermatozoides producidos en los testículos y de líquido seminal generado por las glándulas anexas. Sin embargo, la producción de espermatozoides puede variar por factores inherentes al animal como: edad, raza, y externos al mismo como: estación reproductiva, nutrición, estado sanitario, etc. (Daza, 1997).

### **7.2.1 Edad**

Después de la pubertad el tamaño testicular y, por lo tanto, la producción espermática aumenta con la edad del carnero de modo que la fertilidad, medida por numero de ovejas fecundadas, se incrementa hasta los 4-5 años para declinar después debido a una disminución significativa de la calidad del semen producido (Daza, 1997).

### **7.2.2 Raza**

También entre razas se dan variaciones en los parámetros seminales y entre individuos de una misma raza (Daza, 1997).

### 7.2.3 Estación reproductiva

Generalmente se admite que aunque el carnero produce semen a lo largo de todo el año, su actividad sexual alcanza su máximo en otoño y su mínimo en primavera, pudiendo reducirse la fertilidad en el periodo anual de días decrecientes.

La experiencia realizada con distintas razas ha demostrado que durante los días con mayor cantidad de horas luz (primavera y verano) las concentraciones plasmáticas de FSH, LH y testosterona son más bajas que durante los días de menor número de horas luz (otoño e invierno), determinando una regresión del tamaño testicular y una disminución del diámetro de los túbulos seminíferos y, como consecuencia, una menor producción diaria de espermatozoides (Daza, 1997).

Por la estación reproductiva, la concentración espermática parece afectarse más que la motilidad y viabilidad, pero en general, las anomalías morfológicas son más frecuentes en primavera que en otoño. Por estas razones, se explica la menor fertilidad cuando se utiliza la inseminación artificial con semen colectado en primavera comparado con el obtenido en otoño (Colas, 1980). En este contexto, se ha encontrado que el periodo otoño-invierno influye positivamente sobre la motilidad de los espermatozoides post-descongelado (D'Alessandro y col., 2003).

### 7.2.4 Nutrición.

Los estados de desnutrición, traen como consecuencia el mal funcionamiento glandular, con disminución en el aporte hormonal especializado y consecuente disminución en la producción de espermatozoides (Méndez, 1998).

### **7.2.5 Sanidad.**

Todas las enfermedades febriles, en función del aumento de la temperatura, alteran visiblemente la espermatogénesis y en casos extremos (aftosa por ejemplo) pueden provocar la esterilidad. Las parasitosis externas y/o internas, según sea la entidad de ellas, también influyen negativamente. Las lesiones testiculares (epididimítis, atrofia, degeneración seminal, etc) son quizás por su gravedad y frecuencia las más peligrosas pudiendo provocar agudos casos de infertilidad y/o esterilidad. En general todo deterioro de la salud es proclive a incidir negativamente sobre la calidad del semen (Durán del Campo, 1993).

## **7.3 Factores de manejo que influyen en la calidad seminal.**

### **7.3.1 Métodos de extracción de semen.**

La extracción de semen puede realizarse por medio de dos métodos: por vagina artificial o por estimulación eléctrica del tracto genital del macho. Las características de las muestras obtenidas difieren notablemente en su composición física y bioquímica de acuerdo al método empleado en la recolección (Mc Donald, 1991).

La electroeyaculación tiene una importante limitación, que consiste en el frecuente fracaso del carnero para extender su pene mientras se encuentra bajo estimulación, que da como resultado la eyaculación dentro de la vaina prepucial. Esto produce una muestra de bajo volumen muy contaminada con bacterias, células

y desechos (Mc Donald, 1991). Además, este método de extracción produce algunos efectos indeseables como: intensas contracciones musculares, balidos excesivos, hemorragias rectales y un alto riesgo de contaminación por orina.

### **7.3.2 Criopreservación del semen.**

Es bien sabido que durante el proceso de criopreservación se produce una disminución aproximada del 50% en la viabilidad espermática, debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, ocurriendo cambios en la organización morfológica de las células, tales como la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el líquido intracelular (Thomas y col., 1998).

Cuando una célula se coloca en un medio acuoso y este se enfría a temperaturas inferiores a 0°C, la formación de cristales de hielo se inicia en el medio extracelular. La cristalización de agua en el citoplasma se inicia normalmente antes de alcanzar -1°C, pero la célula permanece sin congelarse hasta temperaturas cercanas a los -10°C a 15°C. Este fenómeno se denomina superenfriamiento celular. (Mazur, 1970).

Como los cristales que se forman son de agua pura, se produce una concentración de solutos en el extracelular (fenómeno termodependiente), esto significa que, a medida que disminuye la temperatura, se produce un incremento en la formación de hielo y por ende aumenta la concentración del medio extracelular. Una célula sometida a tales condiciones responde osmóticamente, dejando salir

agua a través de su membrana con el fin de igualar la concentración de solutos. Durante la congelación la célula sufre deshidratación, tendiendo así a igualar la diferencia del potencial químico entre el medio intracelular súper enfriado y el extracelular hipertónico (Mazur, 1970).

Si bien la congelación del semen es una estrategia necesaria, un mal manejo de esta puede producir daño por factores tales como la formación de cristales de hielo y el efecto solución.

La producción de cristales de hielo es un fenómeno producido por una inadecuada deshidratación de la célula lo cual, a su vez estaría influenciado por factores como, la tasa de enfriamiento, la relación superficie volumen de la célula, la constante de permeabilidad celular y el coeficiente de temperatura de dicha constante. Esta situación ha llevado a sugerir que la formación de hielo intracelular sería el factor responsable de la muerte celular, o que la deshidratación, por si misma sería la causante de dicha muerte (Garner, 1991).

Por otra parte el efecto solución daña a la célula cuando la velocidad de enfriamiento es más lenta que la óptima. Esto traería como consecuencia que la célula aun no congelada esté sometida a altas concentraciones de sales por largos periodos de tiempo. Como se mencionó anteriormente, la concentración de sales en el medio de suspensión donde se encuentran las células, va aumentando simultáneamente con la formación de cristales de hielo, en la medida que disminuye la temperatura (Garner, 1991; Mc Laughlin y col., 1992).

### **7.3.3 Técnicas de selección espermática.**

La selección espermática es un mecanismo natural en todas las especies y está asociada al transporte de los espermatozoides en las vías del aparato reproductivo de la hembra, constituyendo un proceso dinámico que busca mejorar la calidad del espermatozoide por medio de mecanismos físicos y químicos efectuados en forma paulatina en los diferentes órganos reproductivos como: la vagina, el cervix, el útero y el oviducto (Hafez, 1987). En este contexto, Nani y col. (2001) reportan que la mucosidad cervical permite el paso selectivo de espermatozoides motiles y con formas normales antes de que éstos migren por el cervix.

Hoy en día es sabido que a mayor cantidad de espermatozoides motiles, los porcentajes de fertilidad aumentan, ya que éstos tienen mayor capacidad de interactuar con el ovocito después de la inseminación (Carlsson y col., 1997). Por estas razones, el hombre ha debido implementar técnicas de selección espermática que permitan la recuperación de espermatozoides motiles, de formas normales y libres de contaminantes del plasma seminal (Risopatrón y col., 1996).

La evaluación de nuevos métodos de selección espermática, en las diferentes especies, es una etapa importante de considerar previo a la aplicación de técnicas reproductivas como fecundación in vitro (FIV) e inseminación artificial (IA). En este contexto, se darán a conocer a continuación, algunos resultados obtenidos por diversos autores que han evaluado la efectividad de los diferentes métodos de selección espermática.

Van der Ven y col. (1988) evaluaron en humanos dos técnicas de selección espermática, filtración con fibra de vidrio y swim-up obteniendo mejores resultados, en cuanto a la recuperación de espermatozoides motiles y de formas normales, con la técnica de filtración con fibra de vidrio. Por su parte, Larson y col. (1999) compararon la selección espermática por filtración con fibra de vidrio v/s la gradiente de centrifugación, concluyendo que la segunda, permite una mayor recuperación de espermatozoides motiles y de formas normales, sin embargo, la filtración, conserva en mayor medida la integridad de la cromatina otorgando una mejor viabilidad espermática.

Con relación a esto, Nani y col. (2001) reportan que la recuperación de espermatozoides humanos por filtración a través de fibra de vidrio mejora ostensiblemente la calidad del eyaculado original como también hay una mayor unión de los espermatozoides a la zona pelúcida.

Por otra parte, Esteves y col. (2000) estudiaron la utilización del método de selección espermática swim-up sobre la calidad del semen humano antes y después del proceso congelación, concluyendo que los espermatozoides antes de congelar mejoran tanto su motilidad como la viabilidad, pero no así el porcentaje de acrosomas intactos. Sin embargo, los espermatozoides post-descongelado, además de presentar mejores índices de motilidad y viabilidad, presentaron mejor porcentaje de acrosomas intactos.

Finalmente, Trentalance y col. (2002) compararon las técnicas de swim-up v/s gradiente de percoll, llegando a la conclusión de que ambos métodos de

selección eran eficaces para la recuperación de espermatozoides humanos de alta calidad, lo cual es ideal para una posterior crioconservación. En este sentido, Sieme y col. (2003) reportan que las técnicas de selección espermática swim-up como filtración con fibra de vidrio en semen de potro, mejoran tanto la calidad del semen fresco, como la del crioconservado.

De acuerdo a los datos anteriormente expuestos, la aplicación de técnicas de selección espermática, previo al proceso de congelación, permitirían mejorar la calidad espermática antes y después del proceso de congelación.

## **8. Material y método**

### **8.1 Lugar de estudio**

El estudio se realizó en el laboratorio del centro de Biotecnología de la Reproducción (CEBIOR) de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Frontera de Temuco, y la colección de semen se efectuó en el Bioterio de la misma Universidad.

### **8.2 Inicio y duración del estudio**

El presente estudio se inició en noviembre del 2003 y se extendió hasta abril del año 2004.

### **8.3 Animales**

Se utilizaron cuatro carneros de la raza Romney Marsh pertenecientes a la Universidad de La Frontera.

### **8.4 Obtención de la muestra**

Semen fresco de cuatro carneros adultos fueron utilizados en este estudio. Los eyaculados (n=20), fueron colectados mediante vagina artificial y transportados en copas manteniendo una temperatura de 37° C y llevados inmediatamente al laboratorio para su análisis.

## 8.5 Medio de cultivo

El medio utilizado para este estudio fue el medio de cultivo HTF (Human tubarian fluid). (Quinn y col., 1985). (anexo1).

## 8.6 Preparación de la muestra

Una vez colectadas las muestras, se evaluó el patrón de movimiento en masa con la ayuda de un microscopio a una amplificación de 100x, de acuerdo a lo descrito por (Ax y col., 2000). En la tabla 1 se presentan los patrones de movimiento. Posteriormente se realizó el recuento de espermatozoides en una cámara de Neubauer. Para formar el pool de semen de trabajo se seleccionaron únicamente aquellas muestras con un patrón de movimiento de masa superior a 3 y con una concentración mayor a  $2,0 \times 10^9$  células/ml. Una vez obtenido el pool, se efectuó la dilución del semen nativo con medio de cultivo HTF, para luego proceder con la selección espermática a través de los métodos de swim-up y filtrado con lana de vidrio.

Tabla 1. Sistema de Valoración de la motilidad en masa para semen ovino (Ax y col., 2000)

Escala	Clase	Patrón de movimiento
0	Muertos	Inmovilidad total
1	Muy pobre	Movimiento individual
2	Pobre	Movimiento de ondas muy lento
3	Regular	Movimiento de ondas general, poca amplitud
4	Bueno	Movimiento rápido de ondas
5	Muy bueno	Movimiento rápido de ondas con remolinos

## 8.7 Métodos de selección espermática.

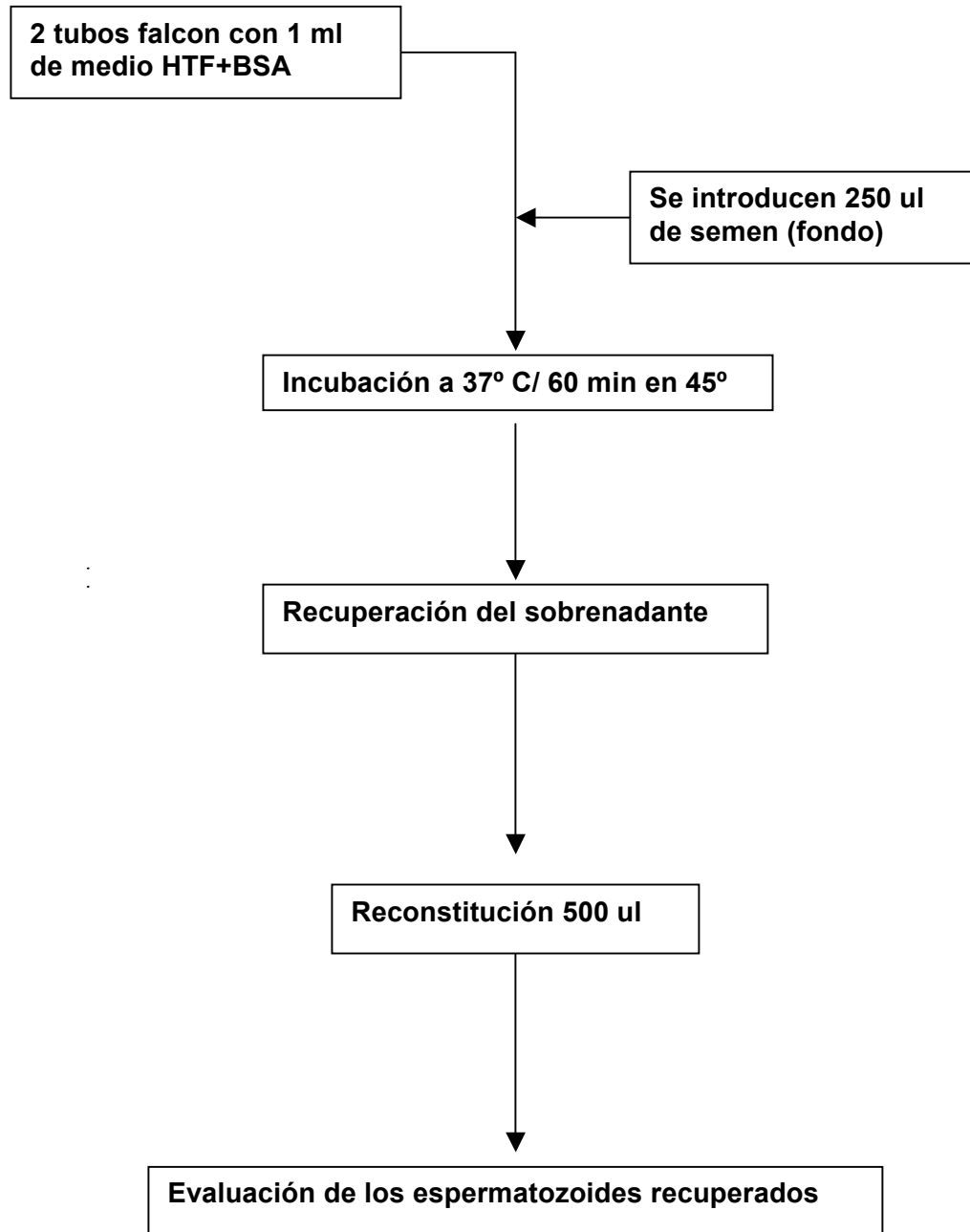
En cada ensayo swim up y filtración con fibra de vidrio (n = 20) se utilizó semen diluido en medio HTF en volúmenes de hasta 500  $\mu\text{l}$  y con concentraciones aproximadas de  $1,0 \times 10^9$  células/ml.

### 8.7.1 Swim-up simple (SU)

Este método de selección espermática se basa en la migración que experimentan los espermatozoides que se encuentran en el fondo del tubo hacia el medio de cultivo agregado, quedando en el sedimento los espermatozoides inmóviles junto con el resto de células.

Se utilizó la técnica de swim-up simple (Inaudi y col., 2002). Para lo cual, se utilizaron dos tubos falcon y se colocaron en cada uno de ellos, 1ml medio cultivo (HTF + BSA a 37°C). A continuación se introdujo 250  $\mu\text{l}$  de semen en el fondo de cada tubo. Luego los tubos fueron incubados en la estufa a 37° C durante una hora en ángulo de 45°, transcurrido ese lapso se recogió 250  $\mu\text{l}$  sobrenadante de cada tubo y se mezclaron, reconstituyendo nuevamente 500  $\mu\text{l}$ . Luego se procedió con la evaluación de los espermatozoides recuperados.

Esquema de la técnica swim-up.

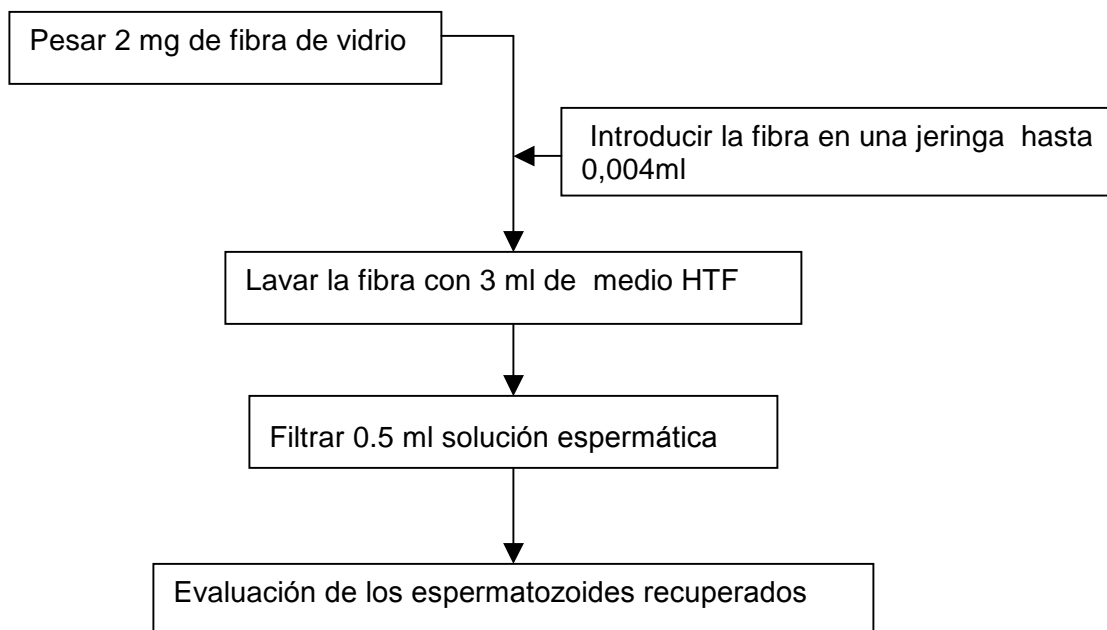


### 8.7.2 Filtración a través de fibra de vidrio (FV).

Este método de selección espermática se basa, en la adhesión al vidrio que experimentan los espermatozoides muertos o moribundos con defectos en su membrana, cuando están en presencia de concentraciones elevadas de proteínas dejando pasar sólo los espermatozoides de buena calidad.

Se utilizó la técnica de filtración con fibra de vidrio según Van der Ven y col. (1988), Para lo cual se introdujo en una jeringa de insulina, 2 mg de fibra de vidrio. Inmediatamente después se procedió a lavar la jeringa con 3 ml de HTF previo a la filtración del semen. Luego se filtro la muestra de 0,5 ml de semen y posteriormente se dejó pasar 0,2 ml de HTF para rescatar los espermatozoides que quedaron vivos pero atrapados. Una vez terminada la filtración, se procedió con la evaluación de los espermatozoides recuperados.

#### Esquema de la técnica.



## 8.8 Evaluación espermática

La calidad espermática se evaluó en la suspensión espermática, después de aplicar los métodos de selección espermática y 24 hrs. después de la criopreservación. Transcurrido estos lapsos se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Concentración
- b) Motilidad
- c) Viabilidad, Integridad acrosómica.

### 8.8.1. Concentración (CONC)

La concentración espermática se determinó en una dilución espermática de 1:1000. El recuento se realizó en cámara de Neubauer y se expresó en  $10^6$  células/ml.

### 8.8.2. Motilidad (MOT)

Esta consistió en la toma de 5  $\mu$ l de semen con 20  $\mu$ l de medio HTF y se colocaron en una lámina porta objeto previamente temperada. La muestra fue cubierta con una lamina cubreobjeto (18 x 18 mm) y la lectura se realizó en microscopio óptico con platina temperada (37° C) a 40x.

### 8.8.3. Viabilidad (VI), integridad acrosómica (VAI).

La evaluación de la VI, VAI se realizó por medio de la técnica de doble tinción de (Didion y col., 1989). Para la técnica de doble tinción se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ l de solución espermática de cada grupo y se le adiciono 50  $\mu$ l de azul de tripán al 2%. Después se dejaron incubando por 10 minutos en estufa a 37° C. Posteriormente se les agregó 1 ml de medio HTF y se centrifugó a 1800 rpm por 6 minutos. Este procedimiento se repitió 2 a 3 veces hasta obtener sobrenadante claro y transparente. Posteriormente, 15  $\mu$ l de cada pellet fueron extraídos para ser extendidos sobre un portaobjeto. Se secaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente se sumergieron en una solución giemsa al 20% por 40 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después fueron lavados rápidamente con agua destilada y se secaron en platina temperada. Las observaciones de los espermatozoides en los preparados se realizaron en microscopio óptico de luz con aumento húmedo de 100x. Se contabilizaron 200 espermatozoides por muestra. Los espermatozoides fueron categorizados según lo descrito por (Didion y col., 1989) ver tabla 2.

Tabla 2. Categorías de espermatozoides de ovino con doble tinción.

Categoría	Clase	status acrosomal
1	Vivo	Acrosoma intacto.
2	Vivo	Acrosoma reaccionado.
3	Muerto	Acrosoma intacto.
4	Muerto	Acrosoma reaccionado.

## 8.9 Método de congelamiento

Se utilizó el método de congelación basado en los estudios de Santiani (2003), el cual se llevó a cabo, luego de la segunda evaluación de la calidad del semen, en el que se procedió a mezclar cuidadosamente la muestra con la primera fracción del diluyente de congelación (anexo2), previamente estabilizado a 36° C en baño maría. Esta primera dilución fue colocada en baño maría (35°C) para iniciar la curva de enfriamiento.

El enfriamiento se realizó a una velocidad aproximada de 1 °C /3minutos, desde los 35° C hasta los 5° C. El tiempo total de la curva de enfriamiento fue aproximadamente de 1.5 horas. Una vez que la muestra alcanzó los 5° C, se le agregó igual volumen de la segunda fracción del diluyente de congelación (anexo2), previamente enfriado a la misma temperatura, y se dejó estabilizar por media hora. Esta segunda fracción del diluyente de congelación contiene el agente crioprotector glicerol el cual al ser mezclado con la primera fracción de diluyentes, alcanzará una concentración de 2 M.

Posteriormente, se llenaron y sellaron las pajuelas (0,25 ml). Estas fueron colocadas sobre una gradilla en contacto con los vapores de nitrógeno líquido por un lapso de 15 minutos, luego se depositaron las pajuelas en el nitrógeno líquido directamente.

#### 8.10 **Descongelación del semen**

Las pajuelas fueron descongeladas luego de un lapso máximo de 24 hrs en cada ensayo, para cada método de selección. Este proceso fue efectuado en un baño de agua a 37°C por 60 segundos. Cada pajuela después de descongelada fue secada y vaciada en un tubo eppendorf de 1.5 ml, para así evaluar la motilidad y viabilidad de la muestra post-descongelado.

## **9. Análisis estadístico.**

Los porcentajes de motilidad, integridad del acrosoma y viabilidad fueron transformados a valores angulares ( $\text{ángulo} = \arcsin \sqrt{\text{porcentaje}}$ ) para acercar los datos a la distribución normal (Zar, 1999). El análisis de datos fue realizado utilizando el programa estadístico Prisma ® versión 3,0. La prueba de análisis de varianza (ANOVA) fue utilizada para evaluar el efecto de las diferentes técnicas de selección espermática sobre los porcentajes de motilidad, integridad del acrosoma y viabilidad espermática. La prueba estadística Tukey fue utilizada para determinar entre que grupos existen las diferencias que son significativas para la prueba de ANOVA.

## 10. Resultados

### 10.1 Concentración total media pre-congelación.

Los resultados obtenidos por efecto de los diferentes métodos de selección espermática en la concentración total media son presentados en la tabla 3. La concentración total media de espermatozoides fue mayor en el grupo control ( $p < 0,05$ ) el cual no fue procesado mediante las técnicas de selección espermática. Además, el grupo seleccionado por filtración con fibra de vidrio fue superior al grupo seleccionado por swim-up ( $p < 0,05$ ).

Tabla 3. Efecto de los métodos de selección espermática en la concentración total media de espermatozoides ovinos previo al proceso de congelación.

Método de selección	Concentración ( $\times 10^6$ /ml $\pm$ De)	% Recuperación
Control	931 $\pm$ 26,84 <sup>a</sup>	100,00
Swim-up	216 $\pm$ 25,46 <sup>c</sup>	23,20
Filtración fibra de vidrio	670 $\pm$ 42,47 <sup>b</sup>	71,97

Valores son promedios de las concentraciones  $\pm$  DE.

a,b,c Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos.

## 10.2 Motilidad progresiva pre-congelación.

En la tabla 4 se observa que los grupos sometidos a selección espermática fueron estadísticamente superior al grupo control ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos sometidos a los diferentes métodos de selección espermática (swim-up y filtración con fibra de vidrio). (Figura 1).

Tabla 4. Efecto de los métodos de selección espermática en la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos previo al proceso de congelación.

Método de selección	%Motilidad progresiva $\pm$ DE
Control	75,6 $\pm$ 3,20 <sup>a</sup>
Swim-up	85,0 $\pm$ 3,78 <sup>b</sup>
Filtración fibra de vidrio	86,3 $\pm$ 3,54 <sup>b</sup>

Valores son promedios de motilidad  $\pm$  DE.

a,b Indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre grupos

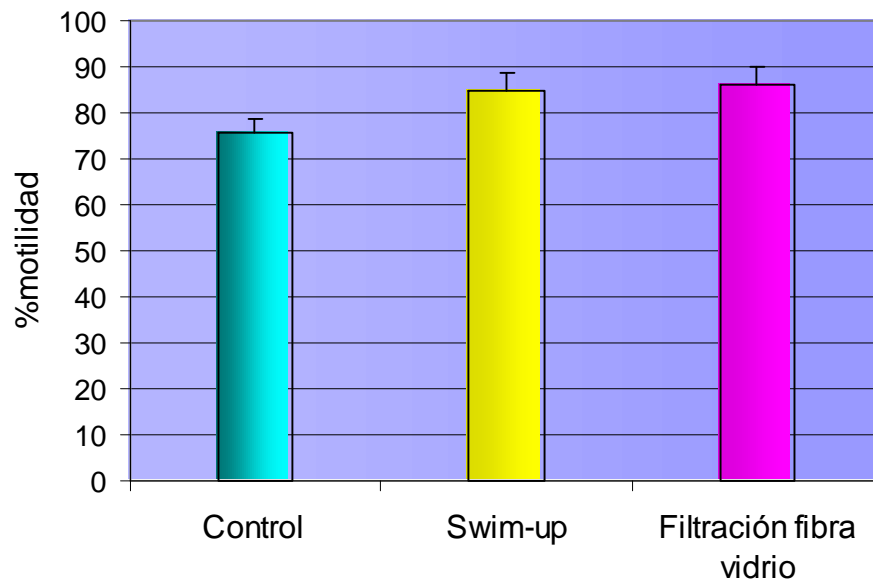


Figura 1. Porcentajes de motilidad progresiva previo al proceso de congelación.

### 10.3 Viabilidad e integridad acrosómica pre-congelación.

En la tabla 5 se observa que los valores de viabilidad e integridad de acrosómica son mayores en los grupos procesados mediante selección espermática por swim-up y filtración con fibra de vidrio ( $p < 0,05$ ) en relación al grupo control.

Tabla 5. Efecto de los métodos de selección espermática sobre la viabilidad e integridad acrosómica previo al proceso de congelación.

Método	%VI ± DE	%VAI ± DE
Control	73,25 ± 1,75 <sup>a</sup>	72,13 ± 2,53 <sup>a</sup>
SU	77,63 ± 2,50 <sup>b</sup>	76,25 ± 1,90 <sup>b</sup>
FV	80,38 ± 3,89 <sup>b</sup>	79,13 ± 2,80 <sup>b</sup>

**VI:** Espermatozoides viables; **VAI:** Espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

Valores son promedios de porcentajes de viabilidad ± DE.

a,b Indica diferencias significativas entre grupos.

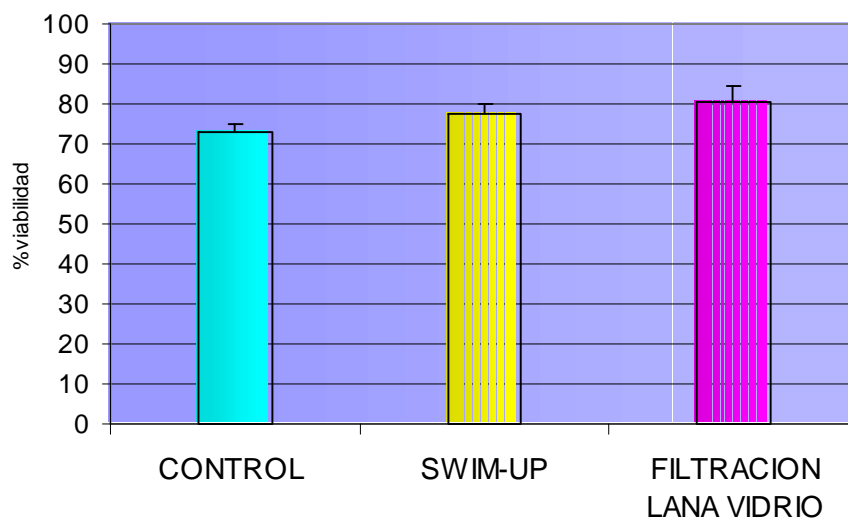


Figura 2. Porcentaje promedio de espermatozoides viables previo al proceso de congelación.

#### 10.4 Concentración total media post-descongelado.

En la tabla 6 se observa que el valor obtenido por el grupo control fue superior que los obtenidos a través de los métodos de selección espermática ( $p < 0,05$ ). Además, se evidencia una superioridad significativa del grupo sometido a la filtración con fibra de vidrio con respecto al método swim-up ( $p < 0,05$ ).

Tabla 6. Efecto de los métodos de selección espermática en la concentración total media de espermatozoides ovinos descongelados.

Método de selección	Concentración ( $\times 10^6$ células/ml)
Control	$312,88 \pm 21,8^a$
Swim-up	$81,25 \pm 12,27^c$
Filtración fibra de vidrio	$250,50 \pm 12,68^b$

Valores son promedios de las concentraciones  $\pm$  DE.

a,b,c Indica diferencias significativas entre grupos

#### 10.5 Motilidad progresiva post-descongelado.

En la tabla 7 se observa que la motilidad progresiva del grupo sometido a filtración con fibra de vidrio es superior al grupo control ( $p < 0,05$ ) y al grupo swim-up ( $p < 0,05$ ). Además, la motilidad obtenida por el grupo control demostró ser superior al método swim-up ( $p < 0,05$ ). (Figura 3).

Tabla 7. Efecto de los métodos de selección espermática en la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos descongelados.

Método de selección	% Motilidad progresiva $\pm$ DE
Control	34,38 $\pm$ 3,20 <sup>a</sup>
Swim-up	20,63 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>
Filtración fibra de vidrio	39,38 $\pm$ 4,17 <sup>c</sup>

Valores son promedios de las concentraciones  $\pm$  DE.

a,b,c Indica diferencias significativas entre grupos.

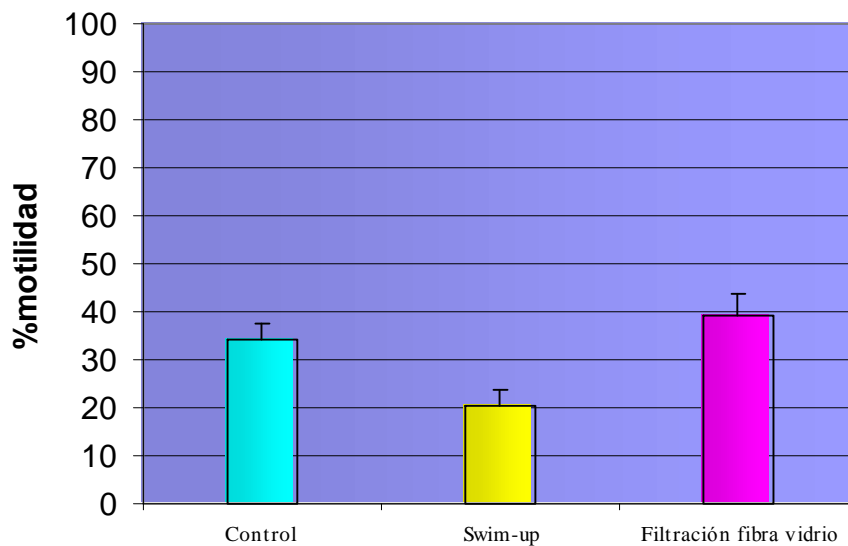


Figura 3. Porcentajes de motilidad progresiva post-descongelado.

### 10.6 Viabilidad e integridad acrosómica post-descongelado.

En la tabla 8 se puede observar que la viabilidad e integridad acrosómica del grupo procesado por el método de filtración con fibra de vidrio fue superior a los valores obtenidos por el grupo control y el grupo swim-up ( $p < 0,05$ ). Además, el valor obtenido por el grupo control fue mayor al obtenido por el grupo procesado por swim-up ( $p < 0,05$ ). (Figura 3).

Tabla 8. Efecto de los métodos de selección espermática en la viabilidad e integridad acrosómica de espermatozoides ovinos descongelados.

<b>Método</b>	<b>%VI <math>\pm</math> De</b>	<b>%VAI <math>\pm</math> De</b>
Control	36,88 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	35,63 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup>
SU	24,13 $\pm$ 2,42 <sup>b</sup>	23,25 $\pm$ 1,59 <sup>b</sup>
FV	44,13 $\pm$ 2,70 <sup>c</sup>	43,25 $\pm$ 1,67 <sup>c</sup>

**VI:** Espermatozoides viables; **VAI:** Espermatozoides vivos con acrosoma intacto.

Valores son promedios de porcentajes de viabilidad  $\pm$  DE.

a,b,c Indica diferencias significativas entre grupos.

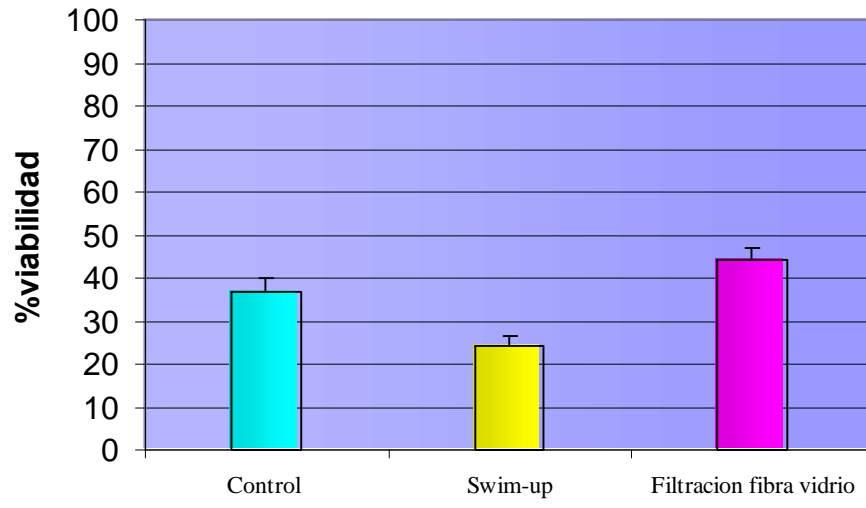


Figura 4. Porcentajes de viabilidad post-decongelación.

## 11. Discusión

Los resultados del presente trabajo permiten indicar que los métodos de selección espermática swim-up y filtración con fibra de vidrio mejoran la calidad del semen de ovino antes del proceso de congelación. Esto se ha podido inferir a partir de los mejores porcentajes en cuanto a motilidad y viabilidad que muestran los grupos procesados por selección espermática en comparación al grupo control, en desmedro de una concentración menor de espermatozoides/ml. Por otra parte, el efecto positivo sobre la calidad seminal post-descongelado, sólo fue observado en los grupos sometidos al método de filtración por fibra de vidrio.

En el presente estudio se observa que la concentración espermática pre-congelación disminuye en los grupos sometidos a selección espermática, lo cual se puede explicar por la migración que experimentan los espermatozoides motiles y a la dilución con medio HTF que experimentan los grupos seleccionados por el método de swim-up. Del mismo modo, la disminución en la concentración espermática en los grupos procesados por filtración con fibra de vidrio, se debería al atrapamiento que sufren los espermatozoides anormales durante el proceso de filtración con fibra de vidrio. La disminución de la concentración total media de espermatozoides del grupo swim-up y del grupo procesado por filtración con fibra de vidrio, es similar a la disminución de la concentración espermática descrita por Sieme y col. (2003) en la selección de semen de equinos. Del mismo modo, existen evidencias en otras especie como en bovinos (Somfai y col., 2002) y humanos (van der Ven y col., 1988) en donde se atribuye un efecto negativo de los métodos de selección espermática, sobre la concentración espermática.

Otro parámetro evaluado en el presente trabajo fue la motilidad progresiva pre-congelación, la cual mejoro significativamente en los grupos sometidos a los métodos de selección espermática, en relación al grupo control. Los porcentajes de motilidad en el grupo control, el grupo swim-up y el grupo procesado por filtración con fibra de vidrio, son equivalentes a los descritos por Sieme y col. (2003) en semen de equinos, quienes reportan mejorías en la motilidad progresiva una vez efectuadas las técnicas de selección. Del mismo modo, existen evidencias en otras especies como en humanos (Van der Ven., 1988; Nani y col., 2001) y en bovino (Somfai y col., 2002) quienes atribuyen a los métodos de selección espermática swim-up y filtración con fibra de vidrio un efecto positivo sobre la motilidad progresiva del semen pre-congelación, ya que estos métodos permiten la recuperación de espermatozoides motiles, de formas normales y libres de plasma seminal desde el eyaculado.

En relación a la viabilidad e integridad acrosómica pre-congelación, esta es significativamente superior en los grupos sometidos a selección espermática con relación al grupo control. Los porcentajes de viabilidad para el grupo procesado por swim-up y por el método de filtración con fibra de vidrio son similares a los reportados por Van der Ven y col. (1988) en espermatozoides humanos y Sieme y col. (2003) en la selección de espermatozoides de equino. En este contexto, al-Hasani y col. (1993) reportan que la combinación de los métodos de selección espermática swim-up y filtración de vidrio, en conjunto, arrojan mejores resultados en cuanto a viabilidad, que la aplicación por separado de un sólo método de selección, es decir, tienen un efecto sinérgico. Estos resultados indicarían, que los métodos de selección espermática swim-up y filtración con fibra de vidrio

constituyen una herramienta adecuada para mejorar la viabilidad del semen ovino pre-congelación.

En relación a la calidad seminal post-descongelado, se observaron diferencias significativas entre los tres grupos, siendo estadísticamente superior los grupos procesados por el método de filtración con fibra de vidrio. En este sentido, la motilidad progresiva post-descongelado para el grupo control y para el grupo procesado por filtración con fibra de vidrio, son equivalentes a las reportadas por Sieme y col. (2003) en semen de equinos, y levemente inferiores a las reportadas por Esteves y col. (2000) en semen humano y Trentalance y col. (2002) en semen de bovino. Por otra parte, los bajos porcentajes de motilidad progresiva obtenidos por el grupo sometido a selección por swim-up diferirían a los descritos por Sieme y col. (2003) en semen de equinos, Trentalance y col. (2002) en semen de bovinos y Esteves y col. (2002) en semen humano, quienes utilizando el método de selección espermática swim-up obtienen resultados mejores en cuanto a motilidad post-descongelado. En este contexto Barrios y col. (2000) reportan que el plasma seminal contiene factores que pueden influir en la viabilidad post-descongelado de los espermatozoides, ayudando a revertir el daño estructural de los espermatozoides de ovino sometidos a congelación. Estos factores serían proteínas del plasma seminal que estarían actuando a nivel de membrana del espermatozoide, los cuales absorberían estas proteínas del medio extracelular para restaurar su membrana después de ser descongelados. En el presente estudio, los resultados obtenidos por el método de selección espermática swim-up concordaría con lo descrito por Barrios y col. (2000), ya que el semen de carnero, al ser procesado por el método de selección swim-up, es incubado en medio HTF, lo cual

hace disminuir la concentración del plasma seminal por efecto de la dilución, lo que estaría produciendo una menor motilidad y viabilidad de este grupo, ya que estos espermatozoides, serían incapaces de restaurar su membrana debido a la baja en la concentración de proteínas del plasma seminal, luego de la descongelación.

Recíprocamente, se han reportado efectos perjudiciales del plasma seminal en la motilidad y viabilidad de semen de toros post-descongelado (Killian y col., 1993). Esto indicaría que el plasma seminal no se comporta de igual forma en todas las especies. Además, cabe recordar que los espermatozoides de carnero son más sensibles al shock por frío que el de otras especies, lo que sugeriría que hay diferencias especie-dependiente (Barrios y col., 2000).

En relación a la concentración espermática post-descongelado, esta se ve disminuida por efecto de la adición de los diluyentes necesarios para que las muestras puedan ser críoconservadas. La disminución de la concentración total media de espermatozoides en el grupo control, en el grupo swim-up y en el grupo filtrado con fibra de vidrio, son similarmente disminuidas en especies como equino (Sieme y col., 2003) y bovinos (Somfai y col., 2002).

De esta manera, en el presente estudio también se evaluó el efecto de los métodos de selección espermática en la desestabilización de membranas. Los porcentajes de reacción acrosomal espontánea observados en el presente trabajo tanto en semen fresco como en semen descongelado no son relevantes debido a que fueron mínimos (<2%), en forma similar a lo descrito por otros investigadores (Pérez y col., 1996; Paulenz y col., 2002).

De acuerdo a los resultados, la aplicación de los métodos de selección espermática swim-up y filtración con fibra de vidrio mejorarían los porcentajes de motilidad y viabilidad espermática pre-congelación, como también la calidad seminal post-descongelado, en los grupos sometidos a filtración con fibra de vidrio. Sin embargo, estos resultados no aseguran el éxito expresado en porcentaje de fertilidad, cuando se realiza inseminación artificial en oveja a nivel cervical. Existen varios reportes indicando que un porcentaje significativo de espermatozoides que sobreviven el proceso de congelamiento-descongelamiento experimentan cambios en su membrana similares al proceso de capacitación espermática (Pérez y col., 1996). En este sentido, la inseminación artificial a nivel intrauterino con semen descongelado produce mejores porcentajes de fertilidad debido a que los espermatozoides estarían capacitados y listos para la fecundación (Maxwell y Watson, 1996). Sin embargo, cuando los espermatozoides son depositados a nivel cervical, el proceso de maduración celular reduce su tiempo de vida y no les permite alcanzar a recorrer todo el tracto reproductivo de la hembra para llegar a fecundar el ovocito (Maxwell y Watson, 1996).

En general, la aplicación de las técnicas de selección espermática swim-up y filtración con fibra de vidrio, podrían constituir una herramienta para mejorar la calidad de semen ovino tanto antes como después del proceso de congelación y por lo tanto aumentar los porcentajes de fertilidad cuando se realiza inseminación artificial en ovejas a nivel cervical e intrauterino.

## **12. Conclusiones.**

1. La criopreservación de semen de ovino es un proceso que afecta negativamente la motilidad y viabilidad de los espermatozoides.

2. Los métodos de selección espermática de swim-up y filtración con fibra de vidrio son herramientas reproductivas que permiten reducir la pérdida de motilidad y viabilidad pre-congelación.

3. El método de selección espermática swim-up, realizado en la fase de pre-congelación, perjudica la motilidad y viabilidad del semen post-descongelado. .

4. La selección espermática por el método de filtración con fibra de vidrio permite obtener mejores resultados que el método de swim-up por cuanto asegura una mayor recuperación de espermatozoides con formas motiles y viables, tanto antes como después del proceso de congelamiento.

### 13. Anexos

#### Anexo1

Medio HTF (Human tubarian fluid)

(Quinn y col., 1985)

	mM	g/L
NaCl	101,60 mM	5,931
KCl	4,69 mM	0,350
CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	2,04 mM	0,301
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,20 mM	0,050
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,37 mM	0,050
NaHCO <sub>3</sub>	25,00 mM	2,100
Rojo fenol	-----	0,005
Glucosa (anhydrous)	2,78 mM	0,500
Na-pyruvate	0,33 mM	0,036
Na-Lactate (60% Syrup)	21,40 mM	3,998 mL
Penicilina	-----	0,060
Sulfato de estreptomicina	-----	0,050
Hepes	20,00 mM	5,206

Osmolaridad ajustada a 280 mOsm/Kg.

## Anexo 2

### Preparación de diluyentes

#### Primera Fracción (10 mL):

- 9,5 mL de leche descremada (0.5 g/L grasa)
- 0,5 mL de yema de huevo

#### Segunda Fracción (5 mL):

- 0,2425 g Fructosa
- 0,0150 g penicilina
- 0,0200 g sulfato de estreptomicina
- 0,25 mL de yema de huevo
- Completar hasta 5 mL con Primera Fracción
- Adicionar 0,737 mL del agente crioprotector glicerol, para obtener la concentración de 2M.

Al diluir la primera fracción del diluyente con igual volumen de la segunda fracción, la concentración final del crioprotector llega a 2M

### Anexo 3

Efecto de los métodos de selección espermática en la concentración total media de espermatozoides ovinos antes del proceso de congelamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	2091000	1046000	988,8	P<0,0001
Residuo	21	22210	1057		
Total	23	2114000			

### Anexo 4

Efecto de los métodos de selección espermática en la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos antes del proceso de congelamiento-descongelamiento

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	297	148,4	19,59	p<0,0001
Residuo	21	159	8		
Total	23	455,9			

### Anexo 5

Efecto de los métodos de selección espermática en la viabilidad de espermatozoides ovinos antes del proceso de congelamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	99	49,35	11,79	p<0,0001
Residuo	21	88	4		
Total	23	186,6			

### Anexo 6

Efecto de los métodos de selección espermática en la integridad acrosómica de espermatozoides ovinos antes del proceso de congelamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	89,27	44,63	16,49	p<0,0001
Residuo	21	56,83	2,7		
Total	23	146,1			

### Anexo 7

Efecto de los métodos de selección espermática en la concentración total media de espermatozoides ovinos después del proceso de congelación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	229800	114900	438,4	p<0,0001
Residuo	21	5504	262,1		
Total	23	235300			

### Anexo 8

Efecto de los métodos de selección espermática en la motilidad progresiva de espermatozoides ovinos después del proceso de congelación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	612,7	306	61,39	p<0,0001
Residuo	21	104,8	5		
Total	23	717,5			

### Anexo 9

Efecto de los métodos de selección espermática en la viabilidad de espermatozoides ovinos después del proceso de congelación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	612,8	308,4	113,4	p<0,0001
Residuo	21	57,1	3		
Total	23	673,9			

### Anexo 10

Efecto de los métodos de selección espermática sobre la integridad acrosómica de espermatozoides ovinos después del proceso de congelación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Nivel de significancia
Grupos	2	620,5	310,2	310	p<0,0001
Residuo	21	21	1,000		
Total	23	641,5			

#### 14. Bibliografía

**AL-HASANI, S., S. ALPUSTUN, M. LUDWIG. K. DIEDRICH, O. BAUER, D. KUPKER, A. WOLFF, D.KREBS,** 1996. The combination of two semen preparation techniques (glass wool filtration and swim-up) and their effect on the morphology of recovered spermatozoa and outcome of IVF-ET. *Journal of Andrology*. 19: 55 - 60.

**AX, R.L., M. DALLY, B.A. DIDION, R.W. LENZ, C.C. LOVE, D.D VARNER,. B. HÁFEZ, M.E BELLIN.** 2000. Semen evaluation. En: Háfiez, E.S.E. and Háfiez. B (eds), *Reproduction in farm animals*, 7<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins Company, Philadelphia, pp365-375.

**BARRIOS, B., R. PEREZ-PE, M. GALLEGRO, A. TATO, J. OSADA, T. MUINO-BLANCO, FFA., CEBRIAN-PÉREZ.** 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biology of Reproduction*. 63:1531-1537.

**BIELANSKI, C., DULREC W.C.D. HARE.** 1992. Failure to remove bovine diarrhea(8vDv) from bull semen by swim-up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization, *Reproduction Domestic Animal*. 27: 303-306.

**BYWATER, B., W. ROWLANDS.** 1970. Cría, explotación y enfermedades de las ovejas. Editorial Acríbia, España.

**CARLSSON, L., G. RONQUIST, M. STRIDSBERG, L. JOHANSSON,** 1997. Motility stimulant effects of prostasome inclusion in swim-up medium on cryopreserved human spermatozoa. *Archives of Andrology*. 38: 215-21.

**COLAS, G.** 1980. Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Ile-de-France. I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. *Reproduction and Nutrition of Develop.* 20: 1789- 1799.

**DAZA, A.** 1997. Reproducción y sistemas de explotación del ganado ovino. Ed Mundi-prensa. Madrid.

**D'ALESSANDRO, A., G. MARTEMUCCI.** 2003. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science*. 20: 93-102.

**DIDION, B.A., J. DABRINSKY, J. GILES, C. GRAVES.** 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Research*. 22:51-57.

**DURÁN DEL CAMPO, A.** 1993. Manual Práctico de Reproducción e Inseminación Artificial en Ovinos. Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. Uruguay.

**ESTEVEZ, S.C. SHARMA, R.K. THOMAS, A.J. AGARWAL A.** 2000. Improvement in motion characteristics and acrosome status in cryopreserved human spermatozoa by swim-up processing before freezing. *Human Reproduction*.15:2173-2179.

**FRASER, A., J. STAMP.** 1987. Ganado ovino: Producción y enfermedades, Edición Mundi Prensa, Madrid, España.

**FUKUDA, Y., M. ICHIKAWA, K. NAITO, Y. TYODA.** 1990. Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage, *Biology of Reproduction*. 42:114-119.

**GARNER, D.L.** 1991. "Artificial insemination". En Cupps, T.P. "Reproduction in Domestic Animal". Fourth Edition, Academic San Diego California. Pp: 251-274.

**HAFEZ, E.S.E.** 1987. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.5ª edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Impreso en México 1987

**HOWLES, C.M.WEBSTER, G.M. AND HAYNES, N.B.**1980. The effect of rearing under a long or short photoperiod on testis growth, plasma testosterone and prolactin concentrations, and the development of sexual behaviour in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*. 60: 437-447.

**KILLIAN, G.J. CHAPMAN, D.A. ROGOWSKI, L.A.** 1993. Proteínas fertilidad-asociadas en holstein el plasma seminal macho. *Biology of Reproduction*. 49: 1202-1207.

**LARSON, K.L. BRANNIAN, J.D. TIMM, B.K, JOST, L.K. EVENSON, D.P.**1999. Density gradient centrifugation and glass wool filtration of semen remove

spermatozoa with damaged chromatin structure. *Human Reproduction*. 14:2015-2019.

**LINCOLN, G.A., R.V. SHORT.** 1980. Seasonal breeding: nature contraceptive. *Recent. Progr. Res.* 36: 1-52.

**MAXWELL, W.M., WATSON, P.F.** 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*.42: 55-65.

**MAZUR, P.** 1970. "Cryobiology: the freezing of biological systems"(Abstract) *.Science*. 168: 939-949.

**MÉNDEZ, P.** 1998. Estudios de la actividad reproductiva de carnerillos Romney Marsh. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile.

**MCDONALD, L.E, M.H. PINEDA.** 1991. *Endocrinología Veterinaria y Reproducción*. Cuarta edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. Impreso en México 1989

**MCLAUGHLIN, E.A., W.C. FORD, M.G. HULL.** 1992. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *Journal of Reproduction of Fertility*. 95: 749-54

**NANI, J.M. JEYENDRAN, R.S.** 2001. Sperm processing: glass wool column filtration. *Archives of Andrology*. 47:15-21.

**PARRISH, J.J., R.H. FOOTE. 1987.** Quantification of bovine sperm separation by swim-up method. Relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *Journal of Andrology*. 8:259 - 266.

**PAULENZ, H., L. SÖDERQUIST, R. PEREZ-PE, K.A. BERG. 2002.** Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology*. 57: 823-836.

**PÉREZ, L.J., A. VALCÁRCEL, M.A. DE LAS HERAS, D. MOSES, H. BALDASSARRE. 1996** Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology*. 46: 131-140.

**QUINN P., JF. KERIN, G. WARNES. 1985** Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility*. 44:493-8.

**QUINN, P.J., I.G. WHITE, R.W. CLELAND. 1969.** Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. *Journal of Reproduction and Fertility*. 18: 209-220.

**RISOPATRÓN, J., R. SÁNCHEZ, N. SEPÚLVEDA, P. PEÑA, E. VILLAGRAN, W. MISKA.** 1996. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/centrifugation. *Theriogenology*. 46: 65-73.

**SANCHEZ S., C.A. COETZEE, T.F. KRUGER, J.P. VAN DER MERWE, R.S. STANDER. R.R. HENKEL, C.J. LOMBARD.** 1996. Comparison between swim-up and glass wool column filtration of human semen in a gamete intrafallopian transfer program. *Archives of Andrology* .36:155-60.

**SANTIANI, A.V. 2003.** Criopreservación de semen ovino: Efecto de la adición de antioxidantes al diluyente. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Biología de la Reproducción. Universidad de La Frontera. Temuco.

**SCHANBACHER, B. D.** 1978. Fertility of rams chronicall treated with gonadotropin releasing hormone during the non-breeding season. *Biology of Reproduction*. 19:661-665.

**SIEME, H., G. MATINSSON, H. RAUTERBERG, K. WALTER, C. AURICH, R. PETZOLDT, E. KLUG.** 2003. Aplicaton of Techniques for Sperm Selection in Frensh. *Reproduction Domestic Animal*. 38:134-140.

**SOMFAI, T., S. BODO, S. NAGY, A.B. PAPP, J. IVANCSICS, B. BARANYAI, E. GOCZA, A. KOVACS.** 2002. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reproduction Domestic Animal*. 37:285-290.

**SEPÚLVEDA, N.** 1993. La oveja araucana, un recurso genetico local. III congreso Internacional de gestion en recursos naturales. Pucón. Chile.

**STABBINGS, R.G., C.P. WOSIK.** 1991. Glass wool versus swim-up separation of bovine spermatozoa for in vitro fertilization, *Theriogenology*. 35, 276.

**THOMAS, C.A., D.L. GARNER, J.M. DEJARNETTE, C.E. MARSHALL.** 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biology of Reproduction* .58: 786-93.

**TRENTALANCE, G.M., N.B. BEORLEGUI.** 2002. Sperm evaluation in cryopreserved bovine semen recovered by two selection methods. *Andrologia*. 34: 397-403.

**VAN DER VEN, H.H., R.S. JEYENDRAN, S. AL-HASANI, A. TUNNERHOFF, K. HOEBBEL, K. DIEDRICH, D. KREBS, M. PEREZ-PELAEZ, M.** 1988. Glass wool column filtration of human semen: relation to swim-up procedure and outcome of IVF. *Human Reproduction*. 3:85-8.

**ZAR, J.H.** 1999 Biostatistical Analysis, 4th ed.. Prentice Hall, New Jersey.

