

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

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE CONGELACIÓN DE SEMEN OVINO

Memoria de Título presentada como parte de los
requisitos para optar al TÍTULO DE MÉDICO
VETERINARIO.

PAOLA FRANCESCA DALMAZZO HENRÍQUEZ

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Jorge Correa S.

Firma

PROFESOR COLABORADOR

Sra. Carmen Schüler C.

Firma

PROFESORES CALIFICADORES

Dr. Orlando Garrido O.

Firma

Dr. Jorge Oltra C.

Firma

FECHA DE APROBACIÓN: 8 de Agosto de 2008

*A la Olguita,
mis Papas y
a Joshua...*

...Infinitas Gracias

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSIÓN.....	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	30
8. ANEXOS.....	35
9. AGRADECIMIENTOS.....	40

1. RESUMEN

El presente estudio se realizó con el propósito de comparar, mediante motilidad progresiva (MP), dos métodos de congelación de semen de carnero. Para esto se utilizaron dos reproductores adultos, pertenecientes al Proyecto FIA del Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile, que se encontraban clínicamente sanos, mantenidos en estabulación permanente y alimentados con heno de pradera natural, concentrado y agua *ad libitum*. Los eyaculados se obtuvieron con vagina artificial. En la evaluación inicial del semen se estableció volumen, concentración espermática, porcentaje de espermatozoides vivos – muertos, movimiento de masa y movimiento progresivo. Se seleccionaron 10 eyaculados por carnero que cumplieron con los requisitos de poseer más de un 50% de movimiento progresivo y 50% de espermatozoides vivos. Para ambos métodos de congelación, el semen se diluyó en TRIS – citrato - yema de huevo a una concentración de 50 millones de espermatozoides vivos por dosis. El semen diluido se estabilizó a 5° C como mínimo una hora. Posteriormente se colocó tanto las pajuelas (0,25 ml) como los pellets (100 ul) sobre una plancha de acrílico a 3 cm de la superficie del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno por 3 a 4 minutos. Tanto las pajuelas como los pellets fueron sumergidos en el nitrógeno líquido y almacenados como mínimo 24 hrs para su posterior evaluación.

En ambos métodos se utilizaron dos temperaturas de descongelación (37° C y 50° C), considerando el movimiento progresivo como parámetro de evaluación del semen descongelado.

El movimiento progresivo en pellet fue significativamente ($p < 0,01$) más alto comparado al método de la pajuela. La temperatura de descongelación (37° C y 50° C) como la interacción entre ésta y el método de conservación no tuvieron influencia significativa sobre el parámetro evaluado ($p > 0,05$).

En conclusión el método de conservación de semen de carnero congelado - descongelados en TRIS-citrato-yema a 37° C mediante pellet es superior a la pajuela.

Palabras clave: Semen, carnero, motilidad progresiva, pellet, pajuela.

2. SUMMARY

COMPARISON OF TWO DEEP FREEZING METHODS FOR RAM SEMEN.

The present study was carried out in order to compare two methods of frozen ram semen by means of progressive motility (MP). Two adult healthy rams were kept indoors at the Animal Reproduction Institute facilities, Universidad Austral de Chile, fed with natural meadow hay, concentrated and ad - libitum water.

Semen was collected by artificial vagina. Volume, spermatic concentration, percentage of spermatozoa alive - deads, mass and progressive movements were assessed on fresh semen. Ten ejaculates per ram were selected which met the requirement not to have less than 50% of progressive movement or less than 50% of alive spermatozoa. For both freezing methods, the semen was diluted in TRIS – citrate – egg yolk with a concentration of 50 million alive spermatozoa by sample. The diluted semen became stabilized to 5° C for one hour as minimum. After this time, straws (0.25 ml) and pellets (100 ul) were placed on an acrylic plate 3 cm above the liquid nitrogen surface inside a polystyrene box for 3 to 4 minutes. Straws and pellets were submerged in liquid nitrogen and stored 24 hours minimum for later assessment.

In both methods, two different defrost temperatures were used (37° C and 50° C) considering the progressive movement as an evaluation parameter of defrosted semen.

The progressive movement in pellet was significantly higher ($p < 0,01$) than the straw method; the defrost temperature (37° C and 50° C) as well as the interaction between this and the storage method did not have a significant influence on the evaluated parameter ($p > 0,05$).

In conclusion, the storage method of frozen ram semen - defrosted in TRIS – citrate – egg yolk at 37° C by means of pellet is superior to straw.

Key words: Semen, ram, progressive motility, pellet, straw.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 CONSERVACIÓN DE SEMEN OVINO

Los primeros estudios, sobre los efectos de temperaturas bajo cero en la viabilidad espermática se llevaron a cabo por Spallanzani en 1776 (Salamon y Maxwell 1995a), desde esa fecha hasta la actualidad se han logrado desarrollar avanzadas técnicas que han permitido almacenar semen por largos períodos. Sin embargo, la conservación del semen no fue considerada hasta que los criadores de ganado vieron los beneficios que entregaba la inseminación artificial (IA).

Las investigaciones en IA en ovejas fueron iniciadas por Ivanov a comienzos del siglo veinte (1907, 1912), cuyos estudios en medios de dilución y reproducción condujeron al desarrollo y la aplicación práctica de la IA.

Después de la Primera Guerra Mundial, bajo el liderazgo de Milanov se realizó intensivos estudios en la antigua Unión Soviética, usando semen fresco diluido en gran escala en programas de reproducción ovina.

La necesidad de desarrollar programas de mejoramiento genético, utilización de reproductores por largos períodos y en diferentes épocas del año, así como facilitar el transporte de semen de diferentes centros de colección hasta los sitios de inseminación ha estimulado la investigación de la conservación de semen de carnero.

Considerando el uso de bajas temperaturas y de sustancias protectoras que minimicen el daño celular, los dos sistemas principales de conservación de semen son la refrigeración y congelación en nitrógeno líquido (Hermosilla 2006).

En parte, la baja fertilidad obtenida con semen congelado en comparación al semen fresco, se debe a la reducción de la motilidad progresiva de los espermatozoides en los procesos de enfriamiento y congelación. Sin embargo, esto no es la explicación completa, puesto que aún cuando un gran número de espermatozoides motiles son colocados en el cervix, la fertilidad es baja para semen congelado en comparación con el semen fresco (Maxwell y Hewitt 1986).

Aún continúan las investigaciones que permitirán el perfeccionamiento de la técnica de crioconservación de semen, puesto que sus beneficios son diversos y ventajosos

3.2 CONGELACIÓN DE SEMEN OVINO

Las primeras investigaciones del siglo veinte sobre el almacenamiento de semen se iniciaron en la década de los cincuenta; ya en esa época se observaba que sólo una proporción de los espermatozoides era capaz de sobrevivir a los procesos de congelación. La reducción y el incremento de la temperatura que implica la congelación y descongelación, inevitablemente reducen la proporción de espermatozoides móviles y causa daños ultraestructurales, bioquímicos y funcionales (Salamon y Maxwell 1995b).

En el proceso de congelación, la célula espermática es sometida a un descenso gradual de la temperatura, que produce una reducción reversible de su actividad metabólica.

La respuesta de los espermatozoides a la congelación varía según la especie, siendo la especie ovina una de las más sensibles a este proceso (Watson y Martin 1972). Los principales cambios que ocurren durante el almacenamiento incluyen la reducción de la motilidad e integridad morfológica del espermatozoide (Salamon y Maxwell 2000). Por otra parte, existe un rango crítico de temperaturas a la que este gameto es especialmente sensible (-10° y -40° C); además, hay que tomar en consideración que los espermatozoides atraviesan estas temperaturas no sólo en el proceso de congelación, sino también al momento de la descongelación.

Inicialmente, cuando se comenzó a crioconservar semen de carnero, se extrapolaron los métodos y los diluyentes utilizados en la congelación de semen bovino, pero los resultados no fueron los óptimos, ya que la fertilidad al momento de inseminar ovejas resultó muy baja.

Una congelación adecuada debe permitir a los espermatozoides mantener en el tiempo su integridad y capacidad funcional (Merino 2003), además debe permitir a estos gametos atravesar las temperaturas críticas evitando el mínimo daño. Lo anterior es posible utilizando soluciones que tengan un rol protector.

3.2.1 Diluyentes

El plasma seminal sólo otorga al espermatozoide una protección limitada contra los cambios bruscos de temperatura (Salamon y Maxwell 1995a). Por lo tanto, si se requiere

almacenar semen a bajas temperaturas se hace necesaria la utilización de sustancias protectoras que permitirán mantener la funcionalidad de estos gametos.

Los diluyentes utilizados para la preservación de semen de carnero, al igual que las demás especies, deben cumplir con ciertos requisitos, como, contener sustancias que protejan a la célula del daño causado por las bajas temperaturas, proporcionar una fuente de energía (azúcares), poseer capacidad de tampón para prevenir los daños ocasionados por los cambios de pH, mantener la presión osmótica y el balance electrolítico, poseer agentes antibióticos que inhiban el crecimiento bacteriano y por último, aumentar el volumen de las dosis inseminantes.

La mayoría de los diluyentes para la crioconservación del semen ovino son hipertónicos con respecto al plasma seminal, debido a que producen un menor daño que los isotónicos; esto se explica porque inducen a una mayor deshidratación de la célula y en consecuencia reducen el volumen de agua intracelular que se transformará en hielo al momento de producirse la congelación.

A través del tiempo se ha desarrollado una extensa gama de diluyentes, comenzando por los basados en monosacáridos, posteriormente di y trisacáridos hasta llegar a desarrollar sustancias basados en compuestos orgánicos como es el caso del Tris (tris(hidroximetil)aminometano).

Originalmente el Tris se utilizó como el principal componente de los diluyentes para congelación de semen bovino, luego en los años setenta investigadores reportaron su uso para la congelación de semen ovino.

Dentro de sus principales características se considera su buena capacidad tampón, además de poseer una actividad diurética y osmótica, y una baja toxicidad a altas concentraciones.

El diluyente Tris-glucosa elaborado por Salamon y Visser (1972) es el más utilizado y recomendado para el almacenamiento de semen congelado de carnero (Evans y Maxwell 1987).

Salamon y Visser en el año 1972, determinaron que los espermatozoides de carnero toleraban una concentración de Tris en un rango de 250 a 400 mM, y que la glucosa era el azúcar más adecuado como fuente de energía para este tipo de diluyente. Sin embargo, la fructosa es el único carbohidrato simple que se encuentra presente en el semen de carnero, y

los espermatozoides sólo pueden metabolizar la glucosa y la manosa cuando estos azúcares son incluidos en los diluyentes (Salamon y Maxwell 2000); es por esto, que la fructosa es el azúcar de preferencia para la congelación de semen de carnero.

Los azúcares tienen la capacidad de actuar como agentes crioprotectores no penetrantes (De Leeuw y col 1993); su adición a los diluyentes tienen un efecto beneficioso sobre la vitalidad e integridad acrosómica de la célula espermática, además aportan la energía necesaria para que los espermatozoides desarrollen todos sus procesos metabólicos.

En cuanto al pH de los diluyente, el valor óptimo utilizados para la congelación de espermatozoides debe ser lo más cercano a la neutralidad; si esto no se logra, se deben adicionar soluciones tampones.

3.2.2 Agentes crioprotectores

Las lesiones sobre las estructuras celulares debidas a la crioconservación pueden atenuarse mediante la adición de agentes crioprotectores en la elaboración de los diluyentes. Numerosas sustancias han sido identificadas por su acción crioprotectora y muchas de ellas han sido utilizadas con espermatozoides.

Los crioprotectores pueden clasificarse en dos grupos, los llamados penetrantes, intracelulares o permeables, que son sustancias de bajo peso molecular (32 a 212 Daltons), generalmente alcoholes, como el glicerol, dimetilsulfóxido, etilenglicol, etc. Estos crioprotectores se introducen a la célula de forma uniforme, provocando la deshidratación celular por sustitución del agua intracelular, evitando así el incremento de la concentración de solutos ya que reemplaza osmóticamente al agua. Otra característica importante es que disminuyen el punto de congelación del agua; esta característica los hace más efectivo cuando se utilizan bajas tasas de enfriamiento, ya que de esta forma, ayudan a disminuir la formación de cristales de hielo.

El otro gran grupo son los crioprotectores llamados no penetrantes, extracelulares o no permeables, que son sustancias de alto peso molecular y generalmente azúcares como la glucosa, fructosa, sucrosa, lactosa, rafinosa, y otros como las lipoproteínas de la yema de huevo. Su principal función es extraer el agua libre intracelular utilizando la diferencia de presión osmótica sin penetrar a la célula (Celestinos y Gatica 2002); además reducen las fuerzas iónicas fuera de la célula e influyen en la formación de cristales de hielo.

Hoy día se sabe que para que los crioprotectores no penetrantes expresen al máximo sus características deben ser mezclados con crioprotectores penetrantes.

Los crioprotectores más utilizados para la congelación de semen de carnero son el glicerol y la yema de huevo de gallina.

La yema de huevo contiene un componente activo lipoproteico de baja densidad que recubre la superficie del espermatozoide durante la congelación y la descongelación, bloqueando la entrada de los iones de calcio a la célula. Protege a los espermatozoides contra el shock frío (factor de resistencia), además confiere protección en la congelación y la descongelación manteniendo la viabilidad espermática (factor de almacenamiento). Sin embargo, Karabinus y col. en el año 1991, postularon que tanto la leche como la yema de huevo podría alterar la cromatina de los espermatozoides, lo que reduciría la calidad espermática post descongelación.

Evidencias de estudios criomicroscópicos sobre espermatozoides de carnero muestran que la yema de huevo protege contra el daño de membrana y la pérdida de motilidad, inducida por debajo del punto de congelación extracelular (-20° C) (Holt y col 1992).

Watson y Martin reportaron que si se incrementan los niveles de yema de huevo se podría reducir las altas concentraciones de glicerol (Abdelhakeam y col 1991; Salamon y Maxwell 2000).

En los intentos de Abdelhakeam y col en el año 1991 de congelar semen de carnero en ausencia de glicerol, se demostró que era necesario incrementar la cantidad de yema de huevo en el diluyente en un 25 – 30 % para que la congelación fuese satisfactoria.

Por otra parte, Polge en 1949 demostró la eficacia del glicerol, convirtiendo a éste en el agente crioprotector más utilizado. Para su uso en congelación de semen se emplean rangos de un 4 a 6 %. Niveles sobre un 6% de glicerol generalmente son perjudiciales para la supervivencia espermática post descongelación (Salamon y Maxwell 2000). El nivel de glicerol es limitado por su toxicidad; además, su adición depende de la tasa de enfriamiento y congelación, composición del diluyente, método de adición y en particular de la presión osmótica.

Si bien el glicerol ofrece crioprotección al espermatozoide, también puede causar daño estructural y de integridad bioquímica, además de acelerar la reacción acrosómica; todo esto sucede en la fase de equilibrio entre el diluyente y el semen. Consecuentemente, se sugiere que el glicerol debería ser añadido no más allá de 20 a 30 minutos antes de la congelación (Salamon y Maxwell 2000).

Inicialmente se añadía el glicerol en una fracción separada del diluyente (dilución de dos pasos), sin embargo estudios más recientes afirman que la dilución en un solo paso, o sea añadiendo el glicerol junto con el diluyente a una temperatura de 30° C, sería más simple y efectiva.

Varios reportes indican que incluyendo un antioxidante con efecto crioprotector se podría utilizar menores concentraciones de glicerol desde 3,5 a 2,0 % (Salamon y Maxwell 1995a).

3.3 TRATAMIENTO DEL SEMEN PARA SU CONGELACIÓN

La exitosa congelación de semen depende en gran medida de la tasa de dilución utilizada. Otras fases como la refrigeración, el envasado, las velocidades de congelación y descongelación también pueden afectar directamente a la recuperación de las células espermáticas criopreservadas.

3.3.1 Dilución espermática

La supervivencia de los espermatozoides en el propio plasma seminal está limitada a unas pocas horas, por lo tanto el semen debe diluirse para mantener la viabilidad espermática y evitar así la pérdida de viabilidad producida por el consumo de componentes energéticos del plasma seminal por los espermatozoides (Garde 1992).

El éxito de la congelación depende del grado de la tasa de dilución del semen. Originalmente, el semen era diluido para proteger al espermatozoide durante el enfriamiento, la congelación y la descongelación, pero la tasa de dilución era modificada a menudo por razones técnicas, como el incremento del número de hembras que se podía inseminar con ese eyaculado, o para estandarizar el número de espermatozoides en cada dosis de congelación y descongelación de semen (Salamon y Maxwell 2000).

Estudios realizados por D`Alessandro y col en el año 2001, demostraron que a una mayor tasa de dilución, mejores son los resultados obtenidos en relación a la supervivencia, motilidad espermática e integridad acrosómica post descongelación.

3.3.2 Refrigeración y equilibrio

El enfriamiento gradual es el período de adaptación donde el espermatozoide disminuye el nivel de metabolismo celular prolongando su vida útil. En esta fase el semen debe ser enfriado desde los 30° C hasta alcanzar la temperatura de 5° C.

La fase de equilibrio se ha estimado como el tiempo total en que los espermatozoides toman contacto con el glicerol antes de ser congelados, durante el cual éste penetra a la célula espermática para establecer un balance entre las concentraciones intra y extracelular (Salamon y Maxwell 2000). La fase de equilibrio no sólo incluye el balance de la concentración del glicerol, sino que también, de todos los componentes del diluyente que sean osmoticamente activos.

Muchos investigadores han tratado de determinar el tiempo óptimo de la fase de equilibrio; así se han realizado ensayos de congelación de semen para diversos tiempos de equilibrio, encontrándose recuperaciones post descongelación variables según los diversos autores; sin embargo han llegado a la conclusión que esta fase depende directamente de la tasa de dilución, de la concentración de glicerol, de la composición de azúcares y de la tasa de enfriamiento.

Se ha llegado al consenso de usar tiempos de equilibrio que vayan desde 1 a 3 horas, ya que utilizando tiempos mayores a 3 horas no se obtienen mejores resultados en cuanto a motilidad al momento de descongelar el semen. Salamon y Maxwell (2000) recomendaron congelar el semen después de que tuviera un tiempo de equilibrio entre 1,5 a 2 horas a 5° C.

3.3.3 Velocidades de congelación

Todas las células a congelar presentan una velocidad óptima de congelación, fuera de la cual los resultados de supervivencia se ven afectados.

La velocidad óptima de congelación del semen se ve afectada por una serie de factores, unos inherentes al propio espermatozoide como, la especie, las dimensiones de la célula y la permeabilidad de la membrana celular al agua y a los crioprotectores, y otros que dependen directamente del proceso de congelación como, la concentración y el tipo de crioprotector, el tipo de envase a utilizar para la congelación y la composición de los diluyentes.

En cuanto al crioprotector, se ha observado que a diferentes concentraciones de glicerol, los espermatozoides pueden tolerar diferentes velocidades de congelación. En 1984, Fiser y Fairfull encontraron los mejores resultados de supervivencia espermática en semen de

carnero en concentraciones de 4 a 6% de glicerol con velocidades de enfriamiento de -10 a -100° C/min. En general, al disminuir la concentración de glicerol las velocidades óptimas de congelación deben ser superiores (Garde 1992).

3.3.4 Envasado para la congelación

El semen ovino ha sido envasado para su congelación utilizando diversos métodos. Destacan las ampollas, pellets y pajuelas; las dos últimas introducidas en el año 1964, logrando un gran avance en la tecnología de la congelación espermática.

La congelación con el método de las pajuelas consiste en suspender las pajuelas previamente llenadas con el semen diluido, en vapor de nitrógeno líquido, regulando la velocidad de congelación según la distancia que existe entre ellas y el nivel del nitrógeno líquido. Colas (1975), determinó una reducción en la supervivencia espermática cuando suspendió las pajuelas en vapor de nitrógeno líquido a -55° C, sin embargo, a una temperatura de -75° y -125° C no se vieron efectos.

El volumen a congelar en las pajuelas es de 0,25 y 0.5 ml, y se recomienda una distancia de 4-6 cm sobre la superficie del nitrógeno líquido (Salamon y Maxwell 2000).

El método de congelación en pellets consiste en colocar gotas de semen dentro de depresiones sobre hielo seco (dióxido de carbono sólido, -79° C), sobre una plancha plástica, de acero inoxidable o sobre aluminio. En este caso la velocidad de enfriamiento puede ser regulada según el volumen de la gota de semen y de la temperatura del agente de congelación (Salamon y Maxwell 2000). A menor volumen del pellet, más rápida será su congelación.

Salamon, en un estudio realizado en 1970, determinó que incrementando la tasa de enfriamiento de los pellets, de -100° a -160° C, estos no presentaron efecto diferentes en la recuperación de la motilidad espermática; y en 1971, determinó que la tasa de parición no presentaba diferencias con pellets congelados a -79° y -140° C.

Se han realizado variados estudios comparativos entre el sistema de congelación de semen con pajuelas y pellets, evaluando en ambos métodos tanto la fertilidad como la motilidad post descongelación. En cuanto a la motilidad post descongelación los mejores resultados obtenidos fueron para los pellets (Maxwell y col 1995; Awad y Graham 2004), sin embargo en relación a la fertilidad no se encontraron diferencias entre los métodos (Maxwell y col 1995;)

3.4 CONSECUENCIAS DEL PROCESO DE CONGELACIÓN

En el semen, a pesar de que una gran proporción (40 – 60 %) de espermatozoides de carnero preservan su motilidad después de la congelación – descongelación, sólo un 20 – 30 % permanece fisiológicamente sin daño. Un espermatozoide puede presentar motilidad aunque este dañado, siendo improbable que penetre el gameto femenino y que además lo fecunde.

En los procesos de crioconservación de semen, específicamente en los procesos de refrigeración, congelación y descongelación, las células espermáticas presentan los principales efectos lesivos.

Cuando los espermatozoides son congelados y descongelados se ven sometidos a varios ciclos de deshidratación e hidratación lo que resulta en cambios significativos de volumen (Stornelli y col 2005). Los cambios de volumen son sólo uno de los tantos factores de stress espermático durante el proceso de criopreservación. Otros están representados por los cambios de temperatura, el estrés tóxico producido por la exposición a los crioprotectores, la formación y disolución de hielo así como los cambios de osmolalidad en el ambiente extracelular.

3.4.1 Shock de frío

El enfriamiento rápido del semen entre 30° y 0° C, induce a un cierto estrés celular, apareciendo un gran porcentaje de células espermáticas muertas, de formas anormales y con alteración en la membrana, específicamente en la distribución de sus lípidos además del aumento de calcio intracelular. Este estrés espermático letal es proporcional a la tasa de enfriamiento. Es así que el enfriamiento en este rango de temperaturas debe ser realizado cuidadosamente (Watson 1995).

Lo anterior es conocido como shock de frío y puede apreciarse durante el enfriamiento de espermatozoides de cualquier especie (Stornelli y col 2005), sin embargo la susceptibilidad de los espermatozoides al shock de frío varía según la especie animal, siendo los espermatozoides de carnero altamente sensibles a este fenómeno.

Las dos regiones del espermatozoide más afectadas en la congelación son las membranas celulares y la estructura acrosomal (Holt y col 1992), siendo más sensibles estas que el núcleo y que las partes centrales de la célula.

Por otra parte, la membrana externa del acrosoma es más vulnerable que la parte interna (acrosoma) y la membrana interna (Salamon y Maxwell 1995b).

La estructura celular de los espermatozoides también sufre alteraciones, es así que Quinn y col (1980) observaron pérdida de proteínas en la vaina mitocondrial de los gametos; Nath (1972) además de lo anterior, reportó deformaciones en la estructura normal del axonema.

De la misma forma que la estructura celular se ve afectada, la bioquímica espermática es sensible a las modificaciones por el shock de frío. Salomon y Maxwell (1995b) encontraron pérdida de lipoproteínas y aminoácidos después de la congelación y descongelación. También se han reportado otras alteraciones como cambios en el metabolismo espermático de los carbohidratos e inactivación de enzimas acrosómicas.

3.4.2 Efectos causados por la congelación

Cuando una solución es enfriada por debajo del punto de congelación, el metabolismo celular se detiene y el agua pura se cristaliza formando hielo. Las células al ser congeladas pasan por un estado de deshidratación debido a que el agua citoplasmática pasa al medio circundante y por consecuencia a uno de hidratación al descongelarse. La congelación de esta agua hace que haya formación de cristales de hielo los que provocan daño y ruptura celular (Mazur 1980).

En el enfriamiento lento, la congelación comienza en el espacio extracelular antes de que se comience a formar el hielo intracelular. Mientras que el hielo se forma, se produce un desequilibrio osmótico, ya que la concentración de solutos va aumentando en los espacios extracelulares, conduciendo a una migración de agua fuera de la célula, con el fin de equilibrar el medio. Esto es llamado efecto solución y es igualmente dañino que la formación de cristales (Schneider y Mazur 1984).

Por otra parte, el índice de enfriamiento tiene un efecto dramático en estos fenómenos. El enfriamiento rápido reduce al mínimo los efectos de la concentración de solutos ya que el hielo se forma uniformemente, pero conduce a una formación de hielo intracelular. El enfriamiento lento, por otra parte, da lugar a una mayor pérdida de agua por parte de la célula y menor formación de hielo interno, pero aumenta los efectos de solutos.

Watson y col (1991), afirmaron que la formación de hielo intracelular origina ruptura de ciertas estructuras celulares además de desorganización de la membrana plasmática y acrosomal, con alteración en la fase lipídica y desplazamiento de las proteínas intrínsecas.

La concentración de solutos produce la desnaturalización de los componentes de la membrana plasmática y deshidratación celular disminuyendo su volumen hasta un mínimo donde se compromete la integridad estructural de la célula (Watson y Duncan 1988)

Por lo tanto, podemos concluir que la formación de cristales de hielo y el efecto solución son los principales factores implicados en el daño celular por lo que el objetivo es tratar de reducirlos y contrarrestar sus efectos.

3.4.3 Consecuencias de los procesos de congelación

Luego de congelar y descongelar una muestra seminal, un gran número de espermatozoides aparecen fuertemente dañados y por lo tanto afuncionales. Por otra parte, los espermatozoides que resisten estos procesos también pueden sufrir cierto daño.

Se ha comprobado que la motilidad espermática disminuye luego de la criopreservación (Stornelli y col 2005); además los cambios de temperatura desencadenan en las células espermáticas un estado de capacitación prematuro que origina la reacción acrosómica de una forma acelerada. Lo anterior produce acortamiento de la viabilidad y poder fecundante del espermatozoide.

Otra alteración observada en los espermatozoides sobrevivientes a los procesos de criopreservación es el aumento del calcio libre intracelular. También se ha demostrado que estos procesos inducen a un cierto grado de estrés oxidativo por parte del espermatozoide, provocando efectos tóxicos sobre ellos que a la larga comprometen su funcionalidad.

3.5 DESCONGELACIÓN

Otro aspecto importante que incide sobre la viabilidad de las células espermáticas congeladas es la velocidad de descongelación. La velocidad descongelación óptima depende en gran forma de la técnica utilizada para la congelación. Cuando se utilizan velocidades de congelación altas los mejores resultados post descongelación han sido obtenidos con descongelaciones también rápidas (Fiser y col 1986).

Los espermatozoides que han sobrevivido al proceso de congelación a -196°C se enfrentan ahora a la fase de calentamiento y descongelación, teniendo que atravesar nuevamente las dos temperaturas críticas.

Los espermatozoides descongelados a tasas rápidas, se exponen en un tiempo más corto al soluto concentrado y al crioprotector (glicerol), lo que hace que la restauración del equilibrio extra e intracelular sea más rápido que en la descongelación lenta (Salamon y Maxwell 2000).

Para el semen de carnero congelado en pajuelas, la temperatura de descongelación utilizada por la gran mayoría de los investigadores se encuentra entre 38° - 42° C. Sin embargo, algunos trabajos han reportado que la descongelación a altas temperaturas (60° - 75° C) son comparables a las temperaturas menores (38° - 42° C) en términos de motilidad post descongelación, integridad de acrosoma y fertilidad espermática (Salamon y Maxwell 2000).

Para el semen de carnero congelado en pellets, dos son los métodos de descongelación; por una parte se encuentra el método de descongelación en seco, que consiste en la introducción del pellet dentro de un tubo o recipiente de descongelación sin la adición de ningún tipo de diluyente. El otro método consiste en descongelar el pellet introduciéndolo en un tubo que presente algún tipo de diluyente (método húmedo), de preferencia el mismo utilizado para la congelación, ya que podría presentar interacciones con otro nuevo diluyente y afectar la viabilidad espermática.

Se han examinado temperaturas de descongelación para ambos métodos entre 37° y 75° C, encontrándose en general mejores resultados en motilidad post descongelación con tasas de temperatura crecientes (Salamon y Maxwell 2000).

La velocidad de descongelación depende del volumen del pellet, sin embargo pellets de 0,03 a 0,86 ml no presentan diferencias en el porcentaje de motilidad espermática.

Para mantener el beneficio de la descongelación a altas temperaturas sin el riesgo de recalentar el semen, se recomienda en el caso de los pellets, cambiarlos a un baño maría con temperaturas menores (35° - 40° C) cuando los dos tercios del pellets se encuentren disueltos, o en el caso de las pajuelas utilizar artefactos especiales para la descongelación que mantienen la temperatura requerida en forma constante.

3.6 HIPÓTESIS

El nuevo sistema de pellet formado en nitrógeno líquido favorece la crioconservación de semen ovino en comparación al sistema tradicional de pajuelas.

3.7 OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar mediante movimiento progresivo dos métodos de congelación de semen.

Objetivo específico

- Congelar semen ovino en pajuelas y pellets.
- Comparar dos temperaturas de descongelación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REPRODUCTORES Y MANEJO

Para la elaboración de este ensayo se utilizaron 2 carneros, uno de raza Dorset y otro Texel, clínicamente sanos, pertenecientes al Proyecto FIA del Instituto de Reproducción Animal de la Universidad Austral de Chile. Durante el ensayo, estos animales permanecieron estabulados, alimentados principalmente con heno de pradera natural, alimento concentrado y agua *ad-libitum*.

4.2 RECOLECCIÓN DE SEMEN

Se recolectó semen mediante vagina artificial a 42° - 44° C aproximadamente. Las recolecciones se realizaron en los meses de noviembre y diciembre del año 2007. En cada sesión de recolección se obtuvo como máximo 2 eyaculados por carnero.

Las muestras obtenidas en cada recolección fueron transportadas en un tubo colector graduado, que se encontraba en contacto con la piel humana, con el fin de mantener su temperatura; luego fueron llevadas hasta el laboratorio de semen del Instituto de Reproducción Animal, trayecto que no demoraba más de 3 minutos, y mantenidas en un baño María a 37° C durante el tiempo que se llevó a cabo su procesamiento.

En la figura 1 se muestra el equipamiento básico empleado para la recolección de semen, el que consta de una vagina artificial, gomas de recambio para la vagina artificial, ya que cada carnero debe usar la suya, hervidor eléctrico, jeringa para introducir agua caliente, tubos de recolección y vainas de esponja aislante.



1. Equipamiento básico empleado para recolección de semen con vagina artificial.

4.3 EVALUACIÓN DEL SEMEN

Primero se determinó el volumen de cada eyaculado mediante un tubo colector graduado, al mismo tiempo se evaluaron las características macroscópicas del semen, como color, olor y viscosidad. Posteriormente, se procedió a realizar una dilución 1:1 con el diluyente TRIS – citrato – yema de huevo (**Anexo 1**). A continuación se evaluó el **movimiento de masa (MM)** (**Anexo 2**), colocando una pequeña gota de semen diluido sobre un portaobjetos previamente temperado, que fue observado con el menor aumento en un microscopio de contraste de fases con una platina temperada. Se le otorgó una puntuación en una escala de 1 a 5 según la densidad e intensidad de movimiento en forma de ondas que presentó cada muestra.

Posteriormente, se determinó el **movimiento progresivo (MP)** de cada eyaculado diluido, colocando una gota de semen sobre un portaobjetos previamente temperado tapado con un cubreobjetos. Para su observación se utilizó una platina temperada en un microscopio de contraste de fases con aumento 320x. Este parámetro de medición subjetiva, mide la

proporción de espermatozoides que presenta movimiento rectilíneo hacia delante. Con el fin de obtener un valor representativo, se observaron 4 a 5 campos de la muestra.

Para determinar la **concentración espermática**, se utilizó el método de la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución 1:400 (25 μ l de semen en 9,975 ml de H₂O).

Por último, se evaluó la proporción de espermatozoides vivos/muertos de cada eyaculado. Para esta prueba se utilizó la Tinción Supravital (eosina - nigrosina), que consiste en mezclar dos gotas de nigrosina y una de eosina con una gota de semen del mismo volumen sobre un portaobjeto en una platina temperada. Posterior a la mezcla se realizó un frotis delgado que fue secado al aire y observado al microscopio con aumento 320x. Los espermatozoides teñidos de color rojo se consideran muertos, ya que la eosina difunde en sus membranas acrosómicas, por el contrario las células vivas permanecen sin teñirse debido a la integridad de sus membranas.

Se debe mencionar, que todos los eyaculados que presentaron menos de 50% de movimiento progresivo o menos 50% de espermatozoides vivos (Tinción Supravital) fueron desechados.

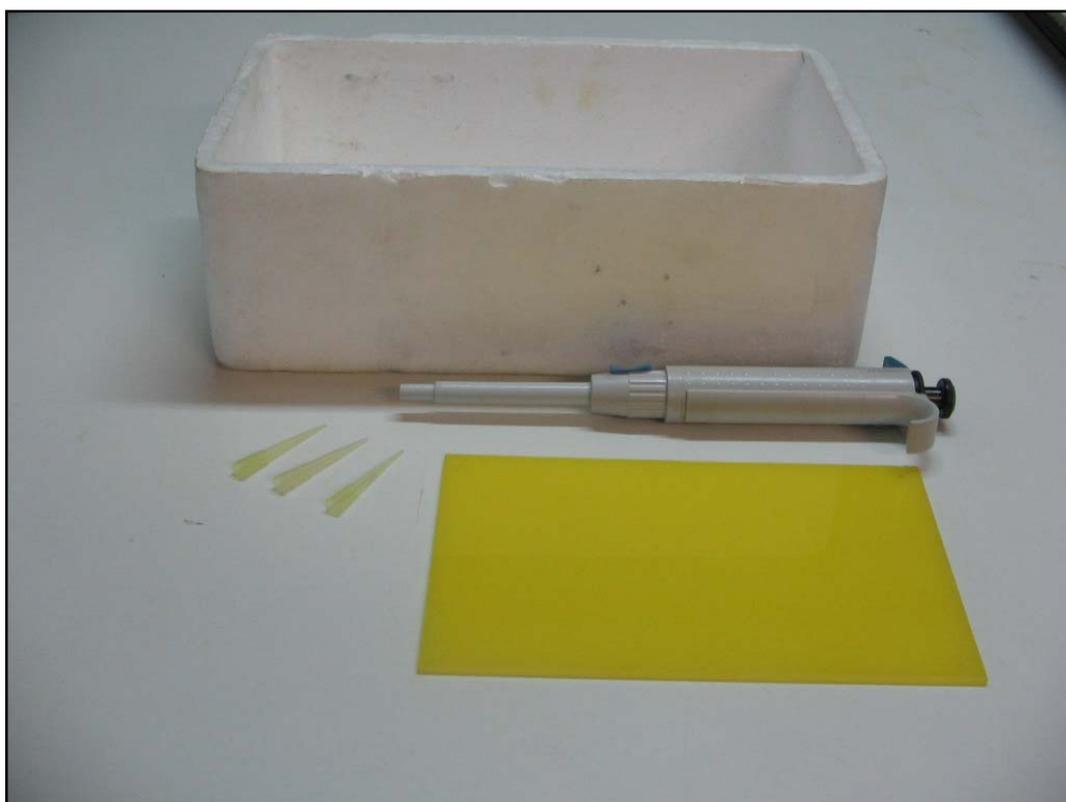
4.4 PROCESAMIENTO Y CONGELACIÓN DE SEMEN

Se procedió a calcular la cantidad de espermatozoides vivos que se encuentran en el eyaculado, multiplicando la concentración espermática por el porcentaje de espermatozoides vivos; luego fue calculado el volumen de diluyente TRIS – citrato – yema de huevo (**Anexo 1**) necesario para obtener una concentración final de 50 millones de espermatozoides vivos en cada dosis. La adición del diluyente fue lenta, siempre agregando el diluyente sobre el semen y dejando que este caiga por las paredes del tubo graduado. Una vez terminado este procedimiento se dejó el semen ya diluido a temperatura ambiente.

A continuación se procedió a dividir el eyaculado con su dilución final en dos partes iguales, una de ellas fue almacenada en un tubo que fue introducido sobre un vaso de agua fría y que permaneció en el refrigerador a 5° C por una hora como mínimo. Una vez transcurrido el tiempo, fue reevaluado el semen, donde se consideró el movimiento progresivo y actividad espermática frente al diluyente TRIS – citrato – yema de huevo; este último parámetro fue evaluado en una escala de 1 a 5, donde uno es muy malo, nula actividad y cinco es excelente, con un movimiento activo de las células espermáticas. Los requisitos mínimos para seguir el procedimiento de congelación, fue tener mayor al 50% en movimiento progresivo e igual o mayor a 4 en actividad espermática frente al diluyente TRIS – citrato – yema de huevo.

Enseguida se procedió a realizar gotas de 100 μ l sobre una plancha de acrílico que se encontraba a 3 cm del nitrógeno líquido dentro de una caja de poliestireno. Las gotas permanecieron sobre la plancha de acrílico por 3 a 4 minutos, luego la plancha fue sumergida en el nitrógeno líquido y los pellets o gotas obtenidas fueron guardadas en recipientes especiales identificadas con el número o nombre del reproductor y fecha de recolección e introducidas en el tambor de almacenamiento con nitrógeno líquido a -196° C.

Paralelamente, la otra fracción de semen fue diluida nuevamente 1:1. Se envasó manualmente en pajuelas de 0,25 ml identificadas con el número o nombre del reproductor y fecha de recolección. Luego fueron sometidas a un período de estabilización (equilibrio) por una hora como mínimo a una temperatura de 5° C para finalmente ser congeladas. Pasado ese tiempo las pajuelas fueron depositadas en el mismo sistema utilizado para la elaboración de los pellets. Tanto el tiempo de mantención de las pajuelas y la distancia de la plancha de acrílico al nitrógeno líquido también fue la misma. Una vez transcurrido ese tiempo, fueron sumergidas en el nitrógeno líquido y almacenadas en el estanque a -196° C.



2. Equipamiento básico empleado para congelación de semen con el método de pellets.

4.5 DESCONGELACIÓN DE SEMEN

Luego de mantener las pajuelas y los pellets almacenados en nitrógeno líquido al menos 24 hrs, se procedió a su descongelación. Para ambos casos las temperaturas de descongelación fueron 37° y 50° C.

En el caso de las pajuelas, estas fueron sacadas del nitrógeno líquido y dejadas a temperatura ambiente por 5 segundos, luego fueron sumergidas en el agua por 10 segundos y secadas para su posterior evaluación.

Por otra parte, los pellets fueron sacados del nitrógeno líquido y colocados en un tubo con 1 ml de diluyente TRIS – citrato – yema de huevo a las temperaturas anteriormente señaladas. Una vez introducida la dosis en el tubo, esta era agitada hasta que se disolviera totalmente el pellet. En el caso de la descongelación a 50° C, una vez depositada la dosis en el tubo con TRIS – citrato – yema de huevo, éste era trasladado inmediatamente al baño María a 37° C y mantenido ahí mientras durara su evaluación

Para su evaluación post descongelación, se colocó una gota de semen en un portaobjeto previamente temperado tapado con un cubreobjetos. Para su observación se utilizó una platina temperada sobre un microscopio de contraste de fases con aumento 320x. El movimiento progresivo fue el parámetro de evaluación.

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación del semen fresco se expresó en promedios y porcentajes.

Para comparar el movimiento progresivo de ambos carneros se realizó un ANOVA de una vía. Para evaluar el método de almacenaje de semen y la temperatura de descongelación se realizó un ANOVA de dos vías. Las dos pruebas antes mencionadas corresponden a pruebas de medidas paramétricas.

Para aplicar dichos análisis y determinar la significación estadística de las diferencias obtenidas, se utilizó el programa Statistica 6.0 (Statsoft, 2004).

5. RESULTADOS

5.1 EVALUACIÓN DE SEMEN FRESCO

En el **Cuadro 1** se describen las características del semen fresco de ambos carneros.

Cuadro 1. Características del semen fresco de dos carneros (n = 10 eyaculados por cada carnero). Se presentan los promedios con su respectiva desviación estándar y entre paréntesis el rango correspondiente.

VARIABLE	CARNERO		TOTAL
	TEXEL	DORSET	
Volumen (ml)	0,84 ± 0,4 (0,4 - 1,5)	0,61 ± 0,2 (0,5 - 1)	0,73 ± 0,3 (0,4 - 1,5)
Concentración (millones/ml)	1.099 ± 298 (690 - 1.630)	1.115 ± 447 (560 - 2.010)	1.107 ± 370 (560 - 2.010)
Movimiento de Masa (1 - 5)	3,5 ± 0,7 (3 - 5)	3,8 ± 0,8 (3 - 5)	3,7 ± 0,7 (3 - 5)
Movimiento Progresivo (%)	76,5 ± 9,1 (60 - 85)	78,5 ± 5,8 (70 - 85)	77,5 ± 7,5 (60 - 85)
Espermatozoides Vivos (%)	74,8 ± 7,4 (63 - 84)	76,3 ± 4,7 (68 - 83)	75,5 ± 6,1 (63 - 84)

La Prueba ANOVA de una vía determinó que no existen diferencias significativas ($p=0,93$) entre el semen de ambos carneros.

5.2 EVALUACIÓN DEL SEMEN REFRIGERADO

En el **Cuadro 2** se presentan los resultados de motilidad progresiva y actividad espermática frente al diluyente TRIS – citrato – yema de huevo (refrigerado mínimo una hora a 5° C).

Cuadro 2. Motilidad progresiva y actividad espermática frente al diluyente TRIS – citrato – yema de huevo en el semen refrigerado (n = 20 muestras por cada carnero). Se presentan los promedios con su respectiva desviación estándar y entre paréntesis el rango correspondiente.

VARIABLE	CARNERO		TOTAL
	TEXEL	DORSET	
Movimiento Progresivo (%)	72,5 ± 13,8 (50 - 90)	73,0 ± 10,6 (60 - 85)	72,75 ± 11,9 (50 - 90)
Actividad espermática frente al diluyente TRIS – citrato – yema de huevo (1 - 5)	4,4 ± 0,5 (4 - 5)	4,5 ± 0,7 (3 - 5)	4,45 ± 0,6 (3 - 5)

5.3 EVALUACIÓN DEL TIPO DE CONSERVACIÓN DE SEMEN CONGELADO Y TEMPERATURA DE DESCONGELACIÓN

En el **Cuadro 3** se presentan los valores correspondientes a motilidad progresiva post descongelación de dos métodos de conservación de semen, descongelados a 37° C y 50° C.

Cuadro 3. Los valores señalados corresponden al movimiento progresivo promedio evaluado post descongelación (n= 40 pellets, n= 40 pajuelas). Se presentan los promedios con su respectiva desviación estándar y entre paréntesis el rango correspondiente.

VARIABLE	PELLET		PAJUELA	
	37° C	50° C	37° C	50° C
Movimiento Progresivo (%)	51,0± 19,6 (20 – 85)	45,75 ± 12,1 (30 – 75)	27,0 ± 15,5 (0 – 50)	26,0 ± 16,4 (0 – 50)

La prueba paramétrica ANOVA de dos vías determinó que el método de pellet presenta una diferencia significativa ($p < 0,01$) en relación al método de la pajuela, obteniendo una diferencia de calidad espermática más alta expresada en movimiento progresivo; la temperatura de descongelación de 37° v/s 50° C no tuvo influencias sobre el movimiento progresivo ($p > 0,05$) sin embargo, la temperatura de 37°C fue ligeramente superior (Cuadro 3). Tampoco hubo interacción entre el método de conservación de semen y la temperatura de descongelación ($p > 0,05$).

6. DISCUSIÓN

6.1 EVALUACIÓN SEMINAL

Como se observa en el **Cuadro 1**, la calidad de los eyaculados puede considerarse buena aunque fueron recolectados fuera de la estación reproductiva. Esta calidad espermática probablemente se deba a que los eyaculados fueron obtenidos por medio de una vagina artificial, método que según Hafez (1996) es el de elección para la recolección de semen, ya que simula la cópula natural. Lo anterior también se vio favorecido por el hecho que ambos carneros se encontraban entrenados para la recolección del semen por este método porque pertenecían a un programa reproductivo dentro de un Proyecto FIA. Sin embargo, de igual manera fue necesario un período de acostumbamiento de los animales hacia la nueva persona que realizó la recolección; período que se extendió aproximadamente por tres meses.

Lo anterior, es importante si se considera que el semen de carnero es uno de los más sensibles para trabajar, ya que se debe mantener constantemente las medidas necesarias para que no sufra ningún tipo de alteración, que pueda perjudicar su evaluación y posterior congelación.

En el **Cuadro 1**, además se puede observar que los eyaculados recolectados de ambos carneros son bastantes similares presentando leves diferencias en relación a las características seminales evaluadas, pero siempre manteniéndose dentro de los rangos descritos como normales por Garner y Hafez (2000). Sin embargo, es necesario hacer notar que la concentración espermática de ambos carneros estuvo bajo el rango de referencia normal para la especie (Garner y Hafez 2000, Setchell 1977).

Además de la concentración espermática, el volumen del eyaculado, especialmente en el carnero Dorset, aunque normal puede considerarse bajo. Como explicación a esto, debería considerarse la época en que se realizó el estudio (noviembre – diciembre), época que no corresponde a la estación reproductiva para la especie ovina en esta zona.

Los reportes disponibles acerca de los efectos que produce la estación reproductiva sobre la congelabilidad de semen discrepan, y al parecer la raza de los carneros, la geografía y condiciones climáticas son importantes (Salamon y Maxwell 1995b). Es así, que Fiser y Fairfull (1983) señalaron que existe un efecto benéfico al congelar semen cuando éste es recolectado en un período de luminosidad disminuida.

Por otra parte, a pesar de que el movimiento progresivo se encuentra dentro de los rangos de referencia establecidos como normales (60-80% por Hafez (1996)), conviene destacar que hubo variaciones entre los eyaculados, posiblemente, debido a las malas condiciones climática, ya que en los días más fríos los valores de motilidad fueron más bajos. Además, es necesario considerar que el Laboratorio y el Pabellón de Reproducción Animal se encuentran separados, lo que implica un mayor tiempo transcurrido entre la extracción del semen y su posterior evaluación, produciendo menores valores de motilidad espermática, específicamente motilidad de masa; por lo que se hace imprescindible la implementación de un laboratorio para la evaluación del semen en el Pabellón de Reproducción Animal.

6.2 EVALUACIÓN DEL SEMEN REFRIGERADO

En el **Cuadro 2** puede observarse que la calidad espermática del semen refrigerado expresada en movimiento progresivo, se mantuvo casi igual, disminuyendo solamente un 4,7%. Cuando se utilizan temperaturas de almacenamiento de 5° C, los espermatozoides de carnero son capaces de preservar su motilidad y capacidad fecundante por largos periodos de tiempo (López-Sáez y col 2000), sin embargo, Simpson y White (1986) reportaron que la membrana plasmática de los espermatozoides de carnero pueden sufrir un sutil pero irreversible daño cuando se enfrían lentamente entre 10° y 0° C. Para evitar estos efectos adversos López-Sáez y col (2000), recomendaron una tasa de enfriamiento lento y homogéneo, no obstante, en sus trabajos la motilidad espermática se vio disminuida en un 11%.

El metabolismo celular no puede ser completamente eludido durante el almacenamiento del semen, pues existe una disminución gradual en la motilidad e integridad morfológica, además de una disminución rápida en la fertilidad (Jones y Martin 1973). Jones y Mann (1977), establecieron que peróxidos orgánicos producidos y acumulados en la refrigeración del semen de carnero (a 5° C) son responsables de la pérdida de motilidad.

En relación al parámetro evaluado como actividad espermática frente al diluyente TRIS – citrato – yema de huevo, hay que mencionar que no se encuentra literatura al respecto. Este parámetro fue establecido ya que al retirar el semen del refrigerador y evaluarlo al microscopio, se observó que no todos los espermatozoides de los diferentes eyaculados reaccionaban con la misma actividad ante la presencia del diluyente TRIS – citrato – yema de huevo. Si bien este parámetro no fue determinante para proseguir con el experimento hizo tomar en consideración lo anteriormente expresado.

6.3 EVALUACIÓN DEL TIPO DE CONSERVACIÓN DE SEMEN CONGELADO Y TEMPERATURA DE DESCONGELACIÓN.

Los datos presentados en el **Cuadro 3** muestran categóricamente que el método de congelación en pellet es superior al sistema de pajuelas. Esto se ve avalado por Schmehl y col (1986), Maxwell y col (1995) y Awad y Graham (2004), que determinaron que la congelación de semen de carnero por medio de los pellets produce los mejores resultados en cuanto a motilidad post descongelación. Sin embargo, Pontbriand y col (1989) determinaron que el mejor método de crioconservación de semen eran las pajuelas.

La congelación de espermatozoides por medio de las pajuelas provee una tasa de congelación más uniforme, si se considera que toda la pajuela queda en contacto con el vapor de nitrógeno líquido, en contraposición con la congelación por medio de pellets, donde sólo un lado del pellet está en contacto con la superficie más helada; a pesar de esto, se han logrado obtener mejores resultados en cuanto a motilidad por medio de este último método; sin embargo, la presión comercial que existe hoy en día obliga a la utilización de las pajuelas como método de conservación. Conviene hacer notar que la supervivencia espermática en pajuelas (Cuadro 3) fue marcadamente más baja en comparación a otros resultados de nuestro propio laboratorio; probablemente esta baja supervivencia espermática se deba a que la pajuela fue depositada para su congelación sobre una plancha de acrílico, lo que físicamente estaría influyendo en la temperatura de congelación. Quizás sería recomendable en futuros estudios similares incluir un grupo de congelación de pajuelas en rejillas con vapor de nitrógeno líquido.

Es importante evaluar otras variables de congelación; por una parte, en el caso de los pellets, el volumen es un factor a considerar, ya que gotas de un volumen mayor necesitarán mayor tiempo para su congelación; sin embargo, Lightfoot y Salamon (1969), trabajando con hielo seco, realizaron pellets de diferentes volúmenes (0,03 a 0,86 ml), concluyendo de que no existe reducción en la motilidad post descongelación en los diferentes tamaños. Por otra parte, en el caso de las pajuelas, es necesario considerar la distancia que existe entre ellas y la superficie del nitrógeno líquido. Según Salamon y Maxwell (2000), la distancia recomendada es entre 4 - 6 cm. Lo anterior podría explicar la baja motilidad progresiva obtenida en este ensayo con este tipo de almacenaje puesto que se utilizó una distancia de 3 cm.

Otro punto importante de analizar es la temperatura de descongelación a la que fueron sometidas las muestras. Si bien la gran mayoría de los autores describen que la temperatura óptima de descongelación en el caso de las pajuelas es entre 38° - 42° C; Pontbriand y col (1989) reportaron que la descongelación entre 36° - 40° C y entre 50° - 70° C, no afecta la motilidad post descongelación y la integridad del acrosoma espermático. En el caso de los pellets, Salamon y Maxwell (2000) demostraron que el semen puede ser exitosamente descongelado entre temperaturas que van de los 37° a 75° C. Lo anterior, concuerda con los

resultados obtenidos en nuestro experimento, ya que en ambos tipos de almacenaje no hubo diferencias significativas ($p>0,05$) intra método con las dos temperaturas de descongelación.

Además, no se encontró interacción entre el método de conservación y la temperatura de descongelación. Sin embargo, si se demostró una diferencia significativa en relación al envase ($p<0,01$), atribuyendo de esta forma los resultados obtenidos a la forma de almacenaje.

Es necesario realizar una comparación en relación a las ventajas y desventajas de la utilización de estos métodos de almacenaje. Por una parte, el pellet, si bien entrega los mejores resultados en cuando a motilidad progresiva, la identificación se hace más engorrosa, existe posibilidad de contaminación de los pellets y al momento de utilizar la dosis, es necesario llenar las pajuela; problemas que con el método de la pajuela se ven disminuidos o inexistentes.

De esta manera, puede resumirse que el método de congelación de semen de carnero en pellet en nitrógeno líquido, aunque sea un estudio inicial en esta Memoria de Título, ofrece una interesante herramienta para ser estudiada y aplicada en futuros estudios para mejorar su eficiencia y a la vez realizar inseminación artificial en ovejas con semen congelado. También sería interesante evaluar la utilización de otros diluyentes, con diferentes porcentajes de glicerol y yema de huevo, como otras distancias de congelación entre las muestras y la superficie del nitrógeno líquido.

CONCLUSIONES

De acuerdo a lo anteriormente expuesto y bajo las circunstancias de este estudio se concluye que:

- Tanto el método de conservación del semen refrigerado como el tiempo de equilibrio se consideran satisfactorio luego de analizar las muestras que permanecían refrigeradas.
- El método de almacenaje de semen congelado en forma de pellet es superior al sistema de pajueta.
- La temperatura de descongelación usada no influyó en la motilidad progresiva post descongelación tanto en el método de pellet como pajueta.
- Aunque no hubo efecto de la temperatura de descongelación, el método recomendado sería congelar en pellet y descongelar a 37° C.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelhakeam A, E Graham, A Vazquez, K Chaloner.** 1991. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen: Development of an extender for freezing: Effects of osmotic pressure, egg yolk levels, type of sugars, and the method of dilution. *Cryobiology* 28, 43 - 49.
- Awad M, J Graham.** 2004. A new pellet technique for cryopreserving ram and bull spermatozoa using the cold surface of cattle fat. *Anim Reprod Sci* 84, 83 - 92.
- Colas G.** 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J Reprod Fertil* 42, 277 - 285.
- D' Alessandro A, 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.
- De Leeuw F, A De Leeuw, J Den Daas, B Colenbrander, J Verkleij.** 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology* 30, 32 - 44.
- Celestinos M, R Gatica.** 2002. Vitrification as a technique of bovine embryo cryopreservation. *Arch Med Vet* 34, 157 - 165.
- Concha C, H Díaz.** 1971. Valoración del semen ovino. En: *Calificación de la fertilidad potencial de los animales domésticos (carnero, potro, toro y verraco)*. Díaz H, C Arancibia Imprenta Vera y Giannini 6. Chile, Pp: 56 - 66.
- Evans G, W Maxwell.** 1987. Handling and examination of semen. In: Evans G, W Maxwell (ed). *Salamon's artificial inseminations of sheep and goats*. Butterworths. Sydney. Australia. Pp 93 - 97.

- Fiser P, R Fairfull.** 1983. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Cryobiology* 20, 684 - 689.
- Fiser P, R Fairfull.**1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* 21, 542 - 551.
- Fiser P, R Fairfull.** 1986. The effects of rapid cooling (cold shock) of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* 23, 518 - 524.
- Fiser P, R Fairfull, G Marcus.** 1986. The effect of thawing velocity on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa frozen at optimal and suboptimal rates in straws. *Cryobiology* 23, 141 - 149.
- Garde J.** 1992. Congelación de semen en la especie ovina: Características biológicas de las dosis descongeladas, *Tesis doctoral*. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. España.
- Garner D, E Hafez.** 2000. Espermatozoides y plasma seminal. In: Hafez E, B Hafez.(ed) *Reproducción e Inseminación Artificial en animales*. 7th ed. Mc Graw Hill Interamericana, México, Pp 98 - 99.
- Gil J, N Lundeheim, L Söderquist, H Rodríguez-Martínez.** 2003. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* 59, 1241 - 1255.
- Hafez E.** 1996. Inseminación Artificial. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 6^a ed. Hafez E (ed). Mc Graw Hill Interamericana, México, Pp 401 – 402.
- Hermosilla J.** 2006. Estudio de preservación de semen fresco ovino. *Memoria de Titulación*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Holt W, M Head, R North.** 1992. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol Reprod* 46, 1086 - 1094.

- Holt W.** 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci* 62, 3 – 22.
- Jabbour H, G Evans.**1991. Fertility of superovulated ewes following intrauterine or oviductal insemination with fresh or frozen-thawed semen. *Reprod Fertil Dev* 3, 1 - 7.
- Jones R, I Martin.** 1973. The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5 degrees C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J Reprod Fertil* 35, 311 - 320.
- Jones R, T Mann.** 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J Reprod Fertil* 50, 261 - 268.
- Karabinus D, D Evenson, M Kaproth.** 1991. Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J Dairy Sci* 74, 3836 - 3848.
- Lightfoot R, S Salamon.** 1969. Freezing of ram semen by pellet method III. The effect of pellet volume, composition of the thawing solution, and reconcentration of the thawed semen on survival of spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 22, 1561 – 1572.
- López-Sáez A, N Ortiz, L Gallego, J Garde.** 2000. Liquid storage (5°C) of ram semen in different diluents. *Arch Androl* 44, 155 - 164.
- Maxwell W, L Hewitt.** 1986. A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *J Agric Sci* 106, 191 - 193.
- Maxwell W, P Watson.** 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci* 42, 55 - 65.
- Maxwell W, A Landers, G Evans.** 1995. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* 43, 1201 - 1210.
- Mazur P.** 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Madrid, España, Pp. 99 - 114.

- Merino R.** 2003. Estudios preliminares en capacitación in – vitro de espermatozoides ovinos frescos y congelados. *Memoria de Titulación*. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Chile.
- Nath J.** 1972. Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. *Cryobiology* 9, 240 - 246.
- Pérez-Pé R, J Cebrián- Pérez, T Muiño-Blanco.** 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56, 425 - 434.
- Pontbriand D, J Howard, M Schiewe, L Stuart, D Wildt.** 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze – thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26, 341 – 354.
- Quinn P, P Chow, I White.** 1980. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil* 60, 403 - 407.
- Salamon S, W Maxwell,** 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci* 37, 185 - 249.
- Salamon S, W Maxwell.** 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci* 38, 1 - 36.
- Salamon S, W Maxwell.** 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci* 62, 77 - 111.
- Salamon S, D Visser.** 1972. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust J Biol Sci* 25, 605 - 618.
- Schneider U, P Mazur.** 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen – thawed embryos. *Theriogenology* 21, 68 - 79.
- Schmehl M, S Anderson, I Vazquez, E Graham.** 1986. The effect of dialysis of extended ram semen prior to freezing on post – thaw survival and fertility. *Cryobiology* 23, 406 – 414.

- Setchell B.** 1977. Male reproductive organs and semen. In: Cole H, P Cupps (ed). *Reproduction in Domestic Animals*. 3rd ed. Academic Press, Philadelphia, USA. Pp 249 - 254.
- Simpson A, J White.** 1986. Effect of cold shock and cooling rate on calcium uptake of ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 12, 131 - 143.
- Stornelli MC, C Tittarelli, C Savignone, MA Storelli.** 2005. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria* 25, 28 - 35.
- Watson P, A Duncan.**1988. Effect of salt concentration and unfrozen water fraction on the viability of slowly frozen ram spermatozoa. *Cryobiology* 25, 131 - 142.
- Watson P, I Martin.**1972. A comparison of changes in acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J Reprod Fert* 28, 99 - 101.
- Watson P, I Martin.** 1975. Effect of egg yolk, glycerol, and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust J Biol Sci* 28, 153 - 159.
- Watson P, P Jones, J Plummer.** 1991. A quantitative comparison of the spontaneous and ionophore-induced acrosome reaction in ejaculated ram spermatozoa: the effects of temperature, time and individual. *Anim Reprod Sci* 24, 93 - 108.
- Watson P.** 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post – thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7, 871 - 891.

ANEXO 1**Preparación del diluyente utilizado en el Instituto de Reproducción Animal.****Solución madre (TRIS)**

Tris (tris(hidroximetil)aminometano).....	3,2 gr.
Ácido cítrico.....	1,8 gr.
Fructuosa.....	1,3 gr.
Penicilina.....	1000 UI / ml.
Estreptomicina.....	1 mg / ml.
H ₂ O bi-distilada y desionizada	100 ml.

Diluyente TRIS – citrato – yema de huevo para 100 ml.

TRIS (Solución madre).....	80 ml.
Yema de huevo (15%).....	15 ml.
Glicerol (5%).....	5 ml.

ANEXO 2

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	Pequeñas olas con movimiento lento. Es posible ver espermatozoides con movimiento individual. 45 - 65% células espermáticas activas.
2	Malo	Sin formación de olas, pero es visible algún movimiento espermático. 20 - 40% de células vivas con movimiento pobre.
1	Muy Malo	Sólo pocos espermatozoides (10%) muestran signos de vida, movimiento débil.
0	Muerto	Todos los espermatozoides carecen de movimiento.

ANEXO 3

Evaluación seminal por carnero

Dorset

	Volumen (ml)	Movimiento Progresivo (%)	Movimiento Masa (1 - 5)	Espermatozoides Vivos (%)	Concentración (millones/ml)
1	0,5	85	3	76	960
2	0,5	80	4	77	980
3	0,5	70	5	68	1.330
4	0,5	70	3	75	560
5	0,7	75	3	80	1.410
6	1	85	4	80	2.010
7	0,5	85	5	74	990
8	0,5	80	3	70	690
9	0,7	75	4	83	1.510
10	0,7	80	4	80	710

Texel

	Volumen (ml)	Movimiento Progresivo (%)	Movimiento Masa (1 - 5)	Espermatozoides Vivos (%)	Concentración (millones/ml)
1	1,5	65	3	64	1.630
2	1	75	4	83	1.420
3	1	85	3	74	690
4	1	80	3	74	740
5	0,5	60	3	63	800
6	1	85	4	80	1.210
7	0,5	75	3	81	1.070
8	0,4	70	3	70	1.220
9	1	85	5	84	1.090
10	0,5	85	4	75	1.120

ANEXO 4

Evaluación del semen post refrigeración

Dorset

Actividad espermática frente al TRIS – citrato – yema de huevo (1 – 5)	Movimiento Progresivo (%) semen Refrigerado
3	60
4	60
5	60
4	70
5	80
5	85
5	85
4	70
5	85
5	75

Texel

Actividad espermática frente al TRIS – citrato – yema de huevo (1 – 5)	Movimiento Progresivo (%) semen Refrigerado
5	65
4	85
4	50
5	75
4	50
4	75
4	75
5	75
5	90
4	85

ANEXO 5

Movimiento Progresivo (%) a la descongelación de pajuelas y pellets a 37° y 50° C

Dorset

Pellet 37° C	Pellet 50° C	Pajuela 37° C	Pajuela 50° C
60	50	40	40
50	60	10	10
40	50	20	10
30	35	35	40
40	30	10	0
65	75	50	50
40	40	30	50
40	40	40	20
40	40	10	45
50	50	35	35

Texel

Pellet 37° C	Pellet 50° C	Pajuela 37° C	Pajuela 50° C
75	50	40	40
75	45	40	30
50	30	30	20
85	70	50	30
50	40	10	10
35	45	0	0
70	50	30	40
20	40	40	30
85	45	10	10
20	30	10	10

9. AGRADECIMIENTOS

Es difícil agradecer a tantas personas que de una u otra forma han estado presentes en este proceso de aprendizaje...muchas gracias a todos...

A Ti Dios...de la forma que te llames, de la forma que seas...o donde estés...sabes que te adoro, que estas presente todos los momentos de mi vida, gracias por tu amor y por no dejarme sola.

A ustedes que no se ven...Olguita, gracias por acompañarme todos los días de mi vida, por ser mi luz y mi ángel, yo también siempre estaré a tu lado. Tía Fabiola, gracias por su infinita comprensión...que la transformó en un ángel y a ti Dándaro...mi tío lindo...mil gracias, te quiero hasta el sol.

A los mejores Papas “del infinito”y a la más linda Familia (Yanina, Enzo, Mauricio, Sandra, Claudia, Lalo, etc)...infinitas gracias...sin ustedes nada de esto hubiese existido...los quiero.

A Joshua, no existen palabras para agradecer todo tu amor, comprensión y apoyo, eres parte de este resultado...Te Amo.

A mis amigos, Fresia, Gigi, Nadia, Angélica, Alejandro, Ángelo, Óscar, Andrea Rojas, Juan, Pato, Rudito, Negrita, Alexis, Carlos, Natalia, Richi, Pauli, Karen, Susan, Andrea Ponce, Chomy, Manon, Veksa, Adarsh Singh, Ajeet Kaur. gracias por los bellos momentos compartidos...por las infinitas conversaciones, por la ayuda y el apoyo...los quiero.

A ustedes que me han acompañado en mi estadía en Valdivia...Tía Lili, Tío Alejandro, Tío Orlando, Tía Xime, Verónica... muchas gracias por todo.

A la Escuela Ecos Andaluces y al grupo avanzado 2007, gracias por su apoyo y por compartir tantos momentos especiales en mi vida.

Al Dr. Jorge Correa, Sra. Carmen Schüller, Dr. Marcelo Ratto, Dr. Renato Gatica, Dr. Juan Carlos Boggio, Dr. Rubén Uribe, Don Rubén y Don Sergio,...gracias por la gigantesca ayuda, por entregarme su precioso tiempo... sin ustedes esta tesis no hubiese existido.

Al proyecto FIA PI – C – 2004 -1- P - 047, al Instituto de Reproducción Animal y a todas las personas que hacen que este lugar sea hermoso para trabajar, Gracias.

A todos ustedes que no menciono... Gracias...y mil Bendiciones.

Paola.