

Influencia del dilutor tris y ovine freezing sobre la integridad de membrana citoplasmática, durante la congelación de semen de ovinos en pajillas de 0.5 ML

César Pantoja A.¹, Prospero Cabrera V.²

Resumen

Con la finalidad de analizar el efecto de dos dilutores (Tris-glucosa y Ovine Freezing Buffer UA 466/005238) en la motilidad e integridad de membrana citoplasmática de los espermatozoides, durante el proceso de congelación, se condujo una investigación en el Banco Nacional de Semen - Universidad Nacional Agraria la Molina. Se usaron 02 carneros Assaf, 02 Canelas (0.75 Black belly + 0.25 Criollo) y 01 Black Belly, los mismos que fueron alimentados con maíz chala más una ración de concentrado. El semen puro utilizado fue de buena calidad y los valores de las características seminales estuvieron dentro de los parámetros para esta especie. La motilidad individual progresiva (MIP) del semen refrigerado, fue 81 % \pm 2.75, 83 % \pm 2.74 en Tris (T1) y Ovine Freezing (T2), respectivamente; mientras que la proporción de espermatozoides con membrana intacta, evaluada por la prueba de HOST* fue 78 % \pm 4.76, 79 % \pm 3.96 para los dilutores Tris y Ovine Freezing, respectivamente. En el semen congelado - descongelado, la MIP fue 61 % \pm 3.57 y 63 % \pm 2.41; los valores HOST fueron 40 % \pm 3.57 y 43 % \pm 2.85 para los dilutores Tris y Ovine, respectivamente, existiendo diferencias altamente significativas entre dilutores, entre carneros y momentos de procesamiento ($P < 0.01$). Se registraron regresiones lineales significativas ($P < 0.05$) entre HOST de semen fresco y HOST post descongelado de semen diluido ya sea con Tris o con Ovine Freezing. Se concluye que: El dilutor Ovine freezing, conservó mejor el semen durante el proceso de congelación; la prueba hipoosmótica, es un buen indicador de la calidad de semen, su aplicación es muy práctica, precisa y sobre todo permite elegir el reproductor mas adecuado.

Palabras clave: Dilutores, semen congelado, ovinos.

Abstract

To analyze the effect of two dilutors (Glucose Tris and Ovine Freezing Buffer UA 466/005238) on the motility and cytoplasmic membrane integrity of spermatozoids during the process of freezing, a study was conducted in the National Semen Bank – Agrarian University of La Molina. Two Assaf rams, 02 Cinnamon rams and 01 Black Belly ram were used and were fed with chala corn and a ration of concentrate. The pure semen used was of good quality and the value of seminal characteristics was within the parameters for this species. The Progressive Individual Motility (PIM) of the refrigerated semen was 81 % \pm 2.75 and 83 % \pm 2.74 for Tris (T1) and Ovine Freezing (T2), respectively; while the proportion of spermatozoids with intact membranes, evaluated by the HOST* test, was 78 % \pm 4.76 and 79 % \pm 3.96 for the Tris and Ovine Freezing dilutors, respectively. In the frozen-thawed semen, the PIM was 61 % \pm 3.57 and 63 % \pm 2.41; and the HOST values were 40% \pm 3.57 and 43% \pm 2.85, for the Tris and Ovine dilutors, respectively, with highly significant differences between dilutors, among rams and between times of processing ($P < 0.01$). Significant lineal regressions, ($P < 0.05$) were registered between the HOST of fresh sperm and the HOST of diluted sperm after thawing whether from Tris or Ovine Freezing. It can be concluded that the Ovine Freezing dilutor better preserved the semen during the freezing process; and that the hypoosmotic test is a good indicator of the quality of semen, its use is very practical, precise and above all it permits the choosing of the best male parent.

Key words: Dilutors, frozen semen, ovine.

1. Introducción

La producción de carne ovina en el Perú, en la última década ha experimentado fuertes fluctuaciones, debido a que el consumo interno percapita no ha tenido un comportamiento homogéneo en su demanda. Sin embargo, hoy en día existe conciencia del potencial que representan los tratados de libre comercio (TLC) con los Estados Unidos, ratificada recientemente y la Comunidad Económica Europea sobre la demanda de carne de cordero, la cual en el caso del TLC con EE.UU., gozará de la liberación económica que tiene esta especie para el desarrollo inmediata de aranceles sin pago extraordinario de cuotas. Este hecho, resalta el alto interés científico y

del país. Por estas razones, el avance en genética ganadera ovina deberá tener un gran desarrollo en los próximos años, para así mejorar los caracteres hereditarios de interés productivo, como mayor calidad y producción de carne, leche y lana, entre otros. En este ámbito, la inseminación artificial es una herramienta que permite realizar un manejo reproductivo eficiente y que juega un rol importante en los programas de mejoramiento genético. Con la técnica de congelamiento del semen se incrementan las posibilidades de utilizar la Inseminación Artificial y se facilita el desarrollo de programas de mejoramiento; asimismo, el costo de la adquisición de sementales sería inferior al necesario. El objetivo de la presente investigación fue: Analizar el efecto de dos dilutores (Tris-glucosa y Ovine Freezing Buffer UA 466/005238) en la motilidad e integridad de

¹ Universidad Nacional Agraria La Molina.

² Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina.
E-mail: procecavi@lamolina.edu.pe.

* HOST = Hipo Osmotic Swelling Test.

membrana citoplasmática de los espermatozoides, durante el proceso de congelación.

1.1 Integridad de Membrana Espermática

La prueba de permeabilidad de membrana vía endosmosis o Hipo-Osmotic-Swelling-Test (HOST), está basada en las propiedades físicas y bioquímicas de la membrana plasmática. La endosmosis positiva es cuando por microscopía de contraste de fases (40X) se aprecia como el flagelo del espermatozoide en un medio hipoosmótico (100 mOsm/ml) se torciona helicoidalmente y asciende dentro de la misma membrana celular (Vázquez et al. 1997), debido a un desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de vencer difundiendo agua al compartimiento intracelular y, como consecuencia, la célula aumenta su volumen. Los espermatozoides con membrana funcional muestran un flagelo en curva, mientras que los espermatozoides no viables, mantienen sus colas rectas (Ducci, 2002). En condiciones fisiológicas normales la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide esta bioquímicamente inactiva, aún cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto la prueba hipoosmótica es un buen indicador, que permite distinguir el adecuado funcionamiento de la membrana espermática (Tamuli et al. 1992). A diferencia de las tinciones vitales, que solo nos ayuda a ver la integridad morfológica de la membrana (Brito et al. 2003). Santiani et al. (2004) evaluó un total de 16 muestras de semen puro de carneros en un medio hipoosmótico (0.735 g de citrato de sodio dihidratado y 1.351 g de fructosa en 100 ml de agua destilada) habiendo obtenido respuestas de 61.2 ± 6.9 %, 97.7 ± 1.0 % y 100 ± 0 % de espermatozoides con membrana intacta que reaccionaron positivo al HOST, para 30 min., 60 min. y 120 minutos de tiempo de incubación respectivamente. Sin embargo la correlación con la motilidad espermática es muy baja (0.18).

Tabla 1. Evaluación de la calidad seminal post descongelamiento.

Cro	Motilidad Masal	Motilidad individual	%vivos	Test hipo-Osmotico %
1	2.0 ± 0.9 (9)	3.6 ± 0.5 (9)	4.2 ± 7.1 (9)	35.0 ± 7.6 (13)
2	1.7 ± 1.0 (7)	3.3 ± 0.7 (7)	32.9 ± 7.0 (7)	31.9 ± 4.4 (15)
3	1.6 ± 0.7 (9)	3.6 ± 0.5 (9)	40.6 ± 4.6 (9)	26.7 ± 6.2 (12)
4	2.5 ± 0.5 (8)	4.2 ± 0.5 (8)	51.3 ± 6.4 (8)	40.7 ± 9.4 (13)
5	2.6 ± 0.6 (9)	4.3 ± 0.5 (9)	43.9 ± 7.0 (9)	30.9 ± 8.7 (17)
6	2.4 ± 0.7 (9)	3.6 ± 0.8 (9)	39.4 ± 3.0 (9)	31.6 ± 7.0 (14)
7	2.4 ± 0.5 (8)	3.9 ± 0.6 (8)	38.1 ± 8.4 (8)	27.6 ± 8.0 (13)
8	2.6 ± 0.5 (8)	4.5 ± 0.5 (8)	56.9 ± 4.6 (8)	32.3 ± 11.4 (11)
9	2.9 ± 0.2 (9)	4.9 ± 0.3 (9)	60.6 ± 5.8 (9)	48.6 ± 12.6 (13)
10	2.1 ± 0.6 (8)	4.8 ± 0.4 (8)	60.6 ± 5.6 (8)	50.5 ± 6.2 (16)

Fuente: Boretto et al. (2002)

1.3 Los Diluyentes de Semen en la Conservación de los Espermatozoides

Contienen Tris (Hidroximetil Aminometano) o citrato como buffers, glucosa o fructosa como fuente de energía y Penicilina o Estreptomocina como agentes anti microbianos (Gibbons et al. 2004). Además, deben contener agentes protectores para las membranas celulares durante el enfriamiento a 5 °C

1.2 Capacidad fecundante y la actividad funcional de la membrana plasmática durante la congelación

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

Son varios los factores que producen lesión celular; fundamentalmente mecánicos o físicos y químicos o bioquímicos. La hipertonicidad causa desnaturalización proteica, disociación de lipoproteínas e influye en la activación, estabilización o inhibición de enzimas (Meryman, 1966). Los cristales de hielo intracelular causan ruptura y vacuolización del citoplasma y membranas (Mazur, 1966 y 1977). La ruptura de membranas y en especial la de liposomas está asociada a la liberación de enzimas hidrofílicas liposomales con la consiguiente destrucción química de la célula (Meryman, 1966). Los cristales de hielo intracelular causan tanto alteraciones como ruptura mecánica de las membranas y deformaciones irreversibles con pérdida de función de las grandes moléculas orgánicas de la célula. La capacidad fecundante y la actividad funcional de la membrana plasmática es uno de los aspectos mas importantes en la biología del espermatozoide, que esta afectada por los cambios metabólicos que ocurren a su alrededor, así como también juegan un rol importante los eventos que ocurren durante la capacitación en el tracto de la hembra (Ducci, 2002). Boretto et al. (2002) analizó la integridad de membrana en semen congelado provenientes de 10 Carneros Merino, habiendo obtenido los siguientes resultados:

(generalmente yema de huevo), y el congelamiento (generalmente glicerol) para evitar lesiones de la membrana durante la congelación. (Hafez, 1996).

Existen otros dilutores comerciales como el Laiciphos IMV Francia para diluir semen fresco, Ovine Fresh para semen refrigerado y Ovine Freezing para congelación de semen.

2. Materiales y métodos

2.1 Lugar de Ejecución y Duración

El presente trabajo se realizó en los ambientes del Banco Nacional de Semen de la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el Distrito de la Molina, Provincia y Departamento de Lima entre las coordenadas 12° 05' Latitud sur y 76° 57' Longitud Oeste, a una altitud de 243.7 m.s.n.m. El estudio, se inició en Octubre del 2005 con la fase pre experimental; el desarrollo de la fase experimental tuvo inicio el 3 de Enero 2006 y finalizó en 30 de Junio del mismo año.

2.2 Animales del Experimento

Para el experimento, se utilizaron cinco Carneros: 01 black belly, 02 canelas (black belly 0.75 + 0.25 criollo) y 02 assaf, de 3.5 a 4 años de edad, los mismos que pertenecen a la Universidad Nacional Agraria La Molina, y el Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA), respectivamente.

2.3 Instalaciones

Los corrales en donde se ubicaron los reproductores donantes de semen, fueron construidos de madera y malla de alambre, tenían una dimensión de 2.80 m de ancho x 3.00 m. de largo y una altura de 1.20 m, provisto de sombras, comedero y bebedero así como

una adecuada iluminación y ventilación. En cada corral se colocaron 2 animales.

Para la colección de semen, se utilizó una borrega. Se contó con un brete de monta cuyas dimensiones son: Largo de 1.0 m, Ancho 0.80 m y alto 1.20 m, el mismo que cuenta con una fosa por debajo de la superficie de 1.75 m de largo, 0.74 m de ancho y 1.02 m de profundidad.

2.4 Alimentación de los Animales

La alimentación de los reproductores estuvo basada en forraje verde picado de King grass (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*), maíz chala (*Zea mays*) picado y suplementado con concentrado, cuyo aporte nutricional aproximado es:

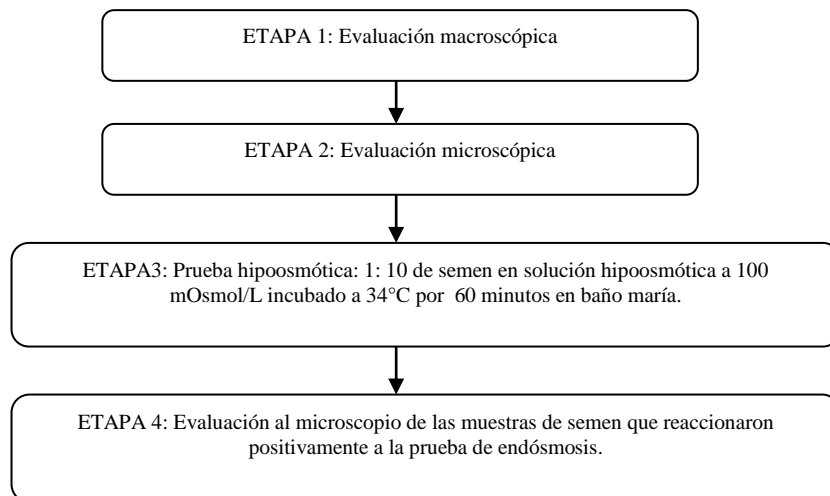
- Proteínas	14 %
- Fibra	17.5%
- NDT	68.5%

Estos niveles corresponden a ovinos en actividad reproductiva. La disponibilidad de agua fue ad libitum.

2.5 Metodología de la Evaluación Seminal

Todas las muestras de semen obtenidas, fueron evaluadas macro y microscópicamente. La evaluación de la integridad de membrana fue realizado en semen puro (figura 1), diluido y congelado (figura 2), mediante el test de endósmosis. Correa, (1994).

Figura 1. Técnica de la prueba hipoosmótica en semen fresco.



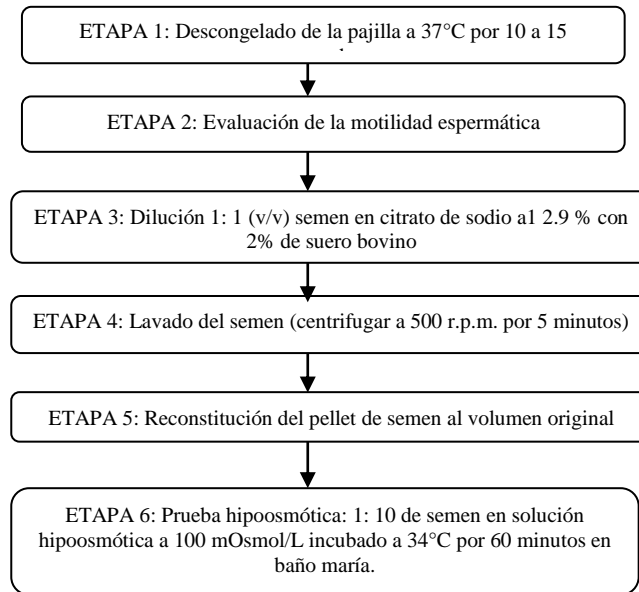
2.6 De la dilución del semen

En el Tratamiento 1, se utilizó el diluyente Tris – glucosa – yema de huevo, propuesto por Evans et al. (1990). En el Tratamiento 2, se usó el diluyente comercial Ovine Freezing Buffer UA 466/005238. Lote N° S 98, de laboratorios IMV Technologies de Francia.

2.7 Congelación del material seminal en pajillas

Siguiendo el protocolo descrito por Evans et al. (1990) con algunas variantes basado en los principios e congelación de células referido por Mazur et al. (1972) se procedió a la congelación de semen.

Figura 2. Técnica de la prueba hipoosmótica en semen refrigerado y congelado.



2.8 Descongelación y evaluación.

El descongelamiento del semen se realizó a una temperatura de 38° C en termo descongelador, por espacio de 15 segundos, teniendo especial cuidado en mover la burbuja de aire, secar y evaluar sobre platina temperada.

2.9 Análisis Estadístico

Los valores porcentuales fueron transformados angularmente mediante arco seno y para el análisis de varianza de las respuestas motilidad e integridad de membrana, se empleó un diseño de bloques completamente al azar, con arreglo factorial 2x2x5, con error de muestreo, siendo los factores a evaluar dos diluyentes de semen (Tris y Ovine Freezing), en dos momentos del procesamiento (Refrigerado - Congelado), considerando para ello como bloques cada uno de los Carneros (5). El modelo aditivo lineal usado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = u + B_k + D_i + M_j + (D*M)_{ij} + e_{ijk} + \bar{\sigma}_{ijkl}$$

Se realizó un análisis de Correlación entre las pruebas (motilidad - host refrigerado y descongelado en los que interviene los dilutores). Por el análisis de regresión lineal se determinó las pruebas que contribuyeron significativamente a explicar la variabilidad observada. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el programa SAS (Statistical Analysis System) para un error de 0.05, descrito por Pérez, (2001).

3. Resultados y discusión

3.1 Características del Semen Puro

Las muestras de semen utilizado fueron homogéneas y de buena calidad. En el cuadro 2 se resumen las principales características evaluadas.

Tabla 2. Características evaluadas en semen puro.

Característica	N	Prom. ± Desv. Est.	C. V.
Volumen	40	1.65 ± 0.55	0.33
Motilidad masal	40	4.25 ± 0.43	0.10
% vivos	40	82.51 ± 3.69	0.04
% anormales	40	6.39 ± 1.40	0.22
% endosmosis positiva	40	81.15 ± 3.66	0.05
Concentración espermática	40	2735.50	0.24
Ph	40	7.0	0

Los mismos que, se encuentran dentro del rango normal establecido para la especie ovina y los obtenidos por Boretto et al. (2002); Santiani, (2004).

3.2 Características del semen congelado

3.2.1 Motilidad individual progresiva entre carneros

En la Tabla 3, se muestran los resultados de motilidad individual progresiva del semen descongelado por tipo de diluyente. Se incluyen los valores de comparación de medias Duncan.

Tabla 3. Motilidad individual progresiva del semen descongelado por tipo de diluyente.

Carnero	N	Tris (%)	Ovine Freezing (%)
1	8	59.13 ± 2.30 a	61.14 ± 1.77 a
2	8	60.50 ± 1.60 a b	62.63 ± 2.97 a b
3	8	60.63 ± 1.51 a b	63.38 ± 2.50 a b
4	8	61.50 ± 1.60 b	63.38 ± 2.50 a b
5	8	62.25 ± 1.39 b	64.13 ± 2.23 b
TOTAL	40	60.77 ± 1.89	62.93 ± 2.41

a,b Las letras diferentes muestran diferencia significativa (P<0.05)

El efecto de la congelación sobre la motilidad de los espermatozoides es menor en el dilutor Ovine freezing y permite obtener valores superiores respecto al dilutor Tris. Cabe resaltar, la nitidez y claridad que brinda el dilutor Ovine Freezing durante la observación microscópica de la motilidad del semen descongelado.

La diferencia observada en los valores de motilidad de ambos dilutores estaría muy probablemente influenciado por la proporción de ácido cítrico que contiene los dilutores, debido a que este elemento ejerce acción directa en la membrana de los

espermatozoides en la fijación de calcio, que junto con los iones de sodio y potasio mantienen el equilibrio osmótico favoreciendo la motilidad de los espermatozoides (Borque et al. 1992).

3.2.2 Porcentaje de Endosmosis Positiva entre Carneros

En la Tabla 4, se detallan los resultados HOST para cada carnero con fines comparativos. A la prueba de Duncan para diferencia de medias, existen diferencias estadísticas individuales.

Tabla 4. Proporción de espermatozoides con membrana citoplasmática intacta en semen descongelado según carnero.

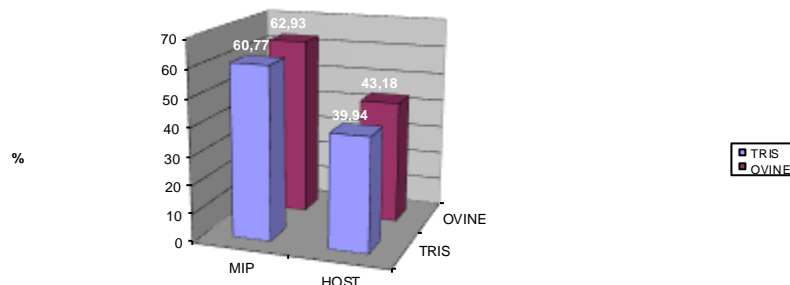
Carnero	n	Dilutor Tris %	n	Dilutor Ovine Freezing %
1	8	38.55 ± 3.44 a b	8	41.06 ± 0.81 a
2	8	39.42 ± 2.62 a b	8	42.36 ± 1.97 a
3	8	36.90 ± 1.61 a	8	42.94 ± 3.80 a
4	8	40.99 ± 1.09 b	8	43.69 ± 2.22 a b
5	8	44.35 ± 4.16 c	8	46.16 ± 2.94 b
Total	40	39.94 ± 3.57	40	43.18 ± 2.85
Carnero	n	Dilutor Tris %	n	Dilutor Ovine Freezing %
1	8	38.55 ± 3.44 a b	8	41.06 ± 0.81 a
2	8	39.42 ± 2.62 a b	8	42.36 ± 1.97 a
3	8	36.90 ± 1.61 a	8	42.94 ± 3.80 a
4	8	40.99 ± 1.09 b	8	43.69 ± 2.22 a b
5	8	44.35 ± 4.16 c	8	46.16 ± 2.94 b
Total	40	39.94 ± 3.57	40	43.18 ± 2.85

a, b, c: letras diferentes existe diferencias estadísticas (P<0.05).

El dilutor Ovine Freezing conservó mejor el semen, hecho observable en el carnero 1 que sirve de ejemplo, en el cual pese a tener el resultado mas bajo en su grupo, muestra un valor muy adecuado,

respecto a los obtenidos con dilutor Tris. Estos resultados, ponen de manifiesto que los efectos de la descongelación están íntimamente relacionados con los ocasionados durante la congelación.

Figura 3. Comparativo de la motilidad y host según dilutor en semen descongelado de ovino.



3.3 Porcentaje de Motilidad Según Momento de Procesamiento del Semen y Tipo de Dilutor

En la Tabla 5, se aprecia el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo en los diferentes periodos de procesamiento del semen.

Tabla 5. Motilidad individual progresiva en diferentes tiempos de conservación del semen ovino.

Semen	Dilutor Tris			Dilutor Ovine Freezing		
	N	%	C.V.	N	%	C.V.
Refrigerado	40	80.70 ± 2.75	0.03	40	82.55 ± 2.74	0.03
Congelado	40	60.77 ± 1.89	0.03	40	62.93 ± 2.41	0.04

Al análisis de varianza (ANVA) existe diferencia estadística altamente significativa ($P < 0.01$) entre dilutores, entre carneros y momentos de procesamiento. En la interacción tiempo – dilutor, no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) lo que significa que es indiferente el tiempo respecto al uso de uno u otro dilutor, sus diferencias, se mantendrán siempre.

3.4 Porcentaje de Endosmosis Positiva Según Diluyentes en Diferentes Momentos de Procesamiento de Semen

En la Tabla 6, se aprecia el porcentaje de espermatozoides que reaccionaron en forma positiva a la prueba de endosmosis en los diferentes periodos

de procesamiento del semen. El promedio del porcentaje de endosmosis en semen descongelado respecto a semen puro; varió en 40 % aproximadamente; este porcentaje de reducción fue menor a lo reportado por (Thomas et al. 1998) quienes afirman que durante el proceso de criopreservación se produce una disminución aproximada del 50% en la viabilidad espermática, debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, ocurriendo cambios en la organización morfológica de las células, tales como la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el liquido intracelular.

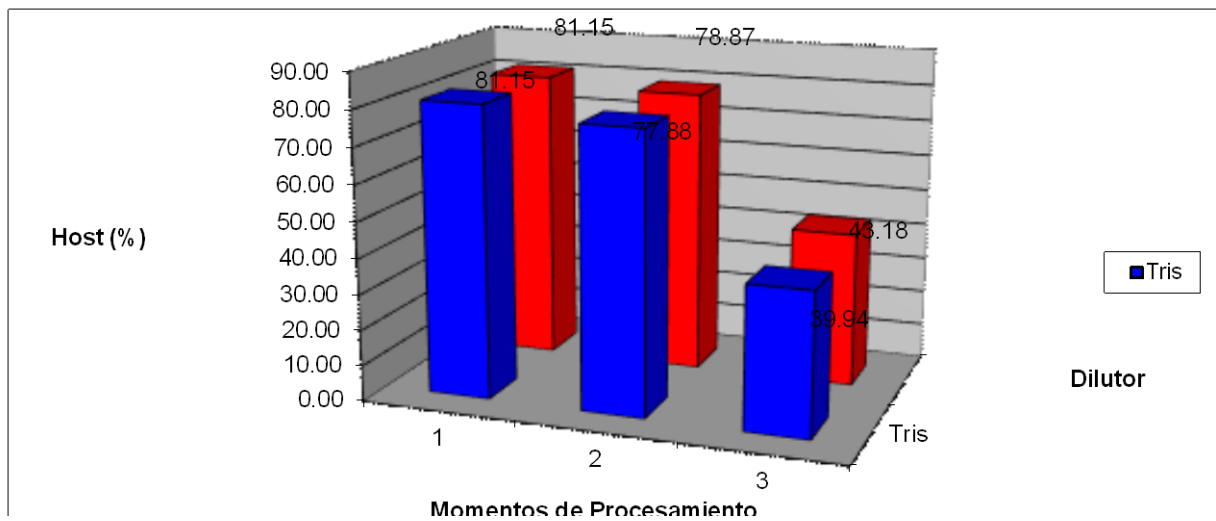
Tabla 6. Endosmosis en diferentes tiempos de conservación del semen ovino.

Semen	Sin diluir			Dilutor Tris			Dilutor Ovine Freezing		
	N	%	CV	N	%	CV	N	%	CV
Puro	40	81.15 ± 3.66	0.05	-	-	-	-	-	-
Refrig	-	-	-	40	77.88 ± 4.76	0.06	40	78.87 ± 3.96	0.05
Cong.	-	-	-	40	39.94 ± 3.57	0.09	40	43.18 ± 2.85	0.07

Al análisis de varianza (ANVA) existe diferencia estadística altamente significativa ($P < 0.01$) entre dilutores, entre carneros y momentos de procesamiento. En la interacción tiempo – dilutor, sucede lo mismo que en la motilidad, no se observan diferencias significativas ($P > 0.05$) lo que significa que es indiferente el tiempo respecto al uso de uno u otro dilutor, sus diferencias, se mantendrán siempre. En el Cuadro 6, se puede notar una reducción de 40% aproximadamente en el promedio del porcentaje

de endosmosis en semen descongelado respecto a semen puro; este porcentaje de reducción fue menor a lo reportado por (Thomas et al. 1998), debido principalmente al efecto de la temperatura y la presión osmótica, ocurriendo cambios en la organización morfológica de las células, tales como la permeabilidad, composición lipídica de las membranas espermáticas y en el liquido intracelular.

Figura 4. Integridad de membrana en diferentes momentos de procesamiento del semen ovino.



1= Semen Puro, 2= Semen Refrigerado y 3= Semen Congelado.

3.5 Regresiones y Correlaciones entre las Características Evaluadas

Tabla 7. Regresiones lineales entre las características del semen.

RELACIÓN		B	Sig.
HOST Tris Ref.	HOST S.Puro	0.7871	*
HOST OV.Ref.	HOST S.Puro	0.76484	**
HOST Tris Cong.	MIP Tris Ref	0.60565	*
HOST Tris Cong.	HOST S.Puro	0.28683	NS
HOST OV.Cong.	HOST S.Puro	0.24753	NS
MIP Tris Ref.	HOST S.Puro	0.15906	NS
MIP Ov.Ref.	HOST S.Puro	0.12754	NS
MIP Tris Cong.	HOST S.Puro	0.11264	NS
MIP Ov.Cong.	HOST S.Puro	0.15576	NS
MIP Tris Cong.	MIP Tris Ref.	0.26688	NS
MIP Tris Cong.	HOST Tris Ref.	0.15548	NS
MIP Ov. Cong.	MIP Ov. Ref	0.18816	NS
HOST OV.Cong.	MIP Ov. Ref	0.35529	NS
MIP Ov.Cong.	HOST Ov. Ref	0.13538	NS
HOST OV.Cong.	HOST Ov. Ref.	0.24334	NS

La motilidad seminal no es un buen indicador de la calidad de semen, no se regresa con la integridad de membrana espermática. En cuanto a la correlación, el volumen de eyaculado no correlaciona con ninguna característica (es negativa); la motilidad masal guarda baja correlación con la concentración (+ 0.216), muy baja correlación con el porcentaje de espermatozoides anormales (+ 0.1) y es negativa con el resto de las características.

La concentración no guarda correlación con todas las características, salvo la motilidad que es baja; el porcentaje de espermatozoides vivos con ninguna de las características evaluadas, salvo con el porcentaje de endósmosis en semen puro que es muy alta (+ 0.92) ($P < 0.01$). El porcentaje de anomalías guarda muy baja correlación con la motilidad y con el resto es negativa.

La motilidad individual progresiva en semen refrigerado, tanto con dilutor Tris, como con Ovine Freezing muestra una correlación moderada, no significativa; lo mismo sucede en semen descongelado. Investigaciones de referencia sugieren la existencia de una subpoblación de espermatozoides que aún con su membrana dañada presentarían movilidad. Esta subpoblación podría estar contribuyendo a la presencia e intensidad de movimiento en masa post-descongelamiento y reaccionar negativamente al Host.

4. Conclusiones

- La evaluación de motilidad en semen descongelado, muestra una diferencia estadística altamente significativa ($P < 0.01$) entre dilutores, entre carneros y momentos de procesamiento, a favor del dilutor ovine freezing que permitió obtener una motilidad seminal post descongelamiento de 62.93 %.
- La prueba hipoosmótica, aplicada para determinar la integridad de membrana, a muestras de semen congelado – descongelado, permitió evidenciar diferencias estadísticas significativas ($P < 0.01$) entre dilutores, entre carneros y momentos de procesamiento, a favor del dilutor Ovine Freezing.
- El dilutor Ovine freezing, conservó mejor el semen durante el proceso de congelación; la prueba hipoosmótica, es un buen indicador de la calidad de

semen, su aplicación es muy práctica, precisa y sobre todo permite elegir el semental mas adecuado.

5. Referencias bibliográficas

- Boretto, J.M.; Gibbons, A.E.; Bunge, M.M.; Cueto, M.I.; Bidinodt, F. (2002). "Calidad Seminal post descongelamiento en relación con la eficiencia reproductiva de la inseminación artificial laparoscópica en ovinos". *Revista de Medicina Veterinaria*. vol. 83 (4): 185-188. Bariloche Argentina.
- Brito Leonardo f. C.^a, Barth^a Albert d., Bilodeau--Goeseels Sylvie^p, Panich Paul I^b and. Kastelic John P^B. (2003). Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rateo. *Theriogenology* Volume 60, issue 8, November, Pages 1539-1551. Disponible en la World Wide Web: <http://www.sciencedirect.com/science>.
- Correa, J.R.; Zavos, P.M. (1994). The hipoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen_thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, 48: 721-731.
- Correa, J., M. Pace, P. Zavos. (1997). Relationship among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology* 48: 721-731.
- Ducci M, Gazzano A, Villani C, Cela V, Artini PG, Martelli F, Genazzani AR. (2002). Membrane integrity evaluation in rabbit spermatozoa. *Eur. J. Obstet Gynecol Reprod Biol.* [online]. Apr 10; 102(1):53-6. Citado (24 noviembre 2000, aceptado 23 octubre 2001). Disponible en la World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>.
- Evans, G. y Maxwell, WMC. (1990). "Salamon s Artificial Insemination of Sheep and Goats". Editorial Butterworth / Co. Ltd., 88 Kingsway, London WC2B 6AB.

- Gibbons A., M. Cueto, M. Wolff, J. Arrigo, J. GARCIA. (2004). Obtención, procesamiento y conservación del semen ovino. Comunicación técnica PA 200. INTA. EEA Bariloche.
- Hafez, E.S.E. (1996). "Reproducción e inseminación artificial en animales" Sexta Edic. Editorial Interamericana McGrawHill. México. 694 p.
- Mazur, P. (1966). Physical and chemical basis of injury in single-celled micro-organisms subjected to freezing and thawing. In *Cryobiology* (ed. H.T. Meryman), pp. 213 – 315. New York and London: Academic press.
- Mazur, P., Leibo, S.P. & Chu, E.II.Y. (1972). A two factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue culture cells. *Expl Cell Res.* 71, 345 – 355.
- Mazur P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled. at supraoptimal rates. *Cryobiology*; 14: 251-272.
- Meryman, H.T. (1966). Review of biological freezing. In *Cryobiology* (ed. H.T. Meryman), pp.1 – 114. New York and London: Academic Press.
- Perez Lopez, César. (2001). "El Sistema Estadístico SAS" Instituto Complutense de Madrid. Editorial Prentice Hall. España. 773 p.
- Santiani A., A.; Sandoval, R.; y Coronado, L. (2004). Estudio de la integridad de membrana en espermatozoides de ovino mediante la prueba de estrés hipoosmótico. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Tamuli, MK; Watson PF. (1992). Effects of temperatura of incubation on the development of resistance to cold stress in boar spermatozoa incubated for up 24 hours. *Proc. 12th ICAR Congress.* The Hague, pp. 1484 - 1486.
- Thomas, C. A.; Garner D. L.; Dejarnette, J. M.; Marshall, C.E. (1998). Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod* 58: 786 - 793.
- Vasquez JM; Martinez EA; Roca J; Blanco O; Lucas X; Matas C. (1997). Hypoosmotic Swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology*; 47: 913 – 922.