

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE REPRODUCCIÓN ANIMAL

**ESTUDIOS PRELIMINARES EN CAPACITACION IN-VITRO DE
ESPERMATOZOIDES OVINOS FRESCOS Y CONGELADOS**

Memoria de título presentada como parte
de los requisitos para optar al TITULO DE
MEDICO VETERINARIO.

Ricardo Antonio Merino González
VALDIVIA-CHILE
2003

PROFESOR PATROCINANTE:

Dr. Jorge Correa S.

PROFESOR COPATROCINANTE:

Dr. Mario Martínez

PROFESOR COLABORADOR:

Dra. Danai Bücher

PROFESORES CALIFICADORES:

Dr. Renato Gatica

Dr. Marcelo Hervé

FECHA DE APROBACIÓN: 26 de Noviembre de 2003.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSIÓN.....	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30
8. ANEXOS.....	36
9. AGRADECIMIENTOS.....	44

Con todo mi amor y gratitud a la persona que me demostró que con esfuerzo y paciencia se pueden lograr los objetivos... Mi Madre.

1. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el propósito de lograr capacitación espermática *in vitro* de semen ovino fresco y congelado. Para esto se utilizaron 3 carneros adultos de 2 a 3 años de edad, mantenidos en estabulación permanente y alimentados principalmente con heno de pradera natural, concentrado y agua *ad-libitum*. Para evaluar las características seminales se obtuvo 12 eyaculados de cada carnero mediante vagina artificial, con una frecuencia de recolección de 3 veces por semana. Se estableció volumen, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales, movimiento de masa y movimiento progresivo. Los resultados obtenidos fueron: volumen de $1,1 \pm 0,39$ ml., concentración de 3.476 ± 740 espermatozoides/ml., 74,3 % de espermatozoides vivos, movimiento progresivo de $74,3\% \pm 7,5$, movimiento de masa de $3,6 \pm 0,9$ y 12,8 % de anomalías. Todos los valores obtenidos se encuentran dentro del rango normal reportado por otros autores para carneros adultos sanos. Posteriormente, se desarrolló un protocolo de criopreservación de semen. El semen recolectado se diluyó en Tris, glucosa, yema de huevo y glicerol a una concentración de 400 millones de espermatozoides por ml. Las dosis fueron almacenadas en pajuelas Minitüb® de 0.25 ml. Antes de ser congeladas en nitrógeno líquido, las pajuelas fueron sometidas a un periodo de estabilización de dos horas a 5°C. El método de criopreservación aplicado permitió la recuperación de un 58% de células espermáticas vivas y una motilidad progresiva del 56% post-descongelación. La incubación y selección espermática (swim-up) se realizó simultáneamente durante dos horas en medio m-DM con 50 ug/ml de heparina en una estufa a 38,5 °C. Para esto, alícuotas de semen fueron puestas bajo el medio de incubación en 4 tubos para semen fresco y 6 tubos para semen descongelado para realizar la migración espermática hacia la superficie. Finalmente el sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 500g por cinco minutos. Del pellet resultante se tomaron alícuotas de 20 ul para realizar frotis y la triple tinción nigrosina-eosina-Giemsa (NEG) con la cual se determinó la relación de espermatozoides vivos-muertos y el estado de sus membranas acrosómicas. Se observó un aumento en la presentación de reacción acrosómica en los espermatozoides incubados en presencia de heparina con respecto a los controles incubados en las mismas condiciones pero sin heparina. Para el semen fresco este aumento fue de 32 a 52% siendo este valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Pese a que los resultados obtenidos para el semen criopreservado carecen de significancia estadística ($p > 0.05$), igualmente se observó una mayor presentación de reacción acrosómica con respecto al grupo control, aumentando de 41 a 46%. En conclusión los resultados obtenidos muestran que la adición de heparina (50ug/ml) al medio de incubación, aumentó la presentación de reacción acrosómica en semen fresco y en menor grado en semen criopreservado, hecho que es atribuible al aumento de la población espermática que experimentó capacitación durante el tratamiento.

Palabras claves: Criopreservación, semen, ovino, reacción acrosómica, capacitación espermática, heparina.

2. SUMMARY

This study was carried out with the purpose of achieving *in vitro* sperm capacitation of fresh and frozen ram semen. For this work three mature rams from 2 to 3 years old maintained indoors were used. Previous to the development of the investigation, the rams were trained for two weeks to the acceptance of the artificial vagina.

To study the seminal characteristics, 12 eyaculate per ram were obtained with a frequency of three time per week. Volume, sperm concentration, porcentaje of living spermatozoa, porcentaje of abnormal spermatozoa, mass and progresive movements were recorded.

Later, a protocol of cryopreservation of was stablished, by means of which thawed semen of good quality was obtained to carry out the experiment. Semen was diluted in a concentration of 400×10^6 spermatozoa/ml, stored in 0.25 ml. Minitübe® straws. The composition of the extender used was: Tris, glucose, egg yolk and glicerol. Before being frozen in liquid nitrogen the straws were subjected to a period of equilibration of two hours at 5°C.

A 58% of live spermatozoa with 56% of progresive post-thaw movement was obtained with the cryoprotection method used.

The incubation and sperm selection were carried out simultaneously, during two hours in m-DM culture media with 50 ug/ml of heparin at 38,5°C. Aliquots of fresh and thawed semen were put in the bottom of four tubes (fresh semen) and six tubes (thawed semen), under the incubation media in order to obtain sperm migration toward the surface (swim-up). Finally the upperlayer was gathered and centrifuged at 500 g by 5 minutes. Aliquots of 20 ul were taken from the pellet to carry out frodis and triple-stain nigrosin-eosin-Giemsa (NEG) with which the relationship of living-dead spermatozoa was determined and the state of its acrosomic membrane. The smear were observed in a optical microscope with a magnifying of 100 x and inmersion oil.

There was an increase in the percentage of acrosome reacted spermatozoa from 32 to 52% in fresh semen showing statistically significant differences from the control group ($p < 0.05$), although there was no statistically significant differences ($p > 0.05$) in thawed semen increase from 41 to 46%. The results indicate that when ram semen is incubated in media with heparin there was an increase in the percentage of acrosome reacted spermatozoa and the percentage of capacitated spermatozoa.

Key words: Cryopreservation, semen, ram, acrosome reaction, capacitation, heparin.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 CONSERVACIÓN DE SEMEN OVINO

Desde los primeros intentos de conservación de semen llevados a cabo por Spallanzani en 1776 hasta el día de hoy, se ha logrado el desarrollo de técnicas que permiten almacenar semen por largos periodos de tiempo.

La conservación de espermatozoides requiere de una reducción del metabolismo celular con el fin de prolongar su vida útil, esto se logra mediante la disminución de la temperatura espermática y el uso de sustancias protectoras que minimizan el daño celular (Evans y Maxwell, 1987).

Se han desarrollado principalmente dos sistemas de conservación, uno de ellos es la conservación de semen líquido a bajas temperaturas y el otro es la congelación.

Las investigaciones realizadas a principios del siglo XX por Ivanov, en el desarrollo de medios de dilución de espermatozoides, llevaron a la aplicación práctica de la inseminación artificial. Después de la primera guerra mundial, estudios adicionales desarrollados por Milanov, fueron rescatados en la Unión Soviética y a principios de 1930 el semen de carnero fresco y diluido fue usado a gran escala en programas de inseminación artificial de rebaños ovinos (Salamon y Maxwell, 2000).

La necesidad de desarrollar programas de mejoramiento genético así como facilitar el transporte de semen de diferentes centros de colección hasta los sitios de inseminación han estimularon la investigación en la conservación de semen de carnero.

Se han realizado investigaciones con semen fresco diluido y conservado a bajas temperaturas en las que se ha logrado buenos resultados. Sin embargo la congelación a muy bajas temperaturas ha demostrado ser el método más eficaz para la conservación del semen, logrando mantenerlo viable y funcional indefinidamente.

3.1.1 Almacenamiento de semen congelado.

El descubrimiento de las propiedades crioprotectoras del glicerol permitió el desarrollo de las técnicas de congelación espermática en las especies domesticas. Desde entonces se han desarrollado varias técnicas de congelación de semen de carnero (Salomón, 1995).

En el proceso de congelación los espermatozoides son sometidos a una disminución gradual de la temperatura, lo que produce una reducción reversible de su actividad metabólica; en la especie ovina este estado se alcanza a temperaturas cercanas a los -75°C (Maxwell y col., 1995). Una congelación adecuada debe permitir a los espermatozoides mantener en el tiempo su integridad y capacidad funcional. La respuesta de los espermatozoides a la congelación varia según la especie, siendo la especie ovina una de las más sensibles a este proceso (Watson y Martín, 1972).

Existe un rango de temperaturas críticas a la que los espermatozoides son especialmente sensibles (-10 y -40°C). Durante el proceso de criopreservación, los espermatozoides deben atravesar este rango crítico en dos oportunidades, una vez en la congelación y otra durante la descongelación. Este hecho produce daño de las estructuras celulares debido a la formación de cristales de hielo intracelular, un aumento de la concentración intracelular de solutos, además de una serie de fenómenos denominados “shock frío” (Watson, 1981).

Debido a la suma de estos factores se produce una disminución de la capacidad de sobrevivencia de los espermatozoides, una serie de cambios morfológicos y una disminución de la motilidad espermática y de los procesos metabólicos (Lightfoot y Salamon, 1970).

Los primeros registros de congelación de semen de carnero pertenecen a Bernstein y Petropavlovsky, quienes en 1937 usaron exitosamente una solución de glicerol (1M, 9,2%) para congelar espermatozoides ovinos a -21°C . Smirnov entre 1947 y 1950 investigó la vitrificación (sin glicerol) de pequeños volúmenes (0.05-0.1 ml) de semen de carnero y en una prueba de fertilidad hecha en 1949, 19 ovejas fueron inseminadas con 3 a 5 dosis de semen congelado (por 15 minutos a -78°C), finalmente siete de estas ovejas produjeron 11 corderos (Salamon y Maxwell, 2000).

Muchas investigaciones relacionadas con la congelación de semen ovino han sido desarrolladas desde los años 50' en adelante. Inicialmente el método y los diluyentes utilizados para la criopreservación de semen de toro fueron aplicados a la especie ovina con pobres resultados (Salamon y Maxwell, 2000).

Estas limitaciones hicieron necesario el desarrollo de investigaciones propias para esta especie que finalmente han permitido establecer métodos de congelación y descongelación, agentes crioprotectores y diluyentes adecuados para la criopreservación de semen ovino.

Una buena congelación debe permitir a los espermatozoides atravesar las temperaturas críticas produciéndoles el mínimo daño posible. Esto se logra alterando los factores externos de la célula mediante el uso de soluciones protectoras.

3.1.2 Diluyentes.

El plasma seminal sólo otorga al espermatozoide una protección limitada contra los cambios bruscos de temperatura. Por lo tanto para almacenar semen a bajas temperaturas por periodos prolongados, se hace necesario el uso de soluciones protectoras o diluyentes con características especiales, que permitan mantener la funcionalidad de los espermatozoides. La composición de estos diluyentes y la tasa de dilución utilizada son dos factores que influyen directamente en la mantención de la funcionalidad espermática post-descongelación (D'Alessandro y col., 2001).

Los diluyentes utilizados para la preservación del semen de carnero, igual que para las demás especies, deben cumplir con ciertos requisitos:

- Contener sustancias que protejan al espermatozoide del daño causado por las bajas temperaturas como la yema de huevo, leche y/o glicerol.
- Proporcionar una fuente de energía (azucars) al espermatozoide.
- Poseer capacidad tampón para prevenir los daños ocasionados por cambios en el pH.
- Mantener la presión osmótica y el balance electrolítico.
- Poseer agentes antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano.
- Aumentar el volumen del semen para poder obtener mas dosis inseminantes.

Existe una amplia gama de diluyentes desarrollados a través del tiempo, los cuales presentan diferentes composiciones y cualidades, desde diluyentes basados en mono, di o trisacaridos hasta compuestos orgánicos como el Tris [tris(hidroximetil)aminometano)]. De todos éstos, el diluyente Tris-glucosa desarrollado por Salamon y Visser (1972) es hasta hoy el mas recomendado para la congelación de semen de carnero (Evans y Maxwell, 1987).

El Tris fue originalmente utilizado como principal componente de diluyentes para la congelación de semen bovino, entre sus características principales están poseer una buena

capacidad tampón, actividad diurética y osmótica, además de baja toxicidad en altas concentraciones (Salamon, 1995a).

El uso de Tris en diluyentes para semen ovino fue descrito en algunas investigaciones a principio de los años 70' (Salamon y Maxwell, 2000). En éstas, se comprobó que los espermatozoides de carnero toleran una concentración de Tris de hasta 400 mM y que el azúcar mas adecuado como fuente de energía para este tipo de diluyentes es la glucosa.

En pruebas de fertilidad realizadas por Visser y Salamon (1973) con semen congelado en forma de pellets y diluido (5 veces) con Tris (300mM), glucosa (27.75 mM), ácido cítrico (94.7 mM), yema de huevo (15%), glicerol (5%) y antibióticos; se lograron tasas de preñez de 30 a 57% después de inseminación artificial transcervical (Salamon y Maxwell, 2000).

3.1.3 Agentes crioprotectores.

Se ha demostrado que varios agentes tienen una capacidad crioprotectora que favorece la supervivencia de los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación. De éstos el glicerol y la yema de huevo son los agentes mas comúnmente utilizados en la congelación de semen ovino.

Las mejores tasas de supervivencia espermática en la especie ovina se han logrado con concentraciones de glicerol entre 4 y 6% (Fraser,1968). Concentraciones mayores a éstas disminuirían la sobrevivencia de los espermatozoides post-descongelación. (Graham y col. 1978).

El nivel de glicerol incluido en diluyentes para congelación de semen ovino es limitado por su toxicidad (Salamon y Maxwell, 2000) y varía según la velocidad de congelación, la composición del diluyente y el método de adición del glicerol.

Además de los factores mencionados anteriormente, la concentración de glicerol también depende de la presión osmótica del diluyente en cuestión. (Salamon, 1968; Lightfoot y Salamon, 1969).

El glicerol ha sido implicado en algunos fenómenos indeseables que ocurren durante la fase de equilibrio que debe llevarse a cabo entre el semen y el diluyente, como cambios en la estructura e integridad bioquímica del espermatozoide y la aceleración de la reacción del acrosoma. Sin embargo esto es insignificante en comparación a sus favorables propiedades criogénicas. (Fiser y Fairfull, 1986).

Si bien el glicerol confiere crioprotección a los espermatozoides, puede también causar algunos daños estructurales previo a la congelación, por esto se recomienda adicionar el glicerol no mas allá de 20 a 30 minutos antes de someter el semen a bajas temperaturas (Salamon, 1995a).

Normalmente se ha recomendado que el glicerol se incorpore al semen en una fracción separada del diluyente (dilución de dos pasos), sin embargo estudios más recientes indican que la adición del diluyente con el glicerol incorporado (dilución de un paso) a 30°C es más simple y efectiva, debido a esto se ha transformado en la técnica más utilizada actualmente en la congelación de semen ovino (Evans y Maxwell, 1987).

Otro agente crioprotector frecuentemente utilizado es la yema de huevo, que protege al espermatozoide del shock frío y durante la congelación y la descongelación. (Salamon y Maxwell, 2000).

La concentración de yema de huevo en el diluyente para semen ovino puede variar en un amplio rango, encontrándose el óptimo alrededor del 15%, aunque esta cifra también depende de la proporción de los demás compuestos presentes en el diluyente. (Salamon y Lightfoot, 1969).

3.1.4 Procesamiento y congelación de semen.

Una exitosa congelación de semen depende en gran parte de la tasa de dilución. Originalmente, el semen era diluido solo para protegerlo durante el enfriamiento, congelación y descongelación, pero la tasa de dilución puede modificarse por razones técnicas, como aumento del número de hembras inseminadas con cada eyaculado, o para ajustar el número de espermatozoides en cada dosis (Salamon y Maxwell, 2000).

Un estudio realizado por D'Alessandro y col. (2001), demostró que a mayor tasa de dilución, se obtienen mejores resultados con relación a sobrevivencia, motilidad espermática e integridad acrosómica post-descongelación.

Después de la dilución, el semen debe ser enfriado lentamente hasta temperaturas cercanas a los 5°C, una adecuada curva de enfriamiento debería disminuir la temperatura del semen diluido desde 30 a 5°C en aproximadamente 1 hora (Salamon y Maxwell, 2000), en este período el espermatozoide se adapta para reducir su metabolismo. Una refrigeración de mayor velocidad podría causar una serie de cambios en el metabolismo y bioquímica del semen que reduce la motilidad y actividad metabólica de los espermatozoides (White, 1993).

Posterior a la etapa de enfriamiento el semen diluido debe permanecer alrededor de 1,5 a 2 horas a 5°C de temperatura para llevar a cabo la fase de equilibrio. (Evans y Maxwell, 1987). Salamon (2000) sugiere que tiempos de equilibrios superiores no presentan ventajas en la supervivencia espermática.

Tradicionalmente el equilibrio ha sido considerado como el tiempo total en el cual los espermatozoides permanecen en contacto con el glicerol antes de ser congelados, durante el

cual éste penetra en la célula espermática para establecer un balance en las concentraciones intra y extracelular. No obstante el término equilibrio incluye el balance de la concentración no solo de glicerol, sino que de todos los componentes osmoticamente activos del diluyente. (Salamon, 1976; Evans y Maxwell, 1987).

Al llegar al momento de la congelación hay que considerar que el enfriamiento de una suspensión celular por debajo del punto de congelación produce la formación de cristales de hielo extracelular amentando la concentración de solutos en el medio. Este fenómeno produce un desequilibrio osmótico entre los medios intra y extracelular (Salamon, 1995a). La célula responde perdiendo agua a través de la membrana plasmática para recuperar su equilibrio osmótico.

La congelación de pajuelas en nitrógeno líquido requiere de una disminución lenta de la temperatura, por lo tanto antes de ser sumergidas en el tanque de nitrógeno líquido, deben ser sometidas a temperaturas que puede variar entre los -75°C y los -125°C (rango en que la alteración de la sobrevivencia espermática es mínima) durante 8 a 10 minutos; dicha temperatura se logra suspendiendo las pajuelas entre 4 y 6 centímetros por sobre la superficie del nitrógeno líquido (Maxwell y col., 1995).

3.1.5 Descongelación.

La recuperación de la supervivencia espermática post-descongelación, depende en gran parte del método de descongelación. Fiser y col. (1986), afirman que la velocidad de descongelación es uno de los factores mas importantes que afectan a la viabilidad espermática.

Los espermatozoides que han sobrevivido a la congelación a -196°C se enfrentan ahora a la fase de calentamiento y descongelación, y para esto deben atravesar nuevamente las dos temperaturas críticas. La descongelación al igual que enfriamiento, ejerce un efecto negativo en la sobrevivencia del espermatozoide (Salamon, 1995a).

A una velocidad de descongelación rápida, el espermatozoide se expone por un tiempo más corto al soluto concentrado y al crioprotector, esto hace que la restauración del equilibrio intra-extracelular sea más rápida que en la descongelación lenta (Salamon y Maxwell, 2000).

Para el semen de carnero congelado en pajuelas la temperatura de descongelación más frecuentemente utilizada ha sido de $38-42^{\circ}\text{C}$. Algunos reportes indican que los resultados que arroja la descongelación a altas temperaturas ($60-75^{\circ}\text{C}$), son comparables con los obtenidos a temperaturas menores ($38-42^{\circ}\text{C}$), sin que esto produzca diferencias considerables en la motilidad post descongelación, integridad de acrosoma y fertilidad (Salamon y Maxwell, 2000).

Temperaturas entre 37 y 75°C han sido examinadas y generalmente las mejores tasas de motilidad post-descongelación son observadas a las temperaturas más altas. Para mantener el beneficio de descongelar a altas temperaturas sin el riesgo de recalentar el semen, se

recomienda el uso de descongelación interrumpida o el uso de artefactos especialmente diseñados para descongelar pajuelas.

Después de la descongelación el espermatozoide puede conservar su motilidad, aún resultando dañado, en este caso es dudoso si tal célula será capaz de fecundar un ovocito. La motilidad y la estructura del espermatozoide se afectan en diferentes intensidades y no se sabe si los cambios ocurren simultáneamente o son causados en diferentes etapas del proceso de congelación. Aunque una proporción relativamente alta de los espermatozoides (40-60%), preserva su motilidad luego de la congelación-descongelación, solo un 20-40% permanece biológicamente intacto (Salamon y Maxwell, 2000).

3.2 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA

Austin y Chang en 1951 descubrieron en forma independiente que los espermatozoides de los mamíferos deben residir en el aparato reproductor femenino durante algunas horas para adquirir su capacidad fecundante, este proceso fue llamado capacitación espermática, y se cree que comienza en el útero aunque el principal sitio de capacitación parece ser el oviducto, específicamente la región del istmo (Hunter 1983).

Si bien los eventos moleculares que ocurren durante la capacitación espermática no están del todo claros, se sabe que ocurren algunos cambios bioquímicos y ultraestructurales en los componentes glicoproteicos y lipídicos de la membrana plasmática, que son capaces de modificar canales iónicos y que en conjunto envuelve una serie de eventos que finalmente tienen como resultado la reacción del acrosoma (Harrison, 1996).

Dentro de estos cambios se encuentra la eliminación de factores decapacitantes, interacción de las células espermáticas con los factores capacitantes presentes en los fluidos del tracto genital femenino, cambios en la composición lipídica de la membrana espermática, aumento de la permeabilidad a los iones de Ca^2 , cambios en el pH interno e incremento de la permeabilidad y del metabolismo celular. El único fenómeno observable al microscopio, como consecuencia de la capacitación, es un incremento del patrón de motilidad y velocidad, este fenómeno es denominado hipermotilidad (Hafez, 1996).

El primer requisito para que la capacitación espermática se lleve a cabo es la remoción de algunos componentes adheridos a la membrana del espermatozoide o “factores decapacitantes”, adquiridos durante el tránsito epididimario y la eyaculación. Estos polipéptidos descritos por Chang en 1957, en su mayoría provienen de las glándulas anexas al aparato reproductor masculino y tienen la propiedad de estabilizar y proteger al espermatozoide, retardando la expresión de su capacidad fecundante hasta que ocurra la capacitación espermática y la reacción acrosómica en el tracto femenino. Así, la remoción del plasma seminal es un paso preliminar a la capacitación espermática, proceso complejo rodeado de cambios bioquímicos no del todo bien conocidos.

La capacitación espermática es estimulada por la secreción del tracto reproductivo femenino, mas específicamente por proteínas de alta densidad presentes en el líquido folicular y oviductal cuyas concentraciones varían durante las diferentes etapas del ciclo estral (Ehrenwald y col., 1990), estando sus niveles más altos durante el período preovulatorio (Parrish y col., 1988).

Durante la capacitación el espermatozoide experimenta muchos cambios físicos y de la composición lipídica de su membrana plasmática, uno de los cambios más significativos es la disminución de la relación colesterol:fosfolípidos (Davis, 1981). Estos cambios parecen constituir fenómenos de naturaleza reversible que afectan la permeabilidad de membrana. El colesterol es el esteroide presente en mayor concentración en el eyaculado con un conocido efecto estabilizador sobre las membranas celulares (Parks y col., 1985).

Ehrenwald y col (1988), descubrieron que el ingreso experimental de colesterol al espermatozoide reduce la tasa de reacción acrosómica espontánea e inhibe la fecundación. Estos últimos también observaron que la expulsión del colesterol del espermatozoide desencadena la capacitación. La salida de éste depende de otros componentes que facilitan su extracción.

Lipoproteínas de alta densidad facilitan el eflujo de colesterol que se establece en la membrana plasmática. Por lo tanto, una vez que los espermatozoides han sido depositados en el tracto genital femenino, las proteínas seminales contenidas en la superficie espermática contactan con los fosfolípidos de alta densidad presentes en el oviducto, adquiriendo la facultad de secuestrar el colesterol y otros fosfolípidos. Esta pérdida de lípidos, principalmente colesterol, resulta en una alteración de permeabilidad de la membrana espermática la que permite la entrada de calcio; esto debería convertir los fosfolípidos en lisofosfolípidos capaces de desestabilizar membranas y así comenzar con la reacción acrosómica (Ehrenwald y col., 1988).

Inmediatamente después de la capacitación espermática y antes de la reacción acrosómica hay un aumento del pH intracelular, al menos en una unidad, el cual se refleja en el ambiente extracelular (Working y Meizel, 1983). Este aumento de pH es causado por el intercambio iónico que se establece entre los compartimentos intra y extracelular, liderado por un rápido flujo de calcio que puede estar regulado por quinasas. El aumento intracelular de bicarbonato y peróxido de hidrógeno contribuye también a elevar el pH intracelular.

Algunos autores incluyen a la reacción del acrosoma como un fenómeno que sucede durante la capacitación espermática. Sin embargo muchos concuerdan que la capacitación espermática es una secuencia de cambios bioquímicos que le permiten a los espermatozoides realizar la reacción acrosómica en respuesta a la interacción con la zona pelúcida del ovocito (Palma, 2001).

La capacitación espermática representa una desestabilización de las membranas acrosomales, esto finalmente se traduce en un aumento de la ocurrencia espontánea de la exocitosis acrosomal disminuyendo a su vez la vida media de la población de espermatozoides (Gil y col., 2003).

La verdadera reacción acrosómica consiste en la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosómica externa, seguida por una extensa vesiculación sobre el segmento anterior del acrosoma. La fusión y vesiculación del acrosoma provocan la liberación del contenido acrosomal, permitiendo la acción de enzimas hidrolíticas como hialuronidasa y acrosina, las cuales disuelven la estructura de la zona pelúcida y permiten la penetración del espermatozoide al espacio perivitelino (Tulsiani y col., 1998).

Todos los cambios que ocurren durante la capacitación espermática conducen al aumento del metabolismo y la motilidad del espermatozoide. Se cree que este estado de hiperactividad espermática resulta de la redistribución de los componentes de membrana durante la capacitación espermática (Yanagimachi, 1974).

Ésta hiperactividad espermática cumple varias funciones biológicas necesarias para que se lleve a cabo la fecundación, como incrementar la flexibilidad en el movimiento espermático lo que facilita su penetración a través de las sustancias viscosas del oviducto y del útero, también aumenta las probabilidades de encontrar el ovocito en el lumen del oviducto (Suárez y col., 1992), permite la adhesión espermática a la zona pelúcida y facilita la penetración de ésta (Drobnis y col., 1988).

A través de los años se han propuesto algunos sistemas para producir capacitación *in vitro* en espermatozoides de carnero y de otras especies domésticas, para este fin se menciona el uso de muchas sustancias, una de las más comúnmente utilizadas es la heparina, debido a su similitud con los inductores naturales de este fenómeno presentes en el tracto genital de la hembra (Palma, 2001).

En 1992, Cox y col. reportaron que en semen de carnero incubado con heparina se presentó una mayor ocurrencia de reacción acrosómica y mayores porcentajes de fertilidad que en el semen sin este tratamiento. Esto también fue demostrado en otras especies domésticas como bovinos (Parrish y col. 1988) y caprinos (Cox y col. 1995).

En investigaciones más recientes se ha demostrado que la capacitación experimental con heparina mejora en forma notable las tasas de fecundación logradas artificialmente. (Izquierdo y col. 1998).

La heparina es un grupo heterogéneo de mucopolisacáridos aniónicos de cadena recta, llamados glucosaminoglicanos (GAG), cuya masa molecular varía entre 8.000 y 20.000 daltons. Se le denominó heparina por su abundancia en el hígado, es empleada para la

capacitación espermática *in vitro* y consiste en polímeros de dos unidades repetidas de disacáridos (Palma, 2001).

La heparina es fuertemente ácida por su contenido en grupos sulfato y ácidos carboxílicos de unión covalente. Se puede extraer del pulmón bovino y de la mucosa intestinal de ovejas pero la extracción comercial se lleva a cabo desde la mucosa intestinal porcina (Palma, 2001). Su acción *in vitro* es la que desencadena la capacitación, que finaliza en la reacción acrosómica y permite la penetración del espermatozoide a través de la zona pelúcida (Parrish y col., 1988).

El mecanismo por el cual la heparina promueve la capacitación espermática no está bien establecido. Parrish (1988) sugiere que ésta actúa removiendo los factores decapacitantes adheridos a la membrana plasmática del espermatozoide lo que facilitaría el influjo de calcio hacia el interior de la célula. La heparina parece estimular la tasa de fecundación gracias a su efecto en la capacitación espermática. El tiempo mínimo en que se logra la capacitación de espermatozoides ovinos es de 1- 1,5 horas y la reacción de acrosoma y la penetración del ovocito toma menos de una hora (Cox y col. 1995).

3.2.1 Evaluación de la capacitación espermática.

Luego de terminada la capacitación espermática, el espermatozoide está en condiciones de llevar a cabo la reacción acrosómica, que es caracterizada ultraestructuralmente por una vesiculación de las membranas acrosomales anterior al segmento ecuatorial (Barros y al. 1967). Si bien la técnica ideal para observar este fenómeno es la microscopía electrónica, se han desarrollado técnicas alternativas más sencillas que tienen por objetivo evidenciar el estado de las membranas acrosomales, entre éstas se encuentran tinciones fluorescentes como Chlortetracycline (CTC) y otras tinciones simples que pueden ser evaluadas a la microscopía óptica y de contraste de fases. Una de estas últimas es la triple tinción NEG, ésta tinción desarrollada mediante la combinación de dos técnicas de tinción tradicional (eosina-nigrosina y Giemsa), ha demostrado ser confiable en la determinación del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos además de su estado acrosomal (Tamuli y col., 1994).

Si bien la mayoría de las investigaciones que han llevado a cabo la capacitación espermática *in vitro* se utilizan agentes inductores de la exocitosis acrosomal, como el extracto de zona pelúcida solubilizada o agentes desarrollados para este fin como el ionoforo de calcio A23187 y lisofosfatidilcolina (LC), existe una correlación positiva entre el porcentaje de espermatozoides capacitados y la ocurrencia de exocitosis acrosomal espontánea.

3.3 TÉCNICAS DE SELECCIÓN ESPERMÁTICA

Con el fin de descartar los espermatozoides muertos durante la congelación y la descongelación, elegir los espermatozoides con mayor motilidad progresiva y separar los espermatozoides del líquido seminal y del diluyente, se llevan a cabo técnicas de selección espermática como el swim-up y la gradiente de percoll.

La técnica de swim-up fue desarrollada por Parrish y col. en 1984 y se basa en la capacidad migratoria de los espermatozoides. Éstos son incubados en el fondo de un tubo con medio de cultivo a 39°C por un periodo determinado, en el cual los espermatozoides con motilidad progresiva rectilínea ascienden a través del medio. Luego, determinado volumen del sobrenadante, que contiene la subpoblación de espermatozoides con mejores índices de motilidad, es extraído para determinar su concentración. Si bien se obtienen espermatozoides con muy buena motilidad, su rendimiento cuantitativo es bajo por lo que puede requerir el uso de varias pajueta.

La técnica del percoll selecciona células en base al principio de sedimentación en gradientes de densidad. El percoll es una solución coloidal que se emplea diluida en el medio de cultivo a distintas concentraciones con el fin de separar el semen por centrifugación durante 30 a 40 minutos, los espermatozoides con mayor motilidad quedarán suspendidos en un pellet, el que finalmente es extraído y lavado.

En base a los antecedentes antes mencionados, en el siguiente trabajo se proponen los siguientes objetivos:

- Evaluar las características seminales de tres carneros mediante pruebas rutinarias tales como determinación de volumen, concentración espermática, movimiento de masa, movimiento progresivo, porcentaje de espermatozoides vivos-muertos y determinación de espermatozoides anormales.
- Establecer un protocolo de criopreservación de semen ovino, que permita disponer de espermatozoides descongelados de buena calidad.
- Lograr capacitación espermática *in vitro* en semen fresco y congelado mediante la utilización de medio m-DM con heparina y evaluar la ocurrencia de reacción de acrosoma mediante el uso de la triple tinción NEG (nigrosina-eosina-Giems).

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 REPRODUCTORES Y MANEJO

Los animales utilizados en este ensayo fueron tres carneros de 2 a 3,5 años de edad, pertenecientes al Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile. Estos animales permanecieron estabulados con una alimentación compuesta principalmente por heno de pradera natural de buena calidad, alimento concentrado y agua *ad-libitum*.

4.2 RECOLECCIÓN DEL SEMEN

Los carneros fueron sometidos a un periodo de entrenamiento de aproximadamente dos semanas, durante este período se realizaron recolecciones experimentales con el fin de lograr la aceptación de la vagina artificial. Para la monta se utilizó hembras en celo colocadas en un brete de monta. Para la detección de celo se utilizó un carnero celador provisto de un chaleco que asegura una monta sin penetración.

Los reproductores fueron sometidos a una frecuencia de recolección de semen de tres veces por semana durante los meses de mayo y junio. En cada sesión de recolección se obtuvo un eyaculado por reproductor.

4.3 EVALUACIÓN DEL SEMEN

Las muestras tomadas en cada recolección fueron mantenidas a 30°C y luego transportadas en un contenedor diseñado para evitar la pérdida de temperatura hacia el laboratorio de semen donde fueron depositadas en un baño María a 30°C durante el tiempo de evaluación.

Primero se determinó el volumen de cada eyaculado mediante un vaso colector graduado, al mismo tiempo se evaluó características físicas del semen, como color, olor y cremosidad. A continuación se evaluó el **movimiento de masa**, colocando una pequeña gota sobre un portaobjetos previamente temperado a 30°C, ésta fue observada con el menor aumento en un microscopio de contraste de fases con platina temperada. La puntuación

otorgada a cada eyaculado varió de 1 a 5 según la densidad e intensidad de movimiento en forma de ondas que presentó cada muestra (**Anexo 3**).

Luego se determinó el **movimiento progresivo** de cada eyaculado, diluyendo una gota de cada muestra en una gota de PBS (solución tampón fosfato) a 30°C para disminuir la densidad y así facilitar la lectura. Una gota de esta dilución fue colocada en un portaobjetos y tapada con un cubreobjetos. Se utilizó un microscopio de contraste de fases con aumento 320x. Este parámetro midió subjetivamente, cual es la proporción de células que presentan movimiento hacia adelante. Deben observarse varios campos de la muestra para obtener un valor representativo.

Para determinar **concentración espermática** se utilizaron dos métodos; primero se utilizó el método de la cámara de Neubauer, posteriormente se utilizó un espectrofotómetro marca Turner modelo 360, el cual una vez calibrado, sirvió para facilitar la estimación de la concentración en las muestras posteriores.

La estimación del porcentaje de espermatozoides vivos de cada eyaculado, se realizó mediante la técnica de tinción de eosina-nigrosina, en la cual se mezcló 2 gotas de nigrosina y una de eosina con una gota de semen del mismo volumen sobre un portaobjetos en platina temperada. Se hizo un frotis delgado que luego fue secado al aire y se observó al microscopio con aumento de 320x. Con esta técnica los espermatozoides muertos se tiñen de rojo ya que la eosina difunde en sus membranas acrosómicas, mientras que los vivos permanecen sin teñirse debido a la integridad de sus membranas.

4.4 PROCESAMIENTO Y CONGELACIÓN DEL SEMEN

Se utilizó un diluyente compuesto por Tris, yema de huevo y glicerol (**Anexo 1**). Se calculó el volumen de diluyente para obtener una concentración de 100 millones de espermatozoides por dosis (0,25 ml.) y se mezcló lentamente agregando siempre el diluyente sobre el semen, manteniendo la mezcla a una temperatura de 30°C.

Cada una de las fracciones diluidas se envasó manualmente en pajuelas Minitüb® de 0,25 ml, luego fueron selladas en ambos extremos. Cada pajuela fue identificada con el número del reproductor y la fecha de recolección. Una vez envasadas las dosis fueron sometidas a un período de estabilización (equilibrio) de 2 horas a 5°C para finalmente ser congeladas.

El proceso de congelación se realizó en una caja de poliestireno con una gradilla en su interior, manteniendo durante 8 minutos las pajuelas en vapor de nitrógeno líquido a unos 3-4 cms por sobre la superficie de éste, para lograr una curva de congelación apropiada. Finalmente las pajuelas fueron sumergidas en el nitrógeno líquido para ser congeladas y almacenadas a -196°C en un envase criogénico.

4.5 DESCONGELACIÓN DEL SEMEN

Luego de mantener las pajuelas almacenadas en nitrógeno líquido al menos durante una semana, se tomaron 5 pajuelas de cada carnero y fueron descongeladas por inmersión en agua a 37°C por 15 segundos, secadas e inmediatamente se evaluó el porcentaje de espermatozoides vivos mediante tinción de eosina-nigrosina además del movimiento progresivo por observación al microscopio de contraste de fases (320x) de una gota diluida en PBS.

4.6 PREPARACIÓN DE LOS ESPERMATOZOIDES PARA LA CAPACITACIÓN *IN VITRO*

4.6.1 Semen fresco.

Alícuotas de 70 ul del eyaculado se colocaron bajo 2 ml de medio m-DM (**Anexo 2**) con 50 ug de heparina por ml (H3393 Sigma) en 4 tubos y se realizó la técnica de selección espermática llamada swim-up e incubados por 2 horas en una estufa a 38,5°C. Luego se recolectaron los 750 ul superiores de cada tubo para juntarlos en un tubo de centrifugación de 15 ml. Este pool que contenía los espermatozoides con mayor motilidad, fue centrifugado por 5 minutos a 500 g. Del pellet resultante se tomaron alícuotas de 20 ul para realizar la triple tinción nigrosina-eosina-Giemsa (NEG) con la cual se determinó la relación de espermatozoides vivos-muertos y el grado de reacción acrosómica.

4.6.2 Semen congelado.

Cuatro pajuelas (Minitüb® 0,25 ml, con concentración de 400×10^6 espermatozoides/ml), fueron descongeladas en baño María a 37°C por 30 segundos y depositadas en un tubo de 15 ml. Posteriormente la suspensión fue lavada con 5 ml de medio m-DM (**Anexo 2**) y centrifugada por 5 minutos a 500 g. El pellet resultante se resuspendió en 1 ml de medio m-DM. Alícuotas de 100 ul de la suspensión espermática se colocaron bajo 1 ml de medio m-DM con 50 ug de heparina (H3393 Sigma) en 6 tubos donde se realizó swim-up e incubación por 2 horas en una estufa de incubación a 38,5°C. Luego se recolectaron los 750 ul superiores de cada tubo para juntarlos en un tubo de centrifugación de 15 ml. Este pool fue centrifugado por 5 minutos a 500 g. Del pellet resultante se tomaron alícuotas de 20 ul y se realizó la triple tinción nigrosina-eosina-Giemsa (NEG).

4.7 MÉTODO DE TINCIÓN NIGROSINA-EOSINA-GIEMSA (NEG)

Una gota de la suspensión espermática fue mezclada con una gota de eosina y dos de nigrosina sobre un portaobjetos en platina temperada, se realizó un frotis fino el cual fue secado al aire. Luego, el frotis fue fijado en una solución al 4% de formaldehído en PBS por diez minutos. Posteriormente se lavó durante 7 a 10 minutos en agua corriendo y luego una vez en agua destilada, se volvió a secar al aire y se sumergió en una solución al 20% de Giemsa en agua destilada por 1 hora. Finalmente el frotis se lavó con agua destilada, se secó y fue observado en microscopio de campo claro con aumento de 800x y aceite de inmersión.

Las células vivas aparecieron teñidas con un tono rosado y las células muertas aparecieron claramente teñidas púrpura en la región postacrosómica (**Foto1**). El estado del acrosoma fue fácilmente evaluado por la clara tinción púrpura que presentó el contenido acrosomal (**Foto2**).

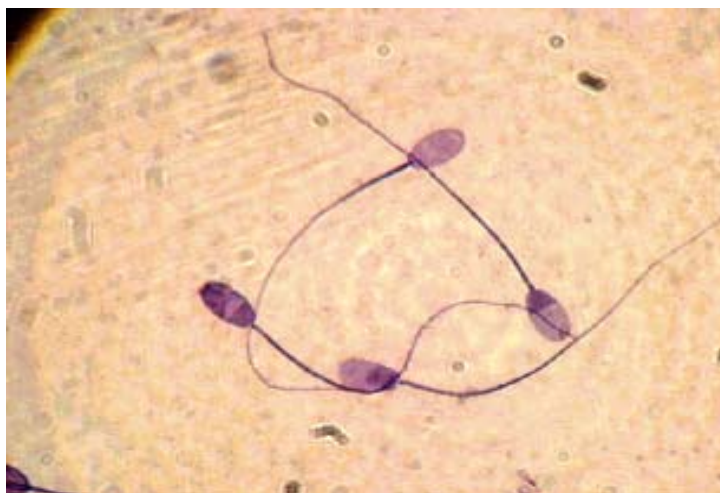


Foto 1. Espermatozoides de carnero teñidos con la coloración **NEG**. Se puede observar las diferentes intensidades de la tinción en el acrosoma y post-acrosoma.

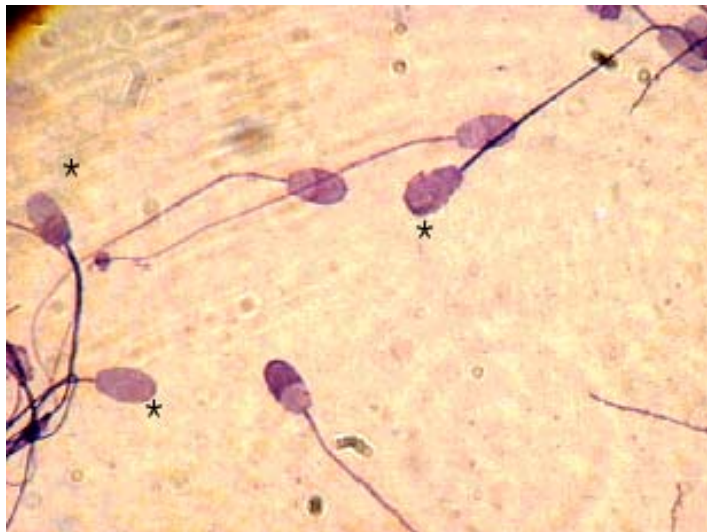


Foto 2. Espermatozoides de carnero teñidos (NEG) con reacción acrosómica (*).

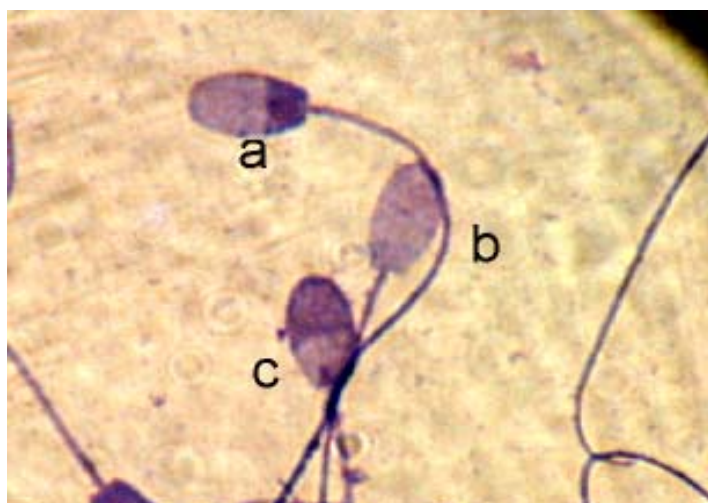


Foto 3. Espermatozoides de carnero teñidos (NEG). Espermatozoide muerto con desprendimiento de acrosoma (**a**); espermatozoide vivo con desprendimiento de acrosoma (**b**); espermatozoide vivo con acrosoma intacto (**c**).

4.8 ANALISIS ESTADÍSTICO

En este trabajo se utilizó una prueba de Regresión Logística comparándose individualmente los resultados obtenidos para semen fresco y congelado con sus respectivos controles, determinándose si las diferencias eran estadísticamente significativas. Para esto se utilizó el Software estadístico Systat (v. 2.0).

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN SEMINAL

Las características del semen fresco obtenido por vagina artificial de los tres carneros se presentan en la **Tabla 1**. En el **Anexo 4**, se muestra la totalidad de los datos obtenidos para cada eyaculado de los tres carneros.

Tabla 1. Características seminales de los tres carneros (n=12 por cada carnero). Se presentan los valores con su respectiva desviación estándar y entre paréntesis el rango correspondiente.

VARIABLE	C A R N E R O			TOTAL
	Durazno	Melón	Plátano	
VOLUMEN (ml)	0,7ml ± 0,14 (0,6 - 0,9)	1,0ml ± 0,15 (0,8 - 1,3)	1,5ml± 0,2 (1,2 - 1,7)	1,1ml ± 0,39 (0,6 - 1,7)
CONCENTRACIÓN (millones/ml)	3.100 ± 580 (2.230 - 3.761)	4.070 ± 392 (3.390 - 4.940)	3.258 ± 812 (2.030 - 4350)	3.476 ± 740 (2.030 - 4.940)
MOVIMIENTO DE MASA (puntaje 1-5)	3,6 ± 1,2	3,5 ± 0,5	3,8 ± 0,7	3,6 ± 0,9
MOVIMIENTO PROGRESIVO (%)	74,2% ± 5,9	72,5% ± 4,5	76,3% ± 10,7	74,3% ± 7,5
ESPERMATOZOIDES VIVOS (%)	74,9 %± 3,3	70,5% ± 4,0	72,7% ± 5,0	72,7% ± 4,5
ESPERMATOZOIDES ANORMALES (%)	12,6% ± 2,4	14,1% ± 2,2	11,8% ± 1,7	12,8% ± 2,2

5.2 EVALUACIÓN DE LA CONGELACIÓN SEMINAL

En la **Tabla 2** se presentan los resultados de motilidad progresiva y vitalidad espermática de semen fresco y congelado-descongelado.

Tabla 2. Motilidad progresiva y vitalidad espermática de semen fresco y congelado-descongelado.

MUESTRA	SEMEN FRESCO	SEMEN CONG./ DESC.
MOTILIDAD PROGRESIVA. (%)	74.5% ±3.9	56.7% ± 4.1
ESPERMATOZOIDES VIVOS (%)	73.7% ± 3.3	58.2% ± 5.5

5.3 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA Y REACCIÓN ACROSÓMICA ESPONTÁNEA

En la **Tabla 3** se presenta el resultado de los conteos celulares y la clasificación de espermatozoides frescos y descongelados con y sin tratamiento de incubación en medio m-DM heparinizado (50 ug/ml).

Cada resultado representa la evaluación de 15 frotis de semen fresco incubado con heparina y 15 de semen congelado-descongelados incubados con heparina y sus respectivos controles.

Tabla 3. Resultados obtenidos en la prueba de capacitación espermática y reacción acrosómica espontánea (CVAI: célula viva con acrosoma intacto; CMAI: célula muerta con acrosoma intacto; CVRA: célula viva con reacción de acrosoma; CMRA: célula muerta con reacción de acrosoma).

Tipo de Muestra	%CVAI	%CMAI	%CVRA	%CMRA
Semen fresco sin heparina.	48,5	19	22,9	9,6
Semen fresco con heparina.	34,9	14,1	44,4	6,6
Semen congelado sin heparina.	39,7	18,7	28	13,6
Semen congelado con heparina.	18,9	34,1	29,5	17,5

Tabla 4. Porcentaje de células con acrosoma intacto y reacción acrosómica en semen fresco de carnero sin dilución.

Tipo de semen	% Acrosomas intactos (Media \pm D.E.)	% Reacción acrosómica (Media \pm D.E.)
Semen fresco	92,92 \pm 2,01	7,08 \pm 1,84

Como se observa en la **tabla 4**, el semen fresco ya presenta cierto porcentaje de reacción de acrosoma que en este caso llegó a un 7%.

Tabla 5. Porcentaje de células con reacción acrosómica luego de la incubación en medio m-DM con y sin heparina.

Tipo de semen	% Reacción acrosómica sin heparina	% Reacción acrosómica con heparina
Semen fresco	32,5	51
Semen descongelado	41,6	47

Como se muestra en la **Tabla 5**, después de la incubación en medio sin heparina se registró un 32,5% de espermatozoides con reacción acrosómica para el semen fresco y 41,6% para el semen descongelado. Luego de la incubación en medio con heparina estos valores aumentaron, llegando a un 51% de espermatozoides reaccionantes para el semen fresco, siendo este aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) con respecto al grupo control; el valor registrado para el semen descongelado luego de la incubación en medio heparinizado fue de un 47%, si bien este aumento no es significativo ($p < 0,05$), podría interpretarse como efecto de la heparina.

6. DISCUSIÓN

6.1 EVALUACION SEMINAL

Como se muestra en la **Tabla 1** los eyaculados colectados se caracterizaron por presentar diferencias entre carneros, especialmente en cuanto a volumen y concentración espermática, sin embargo, pese a estas diferencias todos los valores obtenidos para estos dos parámetros están dentro de los rangos descritos como normales por Cole (1977) quien propone para volumen un rango de 0,5 a 2 ml. y para concentración espermática un rango de 2.000 a 5.000×10^6 espermatozoides por ml.

En relación al volumen, Evans (1987) estableció un rango más estrecho (1 a 2 ml.), por lo tanto algunos eyaculados, principalmente del carnero 1, estarían ligeramente fuera de este rango.

Díaz y Arancibia (1971) propusieron volúmenes con una media (\pm D.E.) $0,95 \pm 0,29$, cabe destacar que estos valores fueron obtenidos mediante electroeyaculación. Según estos últimos datos las medias obtenidas por el carnero 1 serían inferiores a la normalidad, pero hay que considerar que según Mattner y Voglmayr (1962), la recolección por electroeyaculación arrojaría eyaculados más voluminosos, menos concentrados y con menor motilidad.

Los valores obtenidos para la motilidad progresiva y de masa presentados en la **Tabla 1** son similares a los propuestos por otros autores para carneros reproductores adultos. Díaz y Arancibia (1971) obtuvieron en carneros adultos una media (\pm D.E.) de $3.348 \pm 1.157 \times 10^6$ espermatozoides por ml. y Asdell (1964) obtuvo una media (\pm D.E.) $1.537 \pm 41 \times 10^6$ espermatozoides por ml.

Las variaciones observadas entre eyaculados, probablemente se deben a condiciones ambientales, ya que se ha propuesto que a mayor pérdida de temperatura más afectada se ve la motilidad espermática. Esto se observó particularmente en los días más fríos donde se obtuvo los eyaculados con valores de motilidad más bajos.

Otro factor que influyó en los parámetros de motilidad espermática fue el tiempo transcurrido entre la obtención del eyaculado y su evaluación, a mayor tiempo transcurrido menores fueron los valores de motilidad espermática, viéndose mayormente afectada la motilidad de masa. Éste hecho debe considerarse si se desea trabajar rutinariamente con semen de carnero, ya que en el Instituto de Reproducción Animal el lugar donde se recolecta el semen está a unos 100 metros del laboratorio donde éste se evalúa.

En cuanto a la evaluación de la morfología de los espermatozoides, Díaz y Arancibia (1971), establecieron una pauta de clasificación del semen ovino:

- Óptimo, menos de 15% de anormalidades.
- Bueno, entre 15-20% de anormalidades.
- Regular, 20-25% de anormalidades.
- Malo, más de 25% de anormalidades.

Según esta clasificación el semen obtenido de los tres carneros puede ser considerado óptimo en lo que se refiere al porcentaje de anormalidades.

Finalmente cabe mencionar que las diferencias comúnmente encontradas en todas las variables medidas en eyaculados de carneros y de otros mamíferos, pueden asociarse a las diferencias en la constitución genética, raza, edad, época del año, alimentación, frecuencia de recolección y excitación sexual previa a la eyaculación (Hafez, 1996).

6.2 EVALUACIÓN DE SEMEN POST-DESCONGELACIÓN

Como se observa en la **Tabla 2**, la motilidad progresiva y la vitalidad espermática fueron los parámetros elegidos para evaluar el efecto de la criopreservación en los espermatozoides, por ser estas dos variables la que más se ven afectadas durante este proceso (Salamon, 2000).

Tanto la calidad como la viabilidad de los espermatozoides de carnero se deterioran como consecuencia de la congelación y descongelación (Fiser y col., 1991) provocando entre otros, deficiencia en la integridad de las membranas espermáticas, pérdida de motilidad (Salamon 1995) y baja en las tasas de fertilidad (Watson 1981).

Luego de varias pruebas pre-experimentales de congelación de semen, se observó que menores tasas de dilución tienen como resultado una mayor proporción de espermatozoides vivos post-descongelación y a su vez mayores índices de motilidad progresiva. Este hecho coincide con lo descrito por D'Alessandro y col. (2001), quien afirma que las menores tasas de mortalidad espermática y de pérdida de motilidad post-descongelación se obtuvieron con una concentración de 400 millones de espermatozoides por ml.

Al comparar la vitalidad espermática y el movimiento progresivo del semen fresco con respecto al semen descongelado (**Tabla 2**), se observa que existe una disminución de las dos variables medidas. Esto coincide con lo expresado por Hafez (1996), quienes afirman que la motilidad inicial del semen fresco de carnero varía entre 60 y 80%, a su vez Salamon y Maxwell (2000), afirman que la motilidad post-descongelación baja a valores de 40 a 60%.

En el presente estudio, los porcentajes de motilidad progresiva obtenidos luego del proceso de criopreservación fueron similares a los descritos para semen ovino por Gil y col. (2000), quienes usando un diluyente en base a leche descremada, yema de huevo, glicerol y fructosa obtuvieron porcentajes de motilidad progresiva post-descongelación de 55-59%.

D' Alessandro y col. (2001), reportaron una motilidad progresiva post-descongelación de 61% usando un diluyente compuesto por Tris, yema de huevo, glicerol y fructosa.

El-Alamy y Foote (2001), utilizando el mismo diluyente usado en este trabajo obtuvieron una motilidad progresiva post-descongelación de 41-47%.

Estas diferencias son aceptables para un protocolo de criopreservación de semen ovino y son asociadas a los procesos físicos propios del proceso.

En líneas generales el método de criopreservación aplicado puede calificarse como exitoso ya que permitió la recuperación de un número satisfactorio de células espermáticas vivas con buena motilidad progresiva.

6.3 CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA *IN VITRO*

El primer signo de capacitación espermática observado consistió en un estado de hiperactividad espermática, aunque la motilidad progresiva disminuyó, se observó aumento de los movimientos laterales del espermatozoide, presentando ésta una mayor frecuencia de batido flagelar, este fenómeno según Suárez (1992), cumple varias funciones biológicas necesarias para que se realice la fecundación, entre las que se encuentran incrementar la flexibilidad en el movimiento espermático para facilitar su penetración a través de las sustancias viscosas del oviducto y del útero y aumentar así las probabilidades de encontrar el ovocito en el lumen del oviducto entre otras.

Otro fenómeno observado a la evaluación microscópica del semen capacitado, fue la formación de algunos grupos de espermatozoides unidos por la región acrosómica que se desplazaban como un conjunto. Esto concuerda por lo descrito por Parrish y col. (1988), quienes afirman que la heparina induce cierto grado de aglutinación espermática y que ésta aumenta a mayores concentraciones de heparina.

Como se observa en la **Tabla 3**, se produjo una considerable mortalidad espermática luego del tratamiento, teniendo en cuenta que luego de la selección espermática (Swim-up) la subpoblación obtenida contaba con un gran número de espermatozoides vivos. Cierta porcentaje de esta mortalidad espermática debe ser atribuido a la centrifugación a la cual fueron sometidos los espermatozoides durante el experimento. Otro porcentaje se le atribuye a la pérdida de las características del medio de incubación ya que periodos de incubación extendidos producen una aumento de la mortalidad espermática atribuible al aumento del

metabolismo y los requerimientos celulares, lo que produce un agotamiento de los nutrientes que componen el medio de incubación.

Los resultados obtenidos luego de la tinción de los espermatozoides incubados en medio de capacitación son presentados en la **Tabla 3**. El aumento en la presentación de reacciones acrosómicas se considera como un indicador de la capacitación espermática, aunque cierta parte de este aumento se debe a otros factores como la eliminación de sustancias decapacitantes adheridas a la superficie de los espermatozoides.

Como se expresa en la **Tabla 4**, el semen aún sin ser tratado presenta cierto porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica, si bien este porcentaje es bajo, debe ser considerado y no debe atribuirse al efecto de la incubación.

Como se observa en la **Tabla 5**, luego de la incubación en ausencia de heparina, existe un alto porcentaje de espermatozoides con reacción de acrosoma tanto en semen fresco como en semen descongelado. Este hecho puede atribuirse a la dilución, centrifugación y a la migración espermática en el medio de incubación; ya que estos ejercen un efecto de lavado de los espermatozoides lo que les permite liberarse de las proteínas del plasma seminal y factores decapacitantes adquiridos durante el tránsito por el epidídimo, cuya función es retrasar la capacitación espermática. La eliminación de estos factores tendría una incidencia considerable en el número de espermatozoides capacitados que presentan reacción de acrosoma.

Los resultados presentados en la **Tabla 3**, muestran que la incubación de poblaciones espermáticas expuestas a condiciones de capacitación, provoca un aumento en la tasa de presentación de reacción acrosómica. Esto permite establecer que la inclusión de heparina en el medio de incubación afecta positivamente la presentación de reacción acrosómica espontánea lo que está directamente relacionado con el grado de capacitación espermática de la población.

Cabe destacar también el hecho de que al mantener semen fresco (sin dilución) en oscuridad y a temperatura ambiente se produce una maduración prematura de las membranas acrosómicas la cual lleva a la presentación de capacitación en una proporción de la población espermática. Esto fue demostrado en un estudio realizado por Pérez y col. (1997) quienes afirman que la conservación de semen fresco a temperatura ambiente durante determinados períodos de tiempo produce capacitación espermática, registrándose luego de mantener el semen durante cuatro horas alrededor de un 50% de espermatozoides capacitados.

En el caso de los espermatozoides sometidos a criopreservación, la proporción de espermatozoides con reacción acrosómica es aún mayor, ya que a los factores descritos antes para el semen fresco se suma el efecto del proceso de congelación-descongelación, que como fue descrito por Maxwell y Watson (1996), produce desestabilización de las membranas espermáticas, lo que se refleja en cambios muy similares a la verdadera reacción de acrosoma.

De la proporción de espermatozoides con reacción acrosómica que se observa en la **Tabla 5**, solo una fracción corresponde al efecto capacitante de la heparina en el medio de incubación, ya que investigaciones anteriores han demostrado que tanto la congelación-descongelación (Salamon, 1995) como la incubación (Pérez y col, 1997) de espermatozoides inciden en la presentación de capacitación espermática y reacción acrosómica.

En una investigación realizada por Gil y col. (2003), se determinó que luego del proceso de congelación-descongelación de semen de carnero, el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica fue cercano al 15%. Por lo tanto hay que considerar valores similares a este como efecto de la criopreservación y no atribuirlo al efecto de la heparina o al medio de incubación.

En investigaciones realizadas por Cox y col. (1995) en semen caprino, se demostró el efecto positivo de la heparina en la presentación de capacitación espermática y reacción acrosómica, constatando un aumento considerable en las tasas de fertilidad de los espermatozoides luego de una incubación en medio heparinizado, produciendo capacitación espermática y disminuyendo el tiempo de interacción necesario entre el espermatozoide y el ovocito para producir la fecundación *in vitro*.

Parrish y col. en 1988, demostraron la habilidad de la heparina para producir capacitación espermática y reacción acrosómica en espermatozoides bovinos, llegando a obtener hasta un 80 % de espermatozoides reaccionantes. El mayor porcentaje de reacciones acrosómicas en relación al obtenido en este trabajo, se atribuye a mayores tiempo de incubación, al uso de Lisofosfatidilcolina (LC) un inductor de la reacción de acrosoma en espermatozoides capacitados y además al uso de microscopía electrónica y de fluorescencia, las que permiten captar con mayor agudeza los cambios de las membranas espermáticas que sugieren la presentación de reacción acrosómica en diferentes grados.

Vilanova (1994), realizó una prueba de capacitación espermática *in vitro* de espermatozoides bovinos, los que fueron incubados por 6 horas en medio heparinizado. La proporción de espermatozoides con reacción acrosómica obtenida para semen descongelado fue de alrededor del 70% cifra bastante alta si la comparamos con los resultados obtenidos en este trabajo (**Tabla 5**). Estas diferencias, indican que debería considerarse la aplicación de tiempos de incubación más prolongados, lo que podría producir un aumento de la subpoblación de espermatozoides capacitados con reacción de acrosoma.

Se debe tener en cuenta que en incubaciones más extensas comienza a deteriorarse la vitalidad y funcionalidad espermática, por lo tanto se debe encontrar un punto de equilibrio que arroje la mayor cantidad de espermatozoides capacitados y que a su vez éstos conserven su fertilidad.

Si bien se registró un aumento en la presentación de la reacción acrosómica luego de la incubación en medio de capacitación, este valor no corresponde al total de la población espermática capacitada, ya que este método de tinción sólo permite establecer la cantidad de células con reacción de acrosoma evidente.

El uso de otras técnicas como la microscopía electrónica y de fluorescencia permiten saber con más exactitud la proporción de la población espermática que está realmente capacitada, ya que ponen en evidencia menores grados de alteración de membranas acrosómicas que indican capacitación espermática y que no se advierten con la tinción utilizada en este trabajo.

Aunque quedan muchos detalles y factores a considerar en el proceso de capacitación espermática *in-vitro*, los resultados obtenidos en este experimento son alentadores ya que en dos oportunidades se utilizó espermatozoides capacitados por este método para pruebas de fecundación *in vitro* y en ambas se logró penetración del ovocito y división celular, con esto se establece que los espermatozoides sometidos a este tratamiento se capacitaron.

Como conclusión puede estimarse que:

- Las características seminales evaluadas de los carneros en estudio están dentro de los rangos considerados normales.
- El protocolo de criopreservación utilizado en este trabajo puede ser considerado como satisfactorio, ya que arrojó un 58% de supervivencia espermática con un 56% de motilidad progresiva.
- La incubación por dos horas en medio m-DM induce reacción acrosómica en semen fresco y congelado-descongelado.
- La heparina aumenta significativamente ($P < 0,05$) la presentación de reacción acrosómica en semen fresco con respecto al grupo control. Para semen congelado-descongelado pese a que no se registraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, el leve aumento en la presentación de reacción acrosómica se atribuye a la propiedad capacitante de la heparina.
- El proceso de congelación/descongelación aumenta la presentación de reacciones acrosómicas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ASDELL S.A.** 1964. Patterns of mammalian reproduction. Comstock, New York. 2^a ed., pp:640.
- BRACKETT B., G. OLIPHANT.** 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol. Reprod.* 12, 260-274.
- COLE H.H., P. CUPPS.** 1977. Reproduction in domestic animals. Academic Press, Philadelphia. 3^a ed., pp:249-254.
- COX J., F. SARAVIA.** 1992 . Uso de un test de penetración espermática múltiple en ovinos. Proc. XVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal, Chillán.
- COX J., F. SARAVIA, M. BRIONES, A. SANTA MARIA.** 1995. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 44, 451-460.
- COX J., F. SARAVIA, M. BRIONES, A. SANTA MARIA.** 1997. Efecto de la heparina en la capacidad fecundante *in vitro* de espermatozoides caprinos. *Arch. Med. Vet.* 29, 264-267.
- CHAMBERLAND A., V. FOURNIER, S. TARDIF, M. SIRARD, R. SULLIVAN, BAILEY J.** 2000. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. *Theriogenology* 55, 823-835.
- D' ALESSANDRO A.G., G. MARTEMUCCI, M. COLONNA, A. BELLITTI.** 2001. Post-thaw survival of ram spermatozoa and fertility after insemination as affected by prefreezing sperm concentration and extender composition. *Theriogenology* 55, 1159-1170.
- DAVIS B.K.** 1981. Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7560-7564.

- DÍAZ H., C. ARANCIBIA.** 1971. Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos (carnero, potro, toro y verraco). Imprenta Vera y Giannini 6. Chile, pp:56-84.
- DROBNIS E.Z., A.I. YUDIN, G.N. CHER, D.F. KATZ.** 1998. Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Dev Biol.* 130, 311-323.
- EHRENWALD E, FOOTE R., PARKS J.** 1990. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. *Mol. Reprod. Dev.* 25,195–204.
- EHRENWALD E., J.E. PARKS, R.H. FOOTE.** 1988. Cholesterol efflux from bovine sperm. I induction of the acrosome reaction with lysophosphatidylcholine after reducing sperm cholesterol. *Gamete Res.* 20, 145-157.
- EL-ALAMY M.A., R.H. FOOTE.** 2001. Freezability of spermatozoa from finn and dorset rams in multiple semen extenders. *Animal Rep. Sci.* 65, 245-254.
- EVANS G., W.M.C. MAXWELL,** 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney.
- FISER P., R. W. FAIRFULL.** 1986. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolarity of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. *Theriogenology* 25, 473-484.
- FRASER A.F.** 1968. Progress in the artificial isemination of sheep with frozen semen. 6th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Paris, vol 2, pp:1033-1038.
- FURUYA S., Y. ENDO, M. OBA, Y. MATSUI, S. NAZAWA, S. SUSUKI.** 1992. Protein phosphorylation regulates the mouse sperm acrosome reaction induced by the zona pellucida. *J. Assist. Reprod. Genet.* 9, 384-390.
- GRAHAM E., B. CRABO, M. PACE.** 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J. Anim. Sci.* 47, 80-119.

- GIL, J., N. LUNDEHEIM, L. SODERQUIST, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ.** 2003. Influence of extender, temperature and addition of glycerol post thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 5, 1241-1255
- HAFEZ E.S.** 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial Interamericana 6ª ed. EUA, pp:180-185.
- HARRISON R.A.** 1996: Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fert. Dev.* 8, 581-594.
- HOLT W.V.** 2000 Basics aspects of frozen storage of semen. *Animal Rep. Sci.* 63, 3-32.
- HUANG T.T., A.D. FLEMMING, R. YANAGIMACHI.** 1981. Only acrosome reacted spermatozoa can bind to and penetrate zona pellucida: a study using guinea pig. *J. Exp. Zool.* 217, 287-290.
- HUNTER R.H.** 1983. Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. *J. Exp. Zool.* 228, 121-128.
- IZQUIERDO D., P. VILLAMEDIANA, M. PALOMO, T. MOGAS, M. PARAMIO.** 1998. Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 49, 1501-1513.
- LIGHTFOOT R.G.,S. SALAMON.** 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method; transport and viability of spermatozoa within the genital tract of the ewes. *J. Reprod. Fert. Dev.* 63, 861-867.
- LEE C.N, M. CLAYTON, S. BUSHMEYER, N.L. FIRST, R. AX.** 1986. Glycosaminoglycans in ewe reproductive tracts and their influence on acrosome reactions in bovine spermatozoa *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 63, 841-856.
- MAXWELL W.C.M., A.J. LANDERS, G. EVANS.** 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets straws and minitubes. *Theriogenology* 43, 1201-1210.

- MERKIES K., B. LARSSON, B. ZHANG, M. BUHR, H. RODRIGUEZ-MARTINEZ** 2000. Relationship between heparin binding to spermatozoa and the fertility of dairy bulls. *Theriogenology* 54, 1249-1258.
- MORRIER A., F. CASTONGUAY, J. BAILEY.** 2002. Glycerol addition and conservation of fresh and cryopreserved ram spermatozoa. 2002. *Can. J. Anim. Sci.* 82, 347-356.
- MORROW D.A.** 1986. Current therapy in theriogenology. W.B. Saunders Co. 2^a ed. Philadelphia. pp:88-883.
- OLLERO M., R. PEREZ, T. MUIÑO-BLANCO, J. CEBRIAN-PEREZ.** 1998. Improvement of ram sperm cryopreservation protocols assessed by sperm quality parameters and heterogeneity analysis. *Cryobiology* 37, 1-12.
- PALMA G.A.** 2001. Biotecnología de la reproducción. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) 1^a ed. Argentina, pp:246-248.
- PARKS J., HAMMERSTEDT R.** 1985. Developmental changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membranes. *Biol. Reprod.* 32, 653–668.
- PARRISH J.J, J.S. PARRISH, M. WINER, N.L. FIRST.** 1988. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171-1180.
- PEREZ L., A. VALCARCEL, M. DE LAS HERAS, D. MOSES, H. BALDASSARRE.** 1996. *In vitro* capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology* 45, 1037-1046.
- PEREZ L., A. VALCARCEL, M. DE LAS HERAS, D. MOSES, H. BALDASSARRE.** 1997. The storage of pure ram semen at room temperature results in capacitation of a subpopulation of spermatozoa. *Theriogenology* 47, 549-558.
- SALAMON S.** 1972. Fertility of ram spermatozoa frozen-stored for three years. Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I. Munich, vol 2, pp:1493-1495.

- SALAMON S., R.J. LIGTHFOOT**, 1969. Freezing of ram spermatozoa by the pellet method I. The effect of diluent composition on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22, 1527-1546.
- SALAMON S., W.M.C. MAXWELL**, 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Rep. Sci.* 37, 185-249.
- SALAMON S., W.M.C. MAXWELL**, 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Animal Rep. Sci.* 38, 1-36.
- SALAMON S., W.M.C. MAXWELL**, 2000. Storage of ram semen. *Animal Rep. Sci.* 62, 77-111.
- SALAMON S., D. VISSER**. 1972. Effect of composition tris-based diluent and of thawed solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* 25, 605-618
- SADHAN B., J. ANIL, S. NAQVI, P. RAWAT, J. MITTAL**. 2002. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. *Animal Rep. Sci.* 72, 175-183.
- SOMFAI T., S. BODÓ, S. NAGY, A. 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. *Rep. Dom. Anim.* 37, 285-290.
- SUAREZ S.S.** 1992. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod.* 46, 686-691.
- TAMULI M., P. WATSON**. 1994. Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. *Animal Rep. Sci.* 35, 247-254.
- TULSIANI D.R., A. ABOU-HAILA, C.R. LOESER, B.M. PEREIRA**. 1998. The biological and functional significance of the sperm acrosome and the acrosome enzymes in mammalian fertilization. *Exp Cell Res.* 240, 151-164.

- YOUNIS A., K. ZUELKE, K. HARPER, M. OLIVEIRA, B. BRACKETT.** 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol. Reprod.* 44, 1177-1182.
- VILANOVA L.T.** 1994. Estimación de la viabilidad y la capacidad fecundante del semen bovino empleado en la inseminación artificial. Tesis de Magíster en Ciencias mención en Reproducción Animal Universidad Austral de Chile.
- VISSER D., S. SALAMON.** 1973. Fertility of ram spermatozoa frozen in a tris-based diluent. *Aust. J. Biol. Sci.* 26, 513-516.
- WATSON P.F.** 1975. Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet Rec.* 97, 12-15.
- WATSON P.F.** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 871-891.
- WATSON P.F.** 1981. The roles of lipids and protein in the protection of ram spermatozoa at 5° C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62, 483-492.
- WATSON P., I. MARTIN.** 1972. A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 28, 99-101.
- WHITE I.G.** 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation. *Reprod. Fertil. Dev.* 5, 639-658.
- WORKING P.K., S. MEIZEL.** 1983. Correlation of increased intraacrosomal pH with the hamster sperm acrosome reaction. *J Exp Zool.* 227, 97-107
- YOUNGQUIST R.S.** 1997. Current therapy in large animals theriogenology. W.B. Saunders Co., Philadelphia. pp:585-593.
- YANAGIMACHI, N. USUI.** 1974. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp. Cell. Res.* 89, 161-74.

8. ANEXOS

ANEXO 1**Medio de capacitación espermática m-MD (modified Defined Medium).**

Componentes	g/l	mM
NaCl	6,550	112,00
KCl	0,300	4,02
CaCl ₂ •2H ₂ O	0,330	2,25
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0,113	0,83
MgCl ₂ •6H ₂ O	0,106	0,52
NaHCO ₃	3,104	37,00
Glucosa	2,500	13,90
Ácido pirúvico†	0,110*	1,25
Albúmina sérica bovina (BSA)	6,000	
Sulfato de gentamicina	50 ug/ml	
Heparina**	50 ug/ml	
Agua destilada	llevar a 1000ml	

† Cuando se usa ácido pirúvico, el pH debe ser ajustado por adición gota a gota de NaOH 1N para llegar pH de 7.8.

*Puede usarse 0.1375 g/l de piruvato de sodio, lo que hace innecesario ajustar el pH con NaOH.

** Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA.

ANEXO 2**Preparación del diluyente según Salamon's artificial insemination of sheep and goats.**

A 25 ml de agua destilada, agregar los siguiente:

Tris.....	1,82	gr.
Glucosa.....	0,25	gr.
Ácido cítrico.....	0,995	gr.
Yema de huevo.....	7,5	ml
Glicerol.....	2,5	ml

Llevar a 50 ml con agua destilada.

ANEXO 3**Sistema de puntuación para movimiento de masa. (Salamon's artificial Insemination of Sheep and Goats, Evans G., WMC Maxwell, 1987).**

Puntuación	Clasificación	Descripción
5	Muy bueno	Denso, muy rápido movimiento de olas. No es posible ver células espermáticas individuales. 90% o más de actividad.
4	Bueno	Movimiento vigoroso, pero las olas y remolinos no son tan rápidos. 70-85% de células espermáticas vivas.
3	Regular	Solo pequeñas olas con movimiento lento. Es posible ver células espermáticas individualmente. 45-65% células espermáticas activas.
2	Malo	No hay formación de olas, pero es visible algún movimiento de espermatozoides. 20-40% de células vivas con movimiento pobre.
1	Muy malo	Solo pocos espermatozoides (10%) muestran signos de vida, con débil movimiento.
0	Muerto	Todos los espermatozoides carecen de movimiento.

ANEXO 4

Descripción estadística de las variables estudiadas (7) para cada individuo (3).

Carnero N°1: Durazno.

Variable	Media	Desv. Estan.	Mínimo	Máximo
VOL	0,7	0,36	0,6	0,9
CONC	3.100	581,35	2.230	3.761
MOT. PROG.	74,17	5,97	70	90
MOT. MASA	3,55	1,23	2,5	5
% VIVOS	74,92	3,26	67	80
% ANORM	12,71	2,44	8,5	15,5

Carnero N°2: Melón.

Variable	Media	Desv. Estan.	Mínimo	Máximo
VOL	1,03	0,15	0,8	1,3
CONC	4.070	3.92.31	3.390	4.940
MOT. PROG.	72,5	4,52	65	80
MOT. MASA	3,5	0,52	3	4
% VIVOS	70,5	4,03	65	77
% ANORM	14,29	2,21	10,5	18

Carnero N°3: Plátano.

Variable	Media	Desv. Estan.	Mínimo	Máximo
VOL	1,5	0,5	1,2	2
CONC	3.259	812,21	2.030	4.350
MOT. PROG.	76,25	10,69	50	90
MOT. MASA	3,83	0,72	2,5	5
% VIVOS	72,67	5,03	61	78
% ANORM	11,17	1,68	9	14

ANEXO 5

Detalle de los resultados obtenidos para todos los eyaculados (n=12) sometidos a evaluación.

Carnero N°1: Durazno.

MUESTRA	VOL	CONC.	M. MASA	M. PROG.	% VIVOS	%ANORM
1	0,6	2,6	4	75	80	14
2	0,7	2,33	3	70	75	9,5
3	0,7	3,72	4	70	75	8,5
4	0,9	3,32	4,5	75	74	10,5
5	0,9	3,74	3,5	70	67	11
6	0,8	2,35	4	90	73	15
7	0,7	2,23	3	75	75	15,5
8	0,6	3,58	3	70	73	11,5
9	0,7	3,76	5	80	76	15
10	0,6	3,18	2,5	70	78	13,5
11	0,6	3,3	3	75	75	13
12	0,7	3,1	4	70	78	15,5

Carnero N°2: Melón.

MUESTRA	VOL	CONC.	M. MASA	M. PROG.	% VIVOS	%ANORM
1	1	4,3	4	70	70	15
2	1,3	4,9	3	65	67	12,5
3	1,1	3,4	3	70	65	10,5
4	0,9	4	3	70	72	11,5
5	1,2	3,6	4	75	68	13
6	1	4,1	4	75	70	14,5
7	1,1	4,4	4	70	65	17,5
8	0,8	3,9	3	70	72	14
9	1,2	4,2	3	80	76	15
10	1	3,9	4	75	75	15,5
11	0,9	4,1	3	80	77	14,5
12	0,9	4	4	70	69	18

Carnero N°3: Plátano.

MUESTRA	VOL	CONC.	M. MASA	M. PROG.	% VIVOS	%ANORM
1	1,2	2,96	4	70	68	12,5
2	1,2	2,3	5	75	70	14
3	1,3	4,35	3	70	61	11
4	1,4	2,4	4.5	80	70	10
5	1,5	2,03	4.5	80	75	9
6	1,2	2,67	3	70	78	10,5
7	1,7	4,34	4	85	70	13
8	1,6	4,1	3.5	75	76	12,5
9	1,2	3,05	3	85	77	9
10	1,7	3,81	4	85	78	9,5
11	1,4	3,65	4	70	75	10,5
12	1,6	3,21	2.5	85	74	12,5

9. AGRADECIMIENTOS

- Proyecto FIA BIOT-01 P 063 (financiamiento).
- Al Profesor patrocinante de este trabajo Dr. Jorge Correa S. por su tiempo, paciencia y disposición cuando fue requerido, pero por sobre todo por su amistad y confianza.
- Al Dr. Mario Martínez y Dra. Danaí Bücher por los consejos y disposición durante el desarrollo de este trabajo.
- A todos los integrantes del Instituto de Reproducción Animal de la UACH, en especial a la Sra. Carmen Schüller quien siempre estuvo dispuesta a ayudarme cuando lo necesite.
- A Dani, Rata, Pancho, Marcelo-co, Mabri y negro Neira por su amistad y apoyo.
- A mi hermano Rodrigo por su ayuda y apoyo.
- A mi Feñita por su apoyo, confianza y simplemente por llegar a mi vida.