

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA METFORMINA EN LA VIABILIDAD
ESPERMÁTICA DE SEMEN OVINO REFRIGERADO**

OMAR CESAR AUGUSTO BOLAÑOS DUARTE

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PLAN DE ESTUDIOS ZOOTECNIA

SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2019

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA METFORMINA EN LA VIABILIDAD
ESPERMÁTICA DE SEMEN OVINO REFRIGERADO**

OMAR CESAR AUGUSTO BOLAÑOS DUARTE

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de:

ZOOTECNISTA

Director

CARLOS MARIO DUQUE CAÑAS

MVZ; Esp; MSc; PhD(c)

Profesor Asociado

Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad de Pamplona

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PLAN DE ESTUDIOS ZOOTECNIA

SAN JOSÉ DE CÚCUTA

2019

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi hija María Salome Bolaños García, quien se convirtió en el motor de mi vida y me motiva cada día a superar los obstáculos, logrando alcanzar muchos éxitos para que se sienta orgullosa de su padre.

AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por las bendiciones que siempre me ha concedido, especialmente por este nuevo triunfo.

A mi madre Nidia María Duarte Garavito, quien día a día con mucho esfuerzo me dio su apoyo y alentó para continuar en mi propósito, logrando hoy este nuevo éxito.

A mi abuela Porfiria Garavito Rolon, quien con sus consejos y oraciones fortaleció mi espíritu alcanzando en mí paz interior.

A mis maestros quienes contribuyeron con su enseñanza en mi formación profesional.

A mis tutores Carlos Mario Duque y Leonardo Hernández quienes me asesoraron, apoyaron y dirigieron durante la elaboración de mi tesis de investigación, aportándome su gran experiencia y conocimientos con paciencia y dedicación.

Al Sistema Productivo Ovino Siete Colores, por prestar sus instalaciones para la elaboración de este proyecto.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos mis agradecimientos, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

RESUMEN

Gracias al crecimiento de la producción ovina en Colombia, se buscan optimizar y mejorar todos los procesos productivos y reproductivos de la misma, dentro de estos procesos está el de dilución y conservación de semen ovino. En el proceso de conservación de semen ovino se sabe que hay una pérdida de hasta el 50% de las células seminales, gracias a que los diluyentes comerciales no previenen en su totalidad el daño causado por todos los procesos de crio-preservación.

Teniendo en cuenta que hay estudios donde se ha usado la metformina para mejorar la calidad del semen en ratones y humanos; en este proyecto investigativo se adicionaron 0 mg, 2.5 mg, 5 mg y 10 mg de metformina y se tomaron los datos a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la colecta respectivamente. Para la evaluación de motilidad y progresividad se analizaron tres campos que tomó el software al azar para cada tiempo y concentración del antioxidante, tomando un promedio de 300 espermatozoides, la vitalidad se determinó mediante la técnica de tinción con Eosina-Nigrosina por conteo de 100 espermatozoides en un microscopio de luz con magnificación de 400X, y se clasificaron como vivos los espermatozoides translúcidos y como muertos los coloreados parcial o totalmente.

Con esta investigación se logró determinar que la motilidad en función de la progresividad y velocidad presenta resultados favorables con niveles de inclusión de 5 mg de metformina hasta las 72 horas, para la variable vitalidad de las células espermáticas a medida que el tiempo aumenta los porcentajes de supervivencia decrece de manera similar para cada tratamiento.

Palabras claves: características seminales, metformina, semen ovino, viabilidad espermática.

SUMMARY

Thanks to the growth of sheep production in Colombia, they seek to optimize and improve all the productive and reproductive process of the same, within these processes is the dilution and conservation of sheep semen. In the sheep semen preservation process it is known that there is a loss of up to 50% of the seminal cells, thanks to the fact that commercial diluents do not completely prevent the damage caused by all cryopreservation processes.

Bearing in mind that there are studies where metformin has been used to improve semen quality in mice and humans; In this research project 0 mg, 2.5 mg, 5 mg and 10 mg metformin were added and the data were taken at 0, 24, 48 and 72 hours after collection respectively. For the evaluation of motility and progressivity, three fields were analyzed that the software took at random for each time and concentration of the antioxidant, taking an average of 300 sperm, the vitality was determined by the technique of staining with Eosin-Nigrosine per 100 sperm count in a light microscope with 400X magnification, and translucent sperm were classified as alive and partially or totally colored as dead.

With this investigation it was possible to determine that motility based on progressivity and speed has favorable results with inclusion levels of 5 mg of metformin until 72 hours, for the variable vitality of sperm cells as time increases the percentages of Survival decreases similarly for each treatment.

Keywords: seminal characteristics, metformin, sheep semen, sperm viability.

Contenido

Introducción	1
1. Problema de investigación	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo General	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Formulación del Problema	5
1.5. Hipótesis de Investigación.....	6
1.5.1. Hipótesis nula 1	6
1.5.2. Hipótesis alternativa 1	6
1.5.3. Hipótesis nula 2	6
1.5.4. Hipótesis alternativa 2	6
2. Marco Teórico	7
2.1. Generalidades de la especie ovina.....	7

2.1.1. Clasificación.....	9
2.1.2. Razas ovinas en Colombia	10
2.1.3. Producción ovina en Colombia	12
2.1.4. Importancia de la producción en los ovinos.....	15
2.2. Técnicas empleadas en la conservación de semen en ovinos.....	17
2.3. Diluyentes para la I.A.....	18
2.4. Producción espermática.....	19
2.5. Factores sobre la producción y calidad espermática	22
2.6. Uso de implantes de Melatonina	25
2.7. Plasma seminal	26
2.8. Crioconservación de semen ovino.....	28
2.9. Refrigeración, congelación y descongelación	29
3. Metodología.....	37
3.1. Ubicación y caracterización del área experimental.....	37
3.2. Características y manejo de las unidades experimentales	37
3.3. Colecta y procesado del semen	38

3.4. Preparación de los medios de preservación.....	39
3.5. Análisis de laboratorio.....	39
3.5.1. Características macroscópicas (Volumen, color, aspecto)	39
3.5.2. Características microscópicas.....	40
3.6. Metodología estadística.....	41
4. Resultados	43
4.1. Análisis computarizado de la motilidad espermática.	43
4.2. Análisis de la vitalidad espermática.	48
5. Discusión	49
6. Conclusiones	52
7. Recomendaciones	53
Referencias Bibliográficas	54

Lista de imágenes

Imagen 1. Machos empleados para colecta del semen.....	38
Imagen 2. Colecta del semen a través de vagina artificial.	38
Imagen 3. Capturas de células espermáticas con el software ISAS V 1.2.	41

Lista de cuadros

Cuadro 1. Motilidad espermática en función de la progresividad	43
Cuadro 2. Porcentajede pérdida en función de la progresividad	46
Cuadro 3. Motilidad espermática en función de la velocidad	46
Cuadro 4. Comparación de las medias de vitalidad espermática	48

Lista de gráficos

Grafica 1. Motilidad espermática en función de la progresividad	46
Grafica 2. Motilidad espermática en función de la velocidad.....	48
Grafica 3. Comparación de los porcentajes de vitalidad espermática niveles de metformina versus las horas de estudio.....	48

Introducción

En Colombia las ganaderías ovinas, que comenzaron como una tradición cultural y gastronómica han tomado fuerza con el paso del tiempo, la especie ovina tiene una importante función social para la población rural y comunidades indígenas del territorio nacional al proporcionar alimento y ser un medio para el mantenimiento cultural y económico; actualmente esta cadena productiva está conformada aproximadamente por 1 millón 297 mil 118 ovinos a nivel nacional, según datos otorgados por la Asociación de Criadores de Ganado Ovino de Colombia, Asoovinos (contextoGanadero.,2017).

Es importante tener en cuenta que en los últimos años la actividad ha avanzado en cuanto a la industrialización, estableciéndose criaderos con alto potencial genético, en donde el uso de la biotecnología reproductiva es evidente, se han implementados programas de celos inducidos, inseminación artificial (IA), transferencia de embriones, obtención de pajillas, entre otros, haciéndose necesario el uso de diluyentes comerciales para prolongar la viabilidad de las células espermáticas y aumentar el rendimiento de un eyaculado (Godoy Guldman., 2011).

Por otra parte, los estudios andrológicos, son fundamentales ya, que permiten verificar la calidad del semen de cualquier especie (incluido del ser humano), garantizar el éxito reproductivo y la transferencia de las características genéticas en las siguientes generaciones. En los últimos años, se han realizado adelantos significativos en la técnica de conservación (Roca et al., 2000; Nagy et al., 2002; López-Gatius et al., 2005) del semen ovino, sin embargo, la fertilidad y prolificidad son inferiores a las que se obtienen con semen fresco (Viudes de Castro y Vicente, 1996). Uno de los factores que determinan el éxito de la IA en fresco, es el uso de diluyentes naturales o sintéticos que permiten el fraccionamiento del eyaculado en varias dosis y

mantienen la viabilidad de los espermatozoides; sin embargo, los diluyentes comerciales no alcanzan a proteger en un 100% la integridad de las células espermáticas, generándose daños considerables durante los procesos de conservación, condición que se ve reflejada en la viabilidad del semen para los procesos de inseminación artificial.

La metformina es un medicamento usado en tratamientos para diabetes tipo 2, este medicamento es un antioxidante y ya se a usado para mejorar la calidad seminal; según (Wen-jie YanYang et al/2015) “La intervención con metformina mejoró los parámetros del semen en ratas”.

Teniendo en cuenta lo anterior, la presente investigación plantea como objetivo evaluar las características seminales (vitalidad y motilidad) de ovinos, utilizando diferentes concentraciones de netformina como antioxidante en un medio de preservación comercial.

1. Problema de investigación

1.1. Planteamiento del problema

En Colombia son pocos los programas de mejoramiento genético en los ovinos, ya que este tipo de producción tiene un mercado local, limitando el continuo desarrollo e industrialización de la actividad (Ocampo., 2014); desde sus inicios la producción ovina ha estado vinculada a una economía de subsistencia, relacionada con sistemas de producción tradicionales y artesanales, en donde hay una baja utilización de tecnologías, los hatos ganaderos se encuentran conformados por un bajo número de ejemplares y el genotipo es básicamente por sangre criolla en un 80 a 85 % , mestizos en un 10 a 15% y solo el 5% corresponde a animales de razas puras, dependiendo de la zona en que se encuentran las explotaciones (Grajales & Tovio., 2010).

La conservación de semen ovino, con buenas técnicas de manejo aporta diversas ventajas en una explotación, ya que optimiza la utilización de un eyaculado teniendo en cuenta que en los ovinos es común encontrar volúmenes de semen desde los 0,3 ml hasta 2,1 ml logrando cubrir un número mayor de hembras por inseminación artificial en un mismo día o periodo y la conservación de este, por un tiempo mayor (Yániz et al., 2015; Rubio-Guillen., 2017).

La dilución, refrigeración y conservación del semen ovino es una técnica que actualmente se está implementándose con mayor frecuencia en Colombia con el fin de mejorar el rendimiento del mismo; según estudios las células espermáticas en este proceso sufren daños hasta en el 50% de ellas (Rubio-Guillen, 2017), la motilidad espermática es un buen indicador de la viabilidad del semen y por ende su relevancia para la fertilidad (Quintero-Moreno 2003). Teniendo en cuenta que los diluyentes comerciales para semen ovino no previenen en su totalidad los daños causados

por dicho proceso de dilución y refrigeración en la motilidad y viabilidad, se realizó la presente propuesta de investigación usando metformina como antioxidante o coadyuvante de un diluyente comercial para mejorar los parámetros espermáticos (motilidad y vitalidad).

1.2. Justificación

El crecimiento de la competencia productiva y el desarrollo de las producciones llevan a la tecnificación de las explotaciones ovinas, así como la aplicación de biotecnologías reproductivas, que permitan mejorar la calidad genética de los ejemplares, esto ha hecho que los productores se enfoquen en la planeación y desarrollo de programas de mejoramiento genético, donde se hace necesario la implementación de prácticas reproductivas, como la congelamiento de semen, entre otros; aunque la aplicación de estas prácticas ha tenido algunas limitantes relacionadas con el daño a las células seminales por el manejo, dilución y conservación del mismo.

Mediante la criopreservación del semen se logra rescatar características genéticas deseadas de una especie (Hafez, 2003); para el caso de los ovinos, en Colombia se ha buscado mejorar las explotaciones, de manera que sean rentables, eficientes y que contribuyan a la economía del país (Grajales & Tovia, 2010); es así como la implementación de la inseminación artificial, ha desempeñado un papel importante, al disminuir los costos en la adquisición de sementales genéticamente mejorados y al lograr que un mayor número de hembras puedan ser servidas con el eyaculado de un solo macho (al rentabilizar el semen, implementando medios de preservación ya sea para ser utilizado en el momento de la obtención del eyaculado o para conservarlo por prolongados periodos de tiempo). Sin embargo, en el proceso de dilución y conservación del semen ovino se pierde cerca del 50% del material seminal por daños, ya que los diluyentes

comerciales no previenen en su totalidad los daños por este proceso. Teniendo en cuenta lo anterior, el presente trabajo se enfocó en investigar alternativas para reducir los daños por la dilución y conservación de semen ovino, agregando al proceso como un coadyuvante del diluyente la metformina.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la metformina sobre las características espermáticas (vitalidad y motilidad) en semen ovino refrigerado.

1.3.2. Objetivos específicos

Evaluar el efecto de los niveles de metformina sobre la progresividad espermática (estáticos, móviles progresivos y móviles no progresivos) en semen ovino refrigerado.

Evaluar el efecto de los niveles de metformina sobre la velocidad de células espermática (estáticos, lentos, medios y rápidos) en semen ovino refrigerado.

Determinar la interacción entre los niveles de metformina a evaluar y el tiempo de refrigeración del semen ovino.

1.4. Formulación del Problema

¿Existirán efectos en las características espermáticas (vitalidad y motilidad) al utilizar diferentes porcentajes de metformina en el diluyente comercial y estas células espermáticas al ser sometidas diferentes tiempos de refrigeración?

1.5. Hipótesis de Investigación

1.5.1. Hipótesis nula 1

Los niveles de metformina no afectaran las características espermáticas del semen ovino refrigerado.

1.5.2. Hipótesis alternativa 1

Los niveles de metformina afectaran al menos una de las características espermáticas del semen ovino refrigerado.

1.5.3. Hipótesis nula 2

Los tiempos de refrigeración del semen ovino con diferentes niveles de inclusión de metformina no afectaran las características espermáticas.

1.5.4. Hipótesis alternativa 2

Los tiempos de refrigeración del semen ovino con diferentes niveles de inclusión de metformina afectaran al menos una de las características espermáticas.

2. Marco Teórico

2.1. Generalidades de la especie ovina

Los ovinos son pequeños rumiantes con capacidad de transformar forrajes de diferentes tipos, aún los de mala calidad. Por su gran adaptación, los ovinos pueden ser criados en todos los climas, aunque para ello será necesario elegir la raza o tipo de animal más adecuado para una región dada. La cría de ovinos proporciona múltiples productos a la familia: carne que contiene proteínas de alta calidad y que puede cubrir los requerimientos proteicos y de hierro en los niños; leche para la elaboración de queso; lana y estiércol (abono). (García, 1998)

Los ovinos presentan unas características especiales a diferencia de las otras especies de producción doméstica en el país tales como la fácil explotación extensiva, su fácil adaptabilidad y de buen uso de los recursos forrajeros, ser una especie bastante instintiva (búsqueda de alimento y abrigo), buena aptitud materna, además, todos los años entrega algún producto terminado (carne, lana) y hay gran diversidad de razas, lo que permite adaptarse a diferentes condiciones agroclimáticas en el país. El beneficio nacional de cabras y ovejas, es un número que puede variar debido al faenamiento de animales en forma artesanal, además, la faena de estos animales es muchas veces realizada en deficientes condiciones higiénicas. (Moreno & Grajales, 2008)

La cadena de Ovino y caprina en Colombia se caracteriza por una estructurada interacción entre sus eslabones y está dividida en dos sistemas de producción. El primero se dedica a la producción de cárnicos y productos artesanales. El segundo sistema se dedica a la producción de

leche y sus derivados. Es común encontrar productores dedicados a los dos sistemas productivos. (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2010).

La lana y los subproductos pasan a otro eslabón importante de la cadena que es el comercializador que se encarga de la distribución de los diferentes productos provenientes de este proceso para llegar por último al consumidor final. (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2010).

Estos son animales gregarios; acostumbran a permanecer juntos mientras pastorean y se asustan si son separados del grupo. Son animales sociales y generalmente están pendientes unas de las otras. Normalmente tienen un líder al que siguen y las crías tienden a seguir a los animales adultos. En una granja pueden ser animales muy tranquilos. La dieta usual de estos animales es forraje, semillas, ensilaje y heno, aunque pueden consumir granos. (Barrios, 2007).

Por su gran adaptación, los ovinos pueden ser criados en todos los climas, teniendo en cuenta algunas características de las razas para situarlas apropiadamente en un clima específico, con la precaución en cualquier caso de no proporcionar ambientes con exceso de humedad. Una oveja puede vivir más de diez años y su vida útil puede iniciar desde los primeros días de vida en el caso de algunas razas de piel, hasta los 8 o 9 años que están en capacidad de reproducirse. Poseen cabeza bien modelada, regular tamaño, orejas pequeñas y delgadas, ojos grandes y vivos, dorso fuerte con extremidades delgadas y largas pezuñas resistentes. La ubre es bien desarrollada con pezones de buena conformación; su cola delgada y bien implantada. (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL, 2010).

2.1.1. Clasificación

Alrededor de 11000 años a.C y 8000 años a.C, entre las primeras especies animales estaban los ovinos, siendo estas especies muy utilizadas por el hombre desde la antigüedad, explotándolas por sus carnes, leche, fibras, pieles y otros, entre los que se destacan el uso de sus excretas como abono orgánico y para el control de los matorrales. En muchos países subdesarrollados continúan siendo los principales animales que cubren las necesidades del hombre. (Castillo et al, 2006).

El origen de la domesticación de la oveja se encuentra en el Oriente próximo, el cual hace parte del territorio de Asia cercano al Mediterráneo, en el denominado creciente fértil. Las pruebas arqueológicas zoológicas señalan que la domesticación tuvo lugar en el 7000 a.C. se sabe que la especie se originó a partir de la domesticación del Muflón en Oriente. Este ovino tenía 52 pares de cromosomas, existía dimorfismo sexual y la hembra no tenía cuernos (Vivas, 2013).

Los primeros colonizadores españoles introdujeron las ovejas en Cuba las que se multiplicaron rápidamente en los abundantes pastos de la Isla. Los colonizadores que se establecieron en México, Honduras y otras regiones de las Américas, acudieron a Cuba para la adquisición de animales (Castillo et al, 2006). La primera entrada de ovinos a Colombia fue en el año de 1542, cuando Alonso Luis de Lugo importó un grupo de animales, entre ellos ovejas de la raza churra. Hasta finales de los 30 en el país solo había ovinos criollos en el país, los de pelo en las zonas cálidas, y el criollo de lana en la zona andina (Cuellar, 2011). Hacia 1940 el ministerio de agricultura importó desde Inglaterra, los primeros ovinos de las razas Romney Marsh, Lincon y Suffolk que se ubicaron en la finca Australia cercana a Usme, en Cundinamarca, y

posteriormente se trasladaron a Nariño, teniendo en cuenta la tradición ovina de este departamento (Salazar, 2015).

En cuanto a la taxonomía las ovejas constituyen al género *Ovis*, forma parte de poblaciones muy polimorfas, lo que ha provocado una variada y diferente taxonomía, considerando todas las ovejas salvajes de Europa, Asia y América como una sola especie. Se distingue un total de cinco especies: *Ovis musimon*, *Ovis orientalis*, *Ovis ammon* y *Ovis nivicola* en (Eurasia), y *Ovis canadiensis* en Norteamérica. (Vivas, 2013).

2.1.2. Razas ovinas en Colombia

Existen básicamente dos tipos de ovejas: de lana y de pelo. Las ovejas de pelo no requieren esquila y normalmente se ubican en los terrenos cálidos o templados. Una de las ovejas de pelo más difundida en Colombia es la que conocemos como “Camuro” que es de origen africano. (Salazar, 2015).

Las ovejas de lana en Colombia se han utilizado principalmente como productoras de lana para la industria artesanal, pero actualmente algunos criadores han reorientado los objetivos de la cría hacia la carne, introduciendo genética superior para este fin y utilizando estas razas como base genética para su mejoramiento (Barrios, 2006).

Entre las principales razas de ovinos en Colombia se encuentran: Ovino de pelo colombiano OPC, Dorset, Pelibuey, Suffolk, Hampshire, Texel, Santa Inés. Razas de leche como Saanen, Alpina, Lamancha, Toggenburg y en cuanto a razas de carne encontramos Boer, Nubiana, Angora, Dorper, White Dorper, Charolais y kathadin. (Barrios, 2006).

Durante las condiciones una vez terminada la primera guerra mundial, el desarrollo de sistemas de producción utilizando animales que hicieran posible la obtención de crías en un corto tiempo y con altos índices de crecimiento fue el motivo que dio inicio a la producción ovina en el Sur de África (Scanlon, 2013). Fue así como se seleccionaron animales con las siguientes características: habilidad de parto en cuanto a una producción de becerros de alta producción de carne y rusticidad. Adicional se convirtió en una prioridad obtener becerros que alcanzaran el peso de sacrificio en 4 o 5 meses, adicional al frío, al calor excesivo, así como lluvias torrenciales y alta radiación solar. La producción ovina tiene potencial en países tropicales ya que durante esta selección también se tuvo en cuenta que los animales sean eficientes en la utilización de pastos de baja calidad (Scanlon, 2013).

La raza Dorper es capaz de desarrollarse en una amplia variedad de condiciones climáticas, desde zonas áridas a las zonas semi tropicales; tiene gran capacidad de conversión alimenticia, obteniendo un máximo rendimiento con menos insumos; no son animales selectivos al momento del pastoreo, consumiendo forrajes maduros y lignificados; son animales pequeños al nacer, pero de precoz crecimiento y ganancia de peso llegando los 35kg promedio en un tiempo de 3.5 – 4 meses de edad sin ningún tipo de dificultad (Bulla, 2014). En condiciones óptimas se pueden lograr pesos muchos mayores; son una de las razas más fértiles, con larga temporada de cría; presentan intervalos entre partos de 8 meses, con alta probabilidad de nacimientos múltiples. Las ovejas son excelentes productoras de leche y buenas madres y son animales que se adaptan fácilmente a un ambiente determinado, ya que tienen fuerte capacidad de supervivencia. Poseen temperamento tranquilo con apariencia vigorosa (Bulla, 2014).

Los corderos alcanzan excelentes pesos al destete llegando a los 36 kg entre los tres y cuatro meses de edad. En la parte reproductiva se puede lograr tres partos por cada dos años. Además, son animales que se caracterizan por producir una piel de buena calidad, lo que tiene amplios mercados y gran prestigio, lográndose hasta un 20% más de ganancias (Bulla, 2014).

2.1.3. Producción ovina en Colombia

El ovino en Colombia se utiliza para producir lana, cuero, carne, y en algunas zonas, también leche. Posee temperamento tranquilo y su instinto gregario constituye una ventaja para el manejo. Por ser un animal doméstico de miles de años de antigüedad, existen en el mundo gran cantidad de razas ovinas con gran variación en cuanto a las características y aptitudes para las más diversas producciones (Espinal et al., 2006). La difusión mundial que posee se debe a su resistencia y adaptabilidad al medio. Presentan unas características especiales a diferencia de las otras especies de producción doméstica en el país tales como la fácil explotación extensiva, su fácil adaptabilidad y de buen uso de los recursos forrajeros, es una especie bastante instintiva (búsqueda de alimento y abrigo), buena aptitud materna, además, todos los años entrega algún producto terminado (carne, lana) y hay gran diversidad de razas, lo que permite adaptarse a diferentes condiciones agroclimáticas en el país (Espinal et al., 2006).

La cadena Ovina se caracteriza por una estructurada interacción entre sus eslabones y está dividida en dos sistemas de producción. El primero se dedica a la producción de cárnicos y productos artesanales. El segundo sistema se dedica a la producción de leche y sus derivados (Espinal et al., 2006). Es común encontrar productores dedicados a los dos sistemas productivos. En el caso de la cadena de producción de carne, en el país el proceso comienza con la cría de reproductores y vientres de reemplazo que son los encargados de mantener las características

genéticas deseables y producir el pie de cría utilizado en el país, abasteciendo los apriscos y rebaños de ovejas de los diferentes productores, el pie de cría es destinado para la ceba y posterior sacrificio en el frigorífico (Espinal et al., 2006).

Del proceso de faenado de los animales se obtienen las canales que son comercializadas completas, por medias canales, y por cuartos de canal. Además, se obtiene del beneficio subproductos como las vísceras, pieles, cabeza y patas y contenido ruminal, que pasan a procesos industriales para la elaboración de artesanías y de abono en el caso del contenido ruminal. La carne y los subproductos pasan a otro eslabón importante de la cadena que es el comercializador que se encarga de la distribución de los diferentes productos provenientes de este proceso para llegar por último al consumidor final (Vivas, 2013)

En el 2015, el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), realizó un censo sobre la población ovina y caprina del país, arrojando como resultado un total de casi 2.5 millones de ejemplares, distribuidos en zonas específicas del país. La Guajira indiscutiblemente es la zona con mayor concentración de esta clase de animales, debido a factores culturales influenciados por la comunidad árabe e indígena de la región (ICA, 2015). Sin embargo, se ha notado un crecimiento representativo en los últimos años en departamentos como Boyacá, Cundinamarca, Valle del Cauca, Santander y Cesar. Este nuevo horizonte en la ganadería se puede atribuir a que muchos ganaderos especializados en bovinos están incursionando en dicho ganado debido al incremento en los costos, limitada producción y escasos márgenes de utilidad del sector bovino. (ICA, 2015)

Se pueden describir tres sistemas de producción ovino en Colombia se caracterizan por la disponibilidad estacional y la utilización subóptima de los recursos forrajeros (sobre y subpastoreo), la ausencia de esfuerzos por promover un uso sostenible del suelo y de cuidado del

ambiente natural (Vega et al, 2014) entre los que se identifican los sistemas de producción intensivo, basados en animales estabulados, manteniéndose encerrados la mayor parte de su vida. Estos sistemas son totalmente artificiales, creados por el hombre, y los animales están confinados, se le crean condiciones en la infraestructura destinada para este fin, como son condiciones de temperatura, luz y humedad principalmente (Romero, 2012); un sistema extensivo basado en el aprovechamiento de los pastos naturales y muy pocas veces se utilizan praderas cultivadas. La conversión alimenticia de los pastos nativos es muy pobre en los distintos ambientes, debido al terreno, clima y condiciones topográficas. (Romero, 2012) y un sistema semi intensivo donde Los animales pastorean durante el día y reciben una suplementación en el comedero, al final de la tarde. Este sistema es indicado para criar animales de tipo mixto para la producción de lana y carne, o leche y carne (Vargas et al, 2011)

En la actualidad se cuenta con diferentes tipos de producción de carne los cuales se manejan teniendo en cuenta factores como las condiciones climáticas, el acceso a alimento durante el año, el número de animales que se encuentren en producción y el mercado al cual se le venderá el producto final. Adicional a estos retos, los sistemas productivos de carne deberán estar en constante adaptación ya sea mejorando los procesos dentro de la finca, cambiando el tipo de raza por medio de cruces y haciendo cambios en la dieta de los animales. Para lograr esto, se deberá mejorar la eficiencia relacionada con los avances tecnológicos que podrán ser integrados y así alcanzar una adaptación apropiada (López, 2010).

En la mayoría de los países las ovejas se encuentran en zonas con poca disponibilidad de pastos y condiciones climáticas desfavorables. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la producción ovina se ha descrito como la

producción animal de personas de bajo recursos, esto debido al bajo costo de producción y el capital requerido para iniciar un sistema de producción ovino. La mayor cantidad de la población ovina se encuentra en países en desarrollo. Este tipo de producción permite al productor tener la flexibilidad de producir carne, lana y leche. No obstante, la mayoría de las producciones están destinadas a la crianza de animales que serán destinados para carne o comercialización de animales en pie con el mismo objetivo (Fourie, 2002).

Para concluir, los sistemas de producción de carne cuentan con varios retos que deberán ser abordados desde una perspectiva sustentable que permita la producción de alimento para la creciente demanda logrando aun un beneficio económico, ambiental y social. Así mismo es de gran importancia lograr que la ganadería de carne sea eficiente a través del tiempo, adaptándose a las condiciones del contexto donde se encuentra (Upegui, 2011). Por último, es necesario tener más información acerca de las estrategias que deben ser implementadas el contexto colombiano, teniendo en cuenta las características climáticas, las condiciones socioeconómicas, los parámetros productivos de los animales en producción y la capacidad competitiva de los sistemas de ganadería de carne ovina. A la vez, es importante potencializar las características y capacidades de cruces con el potencial productivo bajo condiciones del trópico colombiano (Upegui, 2011).

2.1.4. Importancia de la producción en los ovinos

El más grande reto que la humanidad debe enfrentar en las próximas décadas es el uso racional de los recursos naturales, y al mismo tiempo producir un volumen suficiente de alimento de calidad para satisfacer las demandas de una población humana creciente. La necesidad de producir alimentos de calidad e inocuos, demanda del sector agropecuario implementar de

acciones para incrementar la producción agrícola y pecuaria (Salazar, 2015). La producción pecuaria tiene un gran impacto en recursos naturales como el agua, la tierra y la biodiversidad, contribuyendo significativamente en el cambio climático, de forma directa o indirectamente, a través del pastoreo o de la producción de cultivos forrajeros. La producción pecuaria ocupa aproximadamente el 30 por ciento de la superficie terrestre libre de hielo y en muchas situaciones se constituye en la principal fuente de contaminación terrestre (Steinfeld et al., 2009). En el presente, el sector pecuario atraviesa una compleja transformación, puesto que ha transformando los patrones de distribución geográfica de la producción pecuaria. Asimismo, se registra cambio en las especies utilizadas, con un crecimiento acelerado de la producción de especies monogástricas y una desaceleración de la producción de rumiantes.

Para mitigar el impacto ambiental de los sistemas comerciales de producción animal de especies menores, se hace necesario desarrollar sistemas eficientes de producción que aprovechen los recursos animales y vegetales disponibles (Sandoval et al., 2013). Entre las especies menores, las ovejas de pelo han ido evolucionando bajo la influencia selectiva de la naturaleza y del hombre, adaptándose muy bien a los diferentes ambientes tropicales, resultando de mucha importancia para países en vías en desarrollo. Sin embargo, la ovino-cultura, en Colombia se ha desarrolla con niveles tecnológico bajo, tradicionalmente vinculada a economías de subsistencia, concentrada en pequeños rebaños, que reflejan reducida aplicación de nuevas técnicas en cada una de las áreas de producción (Arévalo y Correa, 2013). Las investigaciones sobre ovinos en los países en desarrollo han estado limitadas en las últimas décadas, debido principalmente a la escasez de recursos estatales. Adicionalmente, el sector presenta poca organización, presentando escasa vinculación con la agroindustria. Por tanto, se debe intensificar trabajos en los sistemas de producción en los cuales se combinen esquemas de investigación,

producción y extensión (González et al., 2010). En la actualidad, en Colombia, son pocas las investigaciones desarrolladas sobre el sector ovino. Aunque en la literatura se encuentran reportes de algunos trabajos realizados por grupos de investigación en diferentes instituciones, presentando productos relacionados en las áreas de recursos genéticos, alimentación y nutrición. En el presente, estudios generalizados de la diversidad genética de ovinos de pelo, brindara información relevante para su manejo eficiente, con el fin de generar alternativas económicas que proteger la seguridad alimentaria y la competitividad del sector a nivel nacional e internacional generando ventajas competitivas.

2.2. Técnicas empleadas en la conservación de semen en ovinos

La técnica reproductiva más utilizada en el mundo desde hace más de 30 años en los sistemas de explotación porcino ha sido la inseminación artificial (I.A), desde principios del siglo XX esta técnica ha sido desarrollada en Rusia por Ivanov (Gadea, 2003). La utilización de la IA se encuentra muy difundida, en países de la Unión Europea (Bélgica, Italia, Holanda y España) y algunos países americanos (México, EE.UU. y Canadá) superando los porcentajes de 75 y 80% de cerdas inseminadas con muestras refrigeradas respectivamente (Roca y col., 2006). Esta técnica posee grandes ventajas gracias al mejor aprovechamiento del potencial genético de algunos reproductores en una mayor cantidad de hembras ayudando y acelerando la mejora genética (Gadea, 2003)

La preservación de los recursos genéticos ganaderos ha alcanzado una gran relevancia a nivel internacional. De las 7.600 razas registradas en la base de datos de la FAO (2007) sobre recursos genéticos de animales domésticos, 190 se han extinguido en los últimos 15 años y otras 1.500 se consideran al borde de la extinción (Rodero y col., 2009). Sin embargo, existen múltiples razones

por las cuales se justifica la conservación de las distintas razas, es decir, desde la conservación de la variación genética animal permitiendo la adaptación a distintos ambientes, condiciones de producción o nuevas enfermedades hasta el valor ecológico de la conservación de razas autóctonas en su hábitat natural, manteniendo el equilibrio entre el clima, flora y fauna, así como la posibilidad de proporcionar un excelente material de investigación para la realización de estudios genéticos de las distintas razas que podrían aportar genes mejoradores al cruzarlos con otras razas.

2.3. Diluyentes para la I.A.

Un diluyente de semen se define como cualquier solución acuosa que permita aumentar el volumen total del eyaculado y que logre preservar todas las características funcionales de los espermatozoides manteniendo niveles de fertilidad adecuado (Gadea, 2003). El plasma seminal es el encargado de proporcionar los nutrientes necesarios para el mantenimiento de todas las actividades metabólicas de las células espermáticas incluyendo el transporte dentro del genital femenino. Normalmente estas características del eyaculado permanecen solo por un tiempo limitado, de allí la razón del diseño de diluyentes que puedan reducir dicha actividad metabólica de los espermatozoides, a su vez que los conserva durante periodos más prolongados.

La preservación del semen refrigerado sigue siendo el método de almacenamiento preferido de eyaculados de verraco, estas muestras se mantienen a una temperatura entre 15 a 20 °C durante varios días (Johnson y col., 2000). Estas temperaturas moderadamente bajas utilizadas para la conservación, limitan la capacidad de almacenamiento de las muestras seminales ya que no reducen en su totalidad el metabolismo celular de los espermatozoides además de no poder controlar las condiciones microbiológicas con igual efectividad que con temperaturas inferiores a

5 °C (Gadea, 2003). Esta práctica consiste en limitar la susceptibilidad que presenta las células espermáticas al shock por frío, que se traduce en alteraciones de la viabilidad de las muestras seminales, lo cual se debe a la composición lipídica de sus membranas, que parecen ser el responsable de este problema (Gadea, 2003).

Una posibilidad de utilizar semen almacenado en estado líquido hasta 5 días después de la recolección en gran medida mejora la eficiencia de producción y el beneficio económico para la industria de la IA, si el porcentaje de partos actuales y tamaño de la camada son mantenidos (Waterhouse y Vickers., 2004). Sin embargo, la fertilidad del semen refrigerado se pierde gradualmente durante largos períodos de almacenamiento. Varios estudios han demostrado la influencia de diferentes diluyentes en la longevidad y la calidad de los espermatozoides del cerdo (Waterhouse y col., 2004).

Una condición que se presenta luego de realizar la dilución es la disminución de las concentraciones de algunos compuestos que se encuentran en el plasma seminal que puedan producir alteraciones, como por ejemplo la reducción de la concentración de K^+ (Harrison y col., 1990), o algunas proteínas plasmáticas. Estas pérdidas pueden compensarse con una formulación adecuada del diluyente mediante la adición de albúmina sérica bovina (BSA), ya que se ha demostrado que mejoran la motilidad y las tasas de fertilidad del semen refrigerado (Waberski y col., 1994).

2.4. Producción espermática

Con la madurez sexual, se inicia la producción continuada de espermatozoides en el testículo o espermatogénesis, proceso cíclico que comprende una serie de fenómenos de división y

diferenciación celular, que en los pequeños rumiantes tiene una duración aproximada de 49 días (Franca y col., 1999; Folch, 2000). El tiempo para que se desarrollen las células es constante y no puede ser acelerado por ningún estímulo hormonal, alimentación o ritmo de eyaculación. De hecho, la producción espermática está en relación al volumen testicular, concretamente el morueco produce diariamente unos 20 millones de espermatozoides por gramo de testículo (Beltrán de Heredia, 2009).

Sin embargo, una vez concluida la espermatogénesis, los espermatozoides mamíferos aún no poseen el movimiento adecuado ni la capacidad de fusionarse al oocito, a pesar de estar altamente diferenciados. Es durante su tránsito y almacenamiento en el epidídimo y posterior transporte a través del tracto reproductor de la hembra, donde los espermatozoides experimentan una secuencia de cambios morfológicos, bioquímicos y cinemáticos a través de los cuales adquieren su capacidad fecundante (Cooper, 1986).

El cambio morfológico que se produce con mayor constancia durante la maduración espermática en el epidídimo es, en la mayoría de las especies, la migración de la gota citoplasmática de proximal a distal y su posterior eliminación del flagelo. En estudios recientes, el análisis morfométrico asistido por ordenador ha revelado cambios en el tamaño y la forma de los espermatozoides durante el tránsito epididimario (Soler y col., 2000). La morfología del núcleo no cambia drásticamente, pero sí se incrementa la estabilidad de la cromatina espermática, como resultado del aumento progresivo de puentes disulfuro (-S-S-) entre las protaminas del ADN ricas en cisteínas (Yanagimachi 1988 y 1994). Los cambios de forma y estructura del acrosoma son poco marcados en la mayoría de las especies, a excepción del

cobaya o la chinchilla, donde si son mucho más evidentes (Bellvé y O'Brien, 1983). Algunos componentes de la cola del espermatozoide también se estabilizan mediante puentes

Durante su paso por el epidídimo, los espermatozoides también sufren cambios bioquímicos, que, aunque afectan a todos sus compartimentos, las mayores modificaciones se centran en la membrana plasmática (Yanagimachi, 1988). El hecho de que la osmolaridad y composición química del fluido secretado por el epidídimo sea diferente en sus distintas partes justifica los cambios producidos en la membrana plasmática del espermatozoide durante su tránsito, ya que su exposición al fluido es directa (Yanagimachi, 1994). La acción de sustancias secretadas por el epitelio epididimario como proteínas, carnitina, ácido sálico o iones inorgánicos, entre otros, modifica la cubierta glicoproteica, de manera que la adsorción de estas sustancias a la superficie de la célula, sobre todo de las glicoproteínas, podría adquirir importancia en la interacción entre los gametos en el momento de la fecundación (Bains y col., 1993). Además, la cantidad y composición de los lípidos de la membrana espermática también varía y se da un aumento en la cantidad de colesterol.

La cinética de los espermatozoides también se modifica durante su tránsito epididimario, adquiriendo el máximo potencial en la región de la cola, donde más del 80% de los espermatozoides son ya móviles (Beltrán de Heredia, 2009). Probablemente, son dos los procesos que regulan la motilidad en el epidídimo; uno es la maduración efectiva del aparato flagelar, y el otro es la inhibición de la motilidad para inmovilizar los espermatozoides en el epidídimo y cuidar sus reservas energéticas (Waberski 2007). Esta fase de maduración en el epidídimo de los espermatozoides de morueco suele durar entre 12 a 20 días.

2.5. Factores sobre la producción y calidad espermática

La actividad reproductiva de los pequeños rumiantes está influenciada, entre otros, por varios factores estacionales (Pelletier y col., 1988), entre ellos se encuentra el fotoperiodo (Delgadillo y col., 1991; Rodríguez y col., 2003), cuya acción se produce a nivel del eje hipotálamo-hipofisis-gonada, vía glándula pineal. Esta glándula recibe las variaciones en las horas de luz/día y actúa como mediador transformando los impulsos ópticos de la luz en descargas hormonales de melatonina. Durante los días cortos, la glándula pineal aumenta la síntesis y secreción de melatonina que actuaría a nivel del sistema nervioso central variando la pulsatilidad de la secreción de GnRH en el hipotálamo. Esto supone, en última instancia, un aumento de la secreción de gonadotropina LH, lo que favorecerá el crecimiento testicular y la secreción de testosterona. Por el contrario, cuando el fotoperiodo es ascendente, a través del mecanismo anteriormente citado se deprime la secreción de LH y en consecuencia el tamaño testicular y la secreción de testosterona (Pelletier y col., 1988).

Sin embargo, la influencia del fotoperiodo depende a su vez de la localización geográfica, reduciéndose a medida que nos acercamos a los trópicos (Corteel, 1981; Chemineau, 1986). En este sentido, el tamaño testicular, la producción espermática y la calidad de los eyaculados, así como la capacidad de cubrición varían dependiendo de la latitud en la que se ubican las diferentes razas (Vázquez y col., 1986). Así, por encima de los 40° de latitud, las variaciones estacionales son muy marcadas (Thimonier y Mauleon, 1969), entre 30°- 40° se aprecia mayor producción espermática en verano y otoño, como en el morueco Ile-de-France, donde la producción de espermatozoides diaria por testículo pasa de alrededor de 1.000 millones en primavera a 5.000 millones en otoño (Dacheux y col., 1981). La calidad del semen y su fertilidad

en inseminación artificial varían también. En la misma raza se ha observado más de 20 % de espermatozoides anormales y una fertilidad del 47,1 % en primavera, mientras que estos valores son de 10 % y 68,4 % en otoño, respectivamente (Colas, 1980). En zonas situadas a menos de 30° de latitud, sin embargo, las variaciones estacionales en la producción de células espermáticas son muy ligeras (Alonso de Miguel y Cognié, 1980), presentando los machos una calidad seminal aceptable durante todo el año (Lahlou-Kassi y Marie, 1985; Pérez y Mateos, 1996). En zonas de clima tropical o subtropical, donde las variaciones del fotoperiodo a lo largo del año no son tan marcadas, cobran mayor importancia otros componentes climáticos tales como la temperatura y la humedad relativa (Pérez y Mateos, 1996), y quizás también la disponibilidad de alimento (Walkden-Brown y col., 1994; Pérez y Mateos, 1996).

En el ganado ovino también se ha evidenciado que tanto el comportamiento sexual como la calidad seminal varían en función de la edad y raza (Chemineau, 1986; Aisen 2004), aunque la libido puede estar más condicionada por la estación del año que por la propia edad de los animales (Delgadillo, 2004; Aisen y Venturino, 2004),

Pudiéndose observar que el número de montas, así como de cópulas disminuyen durante semanas e incluso meses fuera de la estación reproductiva. Según Beltrán de Heredia (2009), los parámetros seminales evolucionan de acuerdo a la edad de los animales, es así en los moruecos de la raza rasa aragonesa, donde la concentración espermática a los 9 meses varía entre el 50 y el 75 % de la de los moruecos adultos de 4 años (Folch, 1984), de tal manera que los moruecos adultos presentan mejores resultados de fertilidad y prolificidad que los animales menores de 1 año (Beltrán de Heredia, 2009).

Para Delgadillo y col., (1991), Aisen y Venturino (2004) y Beltrán de Heredia (2009), existen diferencias estadísticamente significativas en las características espermáticas entre razas, tanto cuantitativas (volumen, concentración y número de espermatozoides por eyaculado) como cualitativas (porcentaje de espermatozoides móviles, movimiento progresivo y porcentaje de anomalías). Varios autores concluyen que además hay variabilidad individual en la producción espermática, existiendo además una interacción entre machos y estación, para los distintos parámetros seminales (Delgadillo y col., 1991; Pérez y Mateos, 1996).

Por otro lado, la calidad seminal de los animales domésticos está influenciada también por la actividad sexual o la frecuencia de recogida de esperma (Foote, 1978). Jennings y Mcweeney (1976), en morueco, observan que el volumen de eyaculado, junto a la concentración y el número total de espermatozoides disminuyen significativamente tras eyaculados consecutivos. Asimismo, se presenta una disminución de los movimientos progresivos en eyaculados de machos sometidos a una intensa actividad sexual (Kaya y col., 2002).

Tampoco podemos olvidar que la temperatura del testículo debe ser unos 5 °C inferior a la temperatura corporal. Cuando esto no ocurre como consecuencia del calor, fiebre, estrés, la espermatogénesis se altera, provocando un aumento de las anomalías espermáticas en el eyaculado, disminuyendo la producción y capacidad fecundante, pudiendo llegar a la esterilidad de los moruecos, dependiendo de la intensidad del calor y de la duración en el tiempo que tenga el efecto (Colas, 1980; Delgadillo, 2004; Aisen y Venturino, 2004).

2.6. Uso de implantes de Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona secretada por la glándula pineal del cerebro y participa en una serie de funciones fisiológicas incluyendo el control de la reproducción estacional y también afecta el sistema inmune y los ritmos circadianos (Awad y col., 2006). Los niveles plasmáticos de melatonina en la oveja son basales durante el día, de manera que inmediatamente, pasado unos 10 minutos del inicio de la oscuridad, se elevan hasta alcanzar concentraciones entre 100-500 pg/ml. Estas características determinan que el perfil de secreción de melatonina en periodos de 24 horas sea largo en invierno y corto en verano, de manera que la evolución de la duración del mismo a lo largo del año informa a la oveja del fotoperiodo prevalente (Zarazaga y col., 1998).

Al igual que en las ovejas, en los moruecos, la melatonina presenta un ritmo de secreción circadiano, con concentraciones plasmáticas elevadas durante la noche y disminuidas con la aparición de la luz del día (Lincoln y col., 1982). La variación estacional de los parámetros reproductivos es menos marcada en el morueco que en las ovejas, aunque en estación no reproductiva también se observa una disminución del volumen y del diámetro testicular, deterioro en la calidad del semen, así como una alteración del perfil hormonal (Schanbacher y Lunstra, 1976), afectando el desempeño reproductivo de los moruecos.

Ha sido ampliamente demostrada la capacidad de la melatonina para revertir los efectos de la estacionalidad en la reproducción tanto en machos como hembras (Fitzgerald y Stellflug, 1991; Chemineau y col., 1992; Abecia y col., 2008). El uso de implantes de melatonina en el morueco durante la estación no reproductiva se ha asociado con mejoras en parámetros reproductivos como el diámetro escrotal, la producción y calidad espermática (Palacín y col., 2008). Se conoce

que esta hormona parece ejercer su acción principalmente en el eje hipotálamo-hipofisario (Webster y col., 1991). Recientes estudios han demostrado su presencia y su variación estacional, junto con la testosterona, en el plasma seminal (Casao y col., 2010a), lo que, además de su acción relevante a nivel testicular y de las glándulas accesorias, sugiere también una acción directa sobre la célula espermática (Casao y col., 2010b).

2.7. Plasma seminal

El plasma seminal es un fluido complejo, formado principalmente por compuestos inorgánicos y orgánicos, entre los que se encuentran aminoácidos, ácidos grasos, iones inorgánicos, ácido cítrico, carbohidratos, sales orgánicas, prostaglandinas y proteínas de bajo y alto peso molecular, en el cual se encuentran inmersos los espermatozoides tras la eyaculación. Está constituido por una mezcla de secreciones procedentes de los testículos, del epidídimo y de las glándulas sexuales accesorias, que constituyen más del 90% del eyaculado (próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales; Mann y Lutwak-Mann, 1981). La formación de los diferentes componentes del plasma seminal se producirá según se desarrolle el proceso de maduración del espermatozoide, así en la red testicular se les van adherir varias proteínas de la familia ADAMs (Blobel, 2000) y la hialorunidasa (pH20/2B1) (Seaton y col., 2000) entre otras. Durante su tránsito por el epidídimo, se producirá la remodelación proteica y fosfolipídica de la membrana plasmática espermática con la integración de nuevas proteínas secretadas por el epidídimo, principalmente en la región de la cabeza y el cuerpo (Gatti y col., 2004).

Tras la eyaculación actuarán las distintas secreciones procedentes de la vesícula seminal, próstata y glándulas bulbouretrales. Entre los compuestos secretados por estas glándulas sexuales se encuentran metabolitos energéticos, como fructosa, inositol, ácido cítrico y ácido ascórbico

(Garner y Hafez, 1993); aminoácidos tales como ácido glutámico, carnitina, taurina e hipotaurina; también enzimas protectoras contra sustancias oxígeno reactivas (sustancias ROS), y otras que intervendrán en la digestión de los espermatozoides muertos y dañados, así como en la penetración del ovocito (Strzezek, 2002). Entre los compuestos inorgánicos secretados se hallan principalmente el zinc y el calcio, que actúan como bactericidas y en la capacitación espermática, respectivamente (Strzezek y col., 1987). Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de componentes que posee el plasma seminal, son las proteínas las que contribuyen, de forma más relevante, a la regulación de la mayor parte de las funciones espermáticas. De hecho, las funciones de las sustancias contenidas en el plasma son complejas y parcialmente conocidas, siendo algunas de ellas, la de medio de suspensión, regulación del transporte de los espermatozoides y eliminación de éstos en el órgano

Reproductor de la hembra (Matousek, 1985; Troedsson y col., 2005), prevención de la capacitación prematura y estabilización de la membrana plasmática (Desnoyers y Manjunath, 1992; Villemure y col., 2003), además de mantener el pH y la osmolaridad adecuada en cada especie. Así mismo, también se han descrito funciones como la de proteger a los espermatozoides de la fagocitosis y del proceso inflamatorio en el tracto de la yegua, (Alghamdi y col., 2004), acelerar la ovulación en vacas (Revisado por Juyena y Stelletta, 2012) o incluso inducirla en cerdas y camélidos (O'Leary y col., 2004; Ratto y col., 2005), así como la de asistir a las interacciones de espermatozoide-óvulo (Souza y col., 2008), ayudar a preparar el tracto reproductor materno para la implantación y desarrollo del embrión (Robertson, 2005) o incluso influir sobre la fertilidad (Rozeboom y col., 2000).

Por otra parte, el conjunto de sustancias que componen el plasma seminal y la cantidad producida es específico y altamente variable entre especies. Las especies de eyaculación uterina (verraco, caballo, perro o alpaca) cuentan con eyaculados de mayor volumen que en las especies de eyaculación vaginal (toro, morueco o macho cabrío) (Maxwell y col., 2007). Así mismo, es variable entre individuos de la misma especie, así como entre eyaculados de un mismo individuo, pudiendo variar por diferentes procesos patológicos, estación del año, tipo de alimentación o estado fisiológico del animal (Pérez-Pé y col., 2001a) o incluso variaciones en la composición del plasma seminal de diferentes machos ha sido relacionada con diferentes índices de fertilidad (Killian y col., 1993; Moura y col., 2007).

2.8. Crioconservación de semen ovino

Durante los últimos 50 años, se han desarrollado y perfeccionado numerosas técnicas con objeto de conseguir nacimientos mediante la aplicación de dosis seminales congeladas (Watson, 1979), obteniendo grandes avances en la congelación del semen de toro, mientras que en otras especies, como la ovina, los resultados de fertilidad han sido inconsistentes y extremadamente bajos, como se deduce de la mayoría de estudios publicados (O'Meara y col., 2005; Barbas y Mascarenhas, 2009).

Estos pobres resultados pueden deberse a varios factores. Uno de ellos es el daño que sufren los espermatozoides por el proceso de congelación/descongelación. La disminución de la temperatura produce un daño letal en algunos espermatozoides conocido como shock térmico, provocando alteraciones morfológicas en la membrana plasmática, acrosomal y mitocondrial, (revisado por Aboagla y Terada, 2004), incluso puede llegar a provocar una reacción acrosómica prematura, acortando la vida del espermatozoide y reduciendo su fertilidad (Watson 1995). La

congelación también causa daño celular debido al estrés osmótico y tóxico por las concentraciones molares de los agentes crioprotectores, y daño mecánico debido a la formación y disolución de cristales de hielo (revisado por Aboagla y Terada, 2004). Esta respuesta de los espermatozoides de morueco a los procesos de congelación/descongelación puede variar entre individuos dentro de la misma especie y estación del año (Salamon y Maxwell, 2000), lo que parece ser debido a diferencias en la composición de las membranas.

Por otra parte, la tecnología de la criopreservación del espermatozoide incluye distintas etapas importantes como es la eliminación o no del plasma seminal mediante centrifugación, la dilución del material seminal, la refrigeración, las adiciones del crioprotector, la congelación propiamente dicha, el almacenamiento en envase criogénico y por último la descongelación en el momento de su utilización. El diseño de cada una de estas fases debe ir enfocado a producir el menor daño posible sobre las estructuras y el metabolismo del espermatozoide, siendo de especial importancia la función y arquitectura de la membrana plasmática. La inadecuada adaptación a las etapas citadas anteriormente, así como los cambios que va a sufrir la célula durante tan delicado proceso, van a ser responsables de daños o agresiones que pueden suponer una pérdida de capacidad por parte del espermatozoide para llevar a cabo sus funciones con normalidad (Watson, 1995; Gao y col., 1997). No obstante, se considera que las etapas de enfriamiento, congelación y descongelación (Watson, 1990) y la adición del agente crioprotector (Watson, 2001) son las principales fuentes de daño sobre las células en el conjunto del proceso.

2.9. Refrigeración, congelación y descongelación

En la fase inicial de la refrigeración, previa a la congelación, la temperatura de la suspensión espermática se reduce desde valores fisiológicos hasta valores ligeramente por encima de los 0

°C. Este cambio térmico va a poner de manifiesto la extrema sensibilidad de los espermatozoides, sobre todo, a los descensos bruscos de temperatura, más conocidos como “shock por frío” (Parks, 1997) o a los debidos a la temperatura final alcanzada, denominados como “daño por enfriamiento extremo” (“chilling injury”) (Watson, 1990, 1995). Así, el espermatozoide manifiesta pérdida de la integridad de membrana y de las funciones celulares al ser enfriado rápidamente en el rango de 20 a 0 °C, aunque por lo general, el daño resulta más severo entre 12 y 2 °C (Watson, 1995). Estas alteraciones pueden minimizarse si se utilizan velocidades de enfriamiento muy lentas (< 10 °C/min) hasta cerca de los 4 °C (Parks, 1997). No obstante, este enfriamiento lento también generara lesiones, aunque mucho menos severas y extensas (Watson, 1990).

La sensibilidad al choque térmico varía entre las especies. Es así que algunos componentes, como son los fosfolípidos y los ácidos grasos de la membrana espermática, son importantes en el grado de susceptibilidad de los espermatozoides de las distintas especies al choque térmico (Poulos y col., 1973; Darin-Bennett y col., 1974). De hecho, espermatozoides de toro, cerdo y morueco, conocidos por su elevada susceptibilidad al choque térmico, presentan una elevada ratio entre ácidos grasos poliinsaturados y saturados de aproximadamente 2,5-3,3, mientras que espermatozoides del hombre presentan una ratio de 1. Dicha ratio tiene un efecto significativo en algunas propiedades de los sistemas de membrana y está correlacionado con la sensibilidad del espermatozoide al choque térmico (Poulos y col., 1973).

Otro factor correlacionado con la susceptibilidad del espermatozoide al choque térmico es la ratio colesterol/fosfolípidos, habiéndose observado que una ratio superior a 0,5 confiere una mayor resistencia al choque térmico. De hecho, el colesterol existente en el espermatozoide de

toro y de morueco es la mitad del existente en el espermatozoide del hombre (Darin-Bennett y White, 1977).

El choque térmico resulta de alteraciones en la organización de los lípidos de la membrana del espermatozoide o fases de transición lipídica (Drobnis y col., 1993). A la temperatura fisiológica, los fosfolípidos de membrana están en un estado fluido y sus cadenas de ácidos grasos son flexibles (De Leeuw y col., 1990), mientras que algunos lípidos no-bicapa, asumen una disposición hexagonal, implicados en la formación de un anillo alrededor de las proteínas que integran la membrana (Parks y Graham, 1992). Cuando la temperatura de la membrana disminuye por debajo de la temperatura de transición de cada uno de los fosfolípidos individuales que la componen, éstos sufren la fase de transición termotrópica del estado líquido-cristalino al estado gel, comenzando a juntarse (Quinn, 1989). Concretamente, las cadenas de ácidos grasos toman rigidez y se aíslan en dominios de gel, de los cuales son excluidas las proteínas de la membrana que se concentran en áreas fluidas (De Leeuw y col., 1990). Este fenómeno afecta las funciones de las proteínas, por ejemplo, en los canales proteicos iónicos (Watson, 2000).

Además, durante la fase de enfriamiento hasta 5 °C, se han detectado cambios similares a la capacitación o “criocapacitación”, siendo uno de los procesos responsables de las alteraciones morfofuncionales que sufren las células espermáticas. Este proceso ha sido descrito en los espermatozoides de un gran número de especies como el cerdo (Watson, 1996; Maxwell y Johnson, 1997), ratón (Fuller y Whittinghan, 1996), toro (Cormier y col., 1997), morueco (Gillan y col., 1997) y garañon (Schembre y col., 2002; Thomas y col., 2006).

En el caso de la criocapitación, Green y Watson (2001) propusieron la siguiente secuencia de acontecimientos para explicar su aparición: el enfriamiento del medio en el que se encuentran los espermatozoides produce la desestructuración de la membrana, afectando a los procesos de transporte selectivo de sustancias de la misma, alterando su permeabilidad y provocando un incremento de la concentración intracelular de Ca^{2+} . La acumulación de Ca^{2+} en el medio interno produce la activación de las proteínas-quinasas responsables de desencadenar la cascada de procesos similares a la capacitación. Tanto en la capacitación fisiológica, como en la criocapitación, el resultado final va a ser la desestabilización de la membrana plasmática y la reacción acrosómica (Green y Watson, 2001). Tras la capacitación, el espermatozoide va a sufrir una drástica reducción de su vida útil, y en el caso de los espermatozoides criocapitados una disminución manifiesta de su fertilidad al sufrir dicho cambio fuera del aparato reproductor de la hembra (Green y Watson, 2001; Kaneto y col., 2002). Este fenómeno se agrava en aquellas especies (como el cerdo o el caballo) en los que la hembra presenta celos de larga duración.

En lo que respecta a las fases de congelación y descongelación, las teorías propuestas para explicar el daño celular hacen referencia a las consecuencias de la formación de hielo y a su disolución, las cuales dependen de las velocidades de enfriamiento y calentamiento, respectivamente (Watson, 1995). No obstante, la mayoría de los tipos celulares no sobreviven a la congelación en ausencia de algún agente crioprotector. La incorporación de estas sustancias a la suspensión celular modifica el trazado de la curva, incrementando el porcentaje de supervivencia, en un rango determinado de velocidades de enfriamiento respecto de los valores que se obtienen en su ausencia. Se establece, además, una interacción entre la concentración del crioprotector y la velocidad de enfriamiento, de tal manera que la optimización del proceso,

cuando se añaden altas concentraciones de crioprotector, requiere utilizar velocidades de enfriamiento más rápidas, y viceversa (Watson, 1990).

En moruecos para evitar los efectos adversos del choque frío se emplean velocidades de refrigeración moderadas y homogéneas (-0,1C/min. a -0,5C/min.), las cuales descenden la temperatura del semen de 30 °C a 5°C en periodos de tiempo de una a cuatro horas (Graham, 1978; Fiser y Fairfull, 1984; Vázquez y col., 1986). La velocidad óptima de congelación va a depender del tipo celular; y dentro de los espermatozoides, de la especie de procedencia, oscilando la velocidad óptima de enfriamiento entre -10 y -80 °C/min (Watson, 1995), siendo, por ejemplo, de -30 a -50 °C/min para el del verraco, -50 a -60 °C/min para el del morueco, y -26 a -52 °C/min para el del toro (Woelders, 1997).

Durante la fase de descongelación, también se producen efectos letales en la célula, con lo que la efectividad de una congelación bien llevada, a la práctica, puede quedar anulada si no se realiza adecuadamente la descongelación. Se considera, así, que el verdadero desafío al que se enfrenta la célula en el proceso de criopreservación lo constituye una franja de temperaturas de -15 a -60 °C, la cual afecta negativamente a su integridad, y por la que deben pasar en dos ocasiones, una vez durante el enfriamiento y otra durante la descongelación (Mazur, 1985). La supervivencia al proceso requiere, pues, afrontar con éxito una etapa de congelación y otra de descongelación.

Se han propuesto dos mecanismos dañinos para el proceso de descongelación, asociados a dos situaciones particulares. En primer lugar, si las células se han congelado muy rápidamente, y se produce un calentamiento lento, existirá un fenómeno de “recristalización”, en virtud del cual, los microcristales formados en el interior de la célula tienden a agruparse y a formar cristales de

mayor tamaño, con las consiguientes consecuencias letales (Mazur, 1985). Y, en segundo lugar, células congeladas lentamente, en presencia de un crioprotector penetrante, pueden quedar lesionadas mediante estrés osmótico si se descongelan demasiado rápidamente ante la imposibilidad de que el crioprotector abandone la célula lo suficientemente rápido como para mantener el equilibrio osmótico, con el consiguiente hinchamiento por efecto de la entrada de agua (Watson, 1990). La velocidad de descongelación óptima, por tanto, depende de la pauta de enfriamiento seguida, pero debe representar una situación intermedia entre los dos extremos anteriores, con la que se minimicen los daños que se causen por inapropiadas velocidades de transporte de solutos y agua a través de las membranas, y por el agrupamiento de los microcristales intracelulares de hielo (Hammerstedt y col., 1990).

También se han constatado desestabilizaciones moleculares en el plasmalema a causa del cambio de temperatura, contribuyendo a la aparición de lesiones durante esta fase. Holt y col., (1992), por ejemplo, comprobaron la aparición de alteraciones en la membrana plasmática que se manifestaban sólo durante esta etapa de descongelación, y para las que sugirieron un mecanismo causal basado en el fenómeno de transiciones de fase de los lípidos de membrana, resaltando así la importancia de la descongelación en el ciclo de criopreservación. Se ha propuesto, entonces, que las membranas se desestabilizan inicialmente durante la etapa de congelación, tanto por efecto de las bajas temperaturas como por la exposición a altas concentraciones salinas, y ello resulta en una degeneración postdescongelación, al combinarse nuevamente efectos letales de naturaleza térmica y osmótica (Holt y North, 1994 a).

Además, generalmente durante la conservación, los espermatozoides y las bacterias contaminantes producen metabolitos que pueden reducir el pH del diluyente. El pH interno del

espermatozoide está directamente relacionado con el pH del diluyente y, a su vez, con la motilidad; así cuando el pH del diluyente baja, también la motilidad y el metabolismo espermático bajan (Gadea, 2003). El principal responsable de este descenso en el pH es el ácido láctico producido por el metabolismo glucolítico del espermatozoide y que ha sido también usado como indicador de calidad seminal (Rigau y col., 1996).

Como ya ha sido mencionado previamente, cada uno de los pasos del proceso de crioconservación reduce la viabilidad y aumentan los fallos en la funcionalidad de los espermatozoides supervivientes (Parinaud y col., 1997; Chatterjee y Gagnon, 2001; Kankofer, y col., 2005) que disminuyen su potencial fecundante. Estos daños son también debidos, en parte, al estrés oxidativo (Alvarez y Storey, 1992; O'Flaherty y col., 1997; Chatterjee y Gagnon, 2001) como ha sido demostrado en espermatozoides de hombre (Aitken, 1999; Agarwal y col., 2003), de caballo (Baumber y col., 2000; 2003), de morueco (Peris y col., 2007), de toro (Bilodeau y col., 2001; Bilodeau y col., 2002; Nair y col., 2006) y de gato (Thuwanut y col., 2008).

El estrés oxidativo es provocado por la formación de gran cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) o moléculas que contienen radicales libres, debido a un mecanismo antioxidante deteriorado (Sikka, 2001; Agarwal y col., 2003). Las principales ROS que se conocen y que tienen relación con la funcionalidad espermática son el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el peroxil ($ROO\bullet$) y la mayoría de los radicales hidroxilos ($OH\bullet$), cuya presencia en el ambiente espermático se relaciona con el aumento de espermatozoides muertos (Peris, y col., 2007).

De hecho, el estrés oxidativo es una situación celular generalmente caracterizada por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de barrido de los antioxidantes. Cuando

la producción de ROS excede el sistema de defensa antioxidante disponible, se produce el daño oxidativo en los orgánulos del espermatozoide a través del daño de lípidos, proteínas y ADN, así como se producen aldehídos citotóxicos como el malondialdehído (MDA) que acaban finalmente con la muerte del espermatozoide (Bucak y col., 2009). Normalmente la liberación espontánea y controlada de moléculas de oxígeno favorece las bajas concentraciones de ROS y está fisiológicamente implicada en el mantenimiento de la capacidad fecundante del espermatozoide (Álvarez y Storey, 1982, 1984). Este sistema está formado por glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GSHPX), catalasa (CAT), superóxido mutasa (SOD) y quelantes de metales (transferrina, lactoferrina y ceruloplasmina), sistema descrito como mecanismo de defensa contra la peroxidación de lípidos en semen, importante para el mantenimiento de la motilidad y viabilidad espermática (Bilodeau y col., 2001; Gadea y col., 2004). Sin embargo, esta capacidad antioxidante puede ser insuficiente para prevenir la peroxidación de lípidos durante el proceso de congelación/descongelación o verse reducida por efecto de la dilución del semen, ya que el plasma seminal también interviene en el mantenimiento del equilibrio entre la generación de ROS y su neutralización.

En trabajos realizados con eyaculados de morueco, se observa que tras el proceso de congelación y descongelación solamente entre el 40 y 60 % de los espermatozoides preservan su motilidad, aunque apenas un 20-30% se mantienen biológicamente íntegros. Esto es indicativo de que la motilidad y la estructura del espermatozoide se afectan en distinto grado, desconociéndose si las alteraciones se producen simultáneamente o en distintas fases del proceso de congelación y descongelación (Salamon y Maxwell, 1995).

3. Metodología

3.1. Ubicación y caracterización del área experimental

El estudio se realizó en la unidad de producción Siete Colores, ubicada en el sector “anillo vial occidental” sobre la vía que conduce del municipio de Los Patios al municipio del Zulia (Norte de Santander). Es una zona agroecológicamente caracterizada como bosque seco tropical, aproximadamente a 410 msnm, una temperatura promedio de 30°C, con precipitaciones medias por año entre 560 y 810 mm, repartidas en dos picos de lluvias bajo un patrón de estructura bimodal; siendo realizada la parte experimental de este ensayo durante la época seca y cálida en un periodo comprendido entre los meses de septiembre y octubre de 2019.

Una vez recolectado el semen se cuantifico el volumen y la concentración espermática por medio de un espectrofotómetro (Accuread®, IMV).

3.2. Características y manejo de las unidades experimentales

Se utilizaron muestras seminales recién colectadas de cuatro ovinos Dorper White genéticamente probados con edades que oscilan entre los dos y tres años, los animales se manejaron bajo el mismo régimen de alimentación (pasto estrella fresco *ad libitum*, heno y alimento concentrado), esta dieta cumple con los requerimientos nutricionales para obtener un muy buen desempeño reproductivo (imagen 1).



Imagen 1. Machos empleados para colecta del semen

3.3. Colecta y procesado del semen

Los eyaculados fueron colectados durante las horas de la mañana ya que durante este tiempo se presentan las temperaturas más bajas minimizándose el estrés calórico de los animales y aprovechando el pico de testosterona de la madrugada (Senger, 2006), la colecta se realizó a través de una vagina artificial (Walmur®, Porto Alegre, RS, Brasil) con agua precalentada a 45 °C, dos veces al mes durante un periodo de dos meses (imagen 2).



Imagen 2. Colecta del semen a través de vagina artificial.

Una vez obtenido el semen y realizada la evaluación de rutina, las muestras clasificadas como idóneas para la evaluación, se preservaron a 37°C, mientras se realizaron las evaluaciones previas.

3.4. Preparación de los medios de preservación

Para la preparación de los medios de preservación a evaluar se colocó en un tubo falco 2 ml de agua destilada, una pastilla de metformina de 850mg y se homogenizo la mezcla. Una vez llegaba la muestra seminal al laboratorio previamente diluida 1:1 en AndroMed®, se tomaba un vial y se agregaban 1500 µl del diluyente comercial, 100 µl de la muestra y la cantidad de metformina correspondiente a cada tratamiento, preparada previamente, las muestras se llevaban a refrigeración y se analizaban teniendo en cuenta los tiempos establecidos previamente (0, 24, 48 y 72 horas).

3.5. Análisis de laboratorio

3.5.1. Características macroscópicas (Volumen, color, aspecto)

Inmediatamente después de colectado el semen, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de reproducción de la universidad Francisco de Paula Santander, sede Cúcuta. En donde se encontraban los tubos colectores graduados debidamente esterilizados, protegidos de cambios bruscos de temperatura y de la incidencia de los rayos del sol. La lectura del volumen se hacía directamente en estos tubos de colección y la medida se expresaba en mililitros (mL).

En estos mismos recipientes colectores atemperados se observaba el color y aspecto del eyaculado, descartando aquellas muestras con colores rojizos, pardos, grises o con presencia de

flóculos de pus, así como las que tuvieran olores derivados de fluidos o excrementos del animal (fecales y/o pútridos), que denotaran contaminación de las muestras seminales.

3.5.2. Características microscópicas

Vitalidad espermática. Se colocaron sobre un portaobjetos 10 μ l de la muestra + 10 μ l de la tinción Eosina-Negrosina, se homogenizo la muestra y se realizó el frotis, posteriormente se dejaron secar durante 15 minutos. Las muestras fueron analizadas en un microscopio óptico, con objetivo de 100X y se clasificaron como espermatozoides vivos aquellos que no presenten coloración, se hacía énfasis en los espermatozoides muertos con membranas plasmáticas permeables que se teñían, y sus cabezas se observaban de color rosado; los vivos en cambio, presentaban sus membranas plasmáticas intactas, no permeables y no permitían el paso del colorante observándose de color claro blanco. Se contabilizaron un total de 100 espermatozoides por muestra.

Análisis de la motilidad espermática mediante programa computarizado (CASA).

El análisis se realizaba tomando 5 μ L de cada alícuota seminales y se colocaban en el Sperm Track 20®. Posteriormente, se capturaban los espermatozoides en movimiento en un microscopio de contraste de fases a 200X de aumento con el fin de guardarlos como imágenes digitalizadas. El lente del colimador en contraste de fases positivo era ajustado en la posición ph2. Los parámetros a evaluar fueron: motilidad en función de la progresividad (progresivos, no progresivos, estáticos) y motilidad en función de la velocidad (rápidos, medios, lentos, estáticos).

El sistema CASA empleado está basado en el análisis de imágenes fotografiadas y digitalizadas, tomadas en un lapso de 0,64 segundos, lo cual implica un tiempo de captura de

imágenes de 40 milisegundos. Por cada muestra de semen evaluado serán tomados como mínimo 2 fotografías, contabilizándose como mínimo 300 células espermáticas.

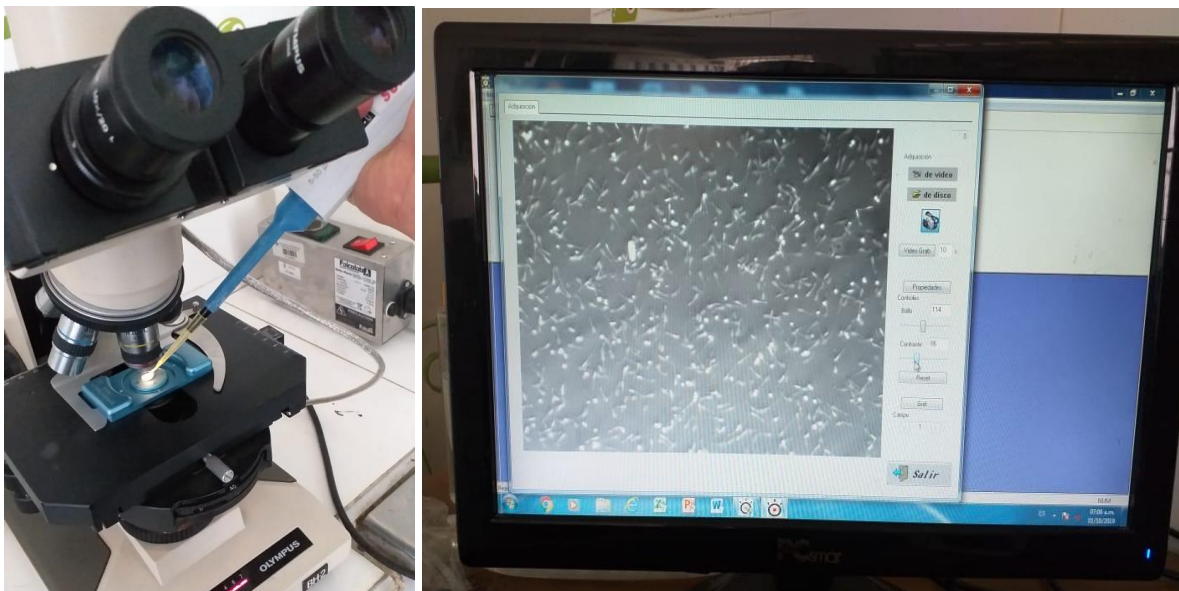


Imagen 3. Capturas de células espermáticas con el software ISAS V 1.2. Fuente: Autores, 2019.

3.6. Metodología estadística

El presente trabajo se desarrolló bajo un modelo estadístico factorial con igual número de repeticiones; para el caso, se realizaron 16 tratamientos (cuatro diluyentes para preservación de semen ovino, de los cuales uno es comercial (T1 AndroMed®) y tres contiene diferentes concentraciones de metformina (T2: 2.5mg; T3: 5mg; T4: 10mg)) y cuatro horas diferentes de refrigeración del semen (0, 24, 48 y 72 horas), que se aplicó sobre las unidades experimentales (eyaculados), evaluando el efecto de los tratamientos sobre las variables objeto de estudio.

Todos los datos grabados fueron analizados por SAS/ Statistical Analysis Systemsoftware 8.2, para Windows (SAS Inst. Inc.; Carry, NC. USA. 2002). La Normalidad de los datos fue evaluada por el estadístico de Shapiro-Wilk (W). Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Para cuantificar el efecto de la metformina (0, 2.5, 5 y 10 mg), y las horas de refrigeración (0, 24, 48 y 72) sobre las variables dependientes evaluadas de calidad seminal (vitalidad y motilidad) siendo expresados en valores porcentuales (%). Cuando se encontraron diferencias entre las medias, se cuantifico el efecto mediante el procedimiento de Diferencias Mínima Significativa (DMS) y la prueba Tukey con un nivel de significancia mínimo exigido fue de $P < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Análisis computarizado de la motilidad espermática.

Los resultados de la motilidad espermática de cada uno de los tratamientos (niveles de metformina) y las horas de experimentación se muestran en el cuadro 1, tomando en consideración su clasificación en cuanto a la motilidad progresiva de los espermatozoides evaluados mediante el sistema CASA.

La variable macho (4 animales) no presentó diferencias significativas ($P \geq 0.05$) y se determinó excluir este factor. En cuanto en la inclusión de metformina no se observaron diferencias significativas ($P \geq 0.05$) entre los tratamientos en las variables de motilidad espermática en función de la progresividad.

Cuadro 1. Motilidad espermática evaluada mediante el CASA en función de la progresividad de los espermatozoides de ovinos (Media \pm Desviación estándar), Fuente: Autor, 2019

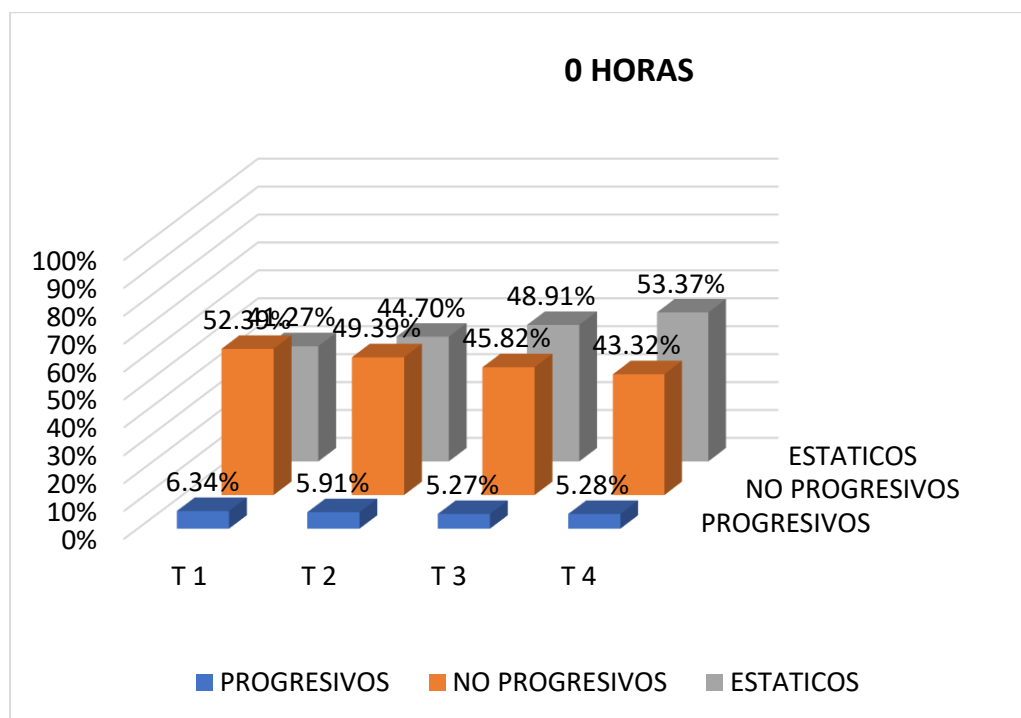
			T1	T2	T3	T4
Progresivos	Sig	Horas				
		0 H	6.34 \pm 0.55 ^a	5.91 \pm 0.73 ^a	5.27 \pm 0.59 ^a	5.28 \pm 0.38 ^a
	P \leq 0.01	24 H	3.92 \pm 0.68 ^b	5.16 \pm 0.71 ^a	4.01 \pm 0.56 ^b	3.38 \pm 0.86 ^b
		48 H	2.48 \pm 0.53 ^c	1.63 \pm 0.12 ^b	3.11 \pm 0.95 ^c	1.66 \pm 0.21 ^c
		72 H	1.82 \pm 0.42 ^d	1.45 \pm 0.26 ^b	2.44 \pm 0.57 ^c	1.53 \pm 0.45 ^c
No progresivos	Sig	Horas				
		0 H	52.39 \pm 2.59 ^a	49.39 \pm 2.33 ^a	45.82 \pm 2.60 ^a	43.32 \pm 2.61 ^a
	P \leq 0.01	24 H	30.08 \pm 2.05 ^b	36.42 \pm 2.16 ^b	35.43 \pm 1.96 ^b	30.93 \pm 1.90 ^b
		48 H	21.70 \pm 1.57 ^c	30.32 \pm 2.08 ^b	26.78 \pm 1.71 ^c	24.47 \pm 1.83 ^c
		72 H	14.09 \pm 1.25 ^d	18.96 \pm 1.62 ^c	17.06 \pm 1.30 ^d	15.36 \pm 1.20 ^d
Estáticos	Sig	Horas				
		0 H	41.27 \pm 2.83 ^a	44.70 \pm 2.75 ^a	48.91 \pm 2.90 ^a	53.37 \pm 2.85 ^a
	P \leq 0.01	24 H	66.00 \pm 2.37 ^b	58.42 \pm 2.57 ^b	60.56 \pm 2.35 ^b	63.79 \pm 2.39 ^b
		48 H	75.82 \pm 1.89 ^c	68.30 \pm 2.17 ^c	70.77 \pm 2.05 ^c	73.96 \pm 1.98 ^c
		72 H	84.09 \pm 1.60 ^d	79.41 \pm 1.79 ^d	79.83 \pm 1.75 ^c	83.04 \pm 1.49 ^d

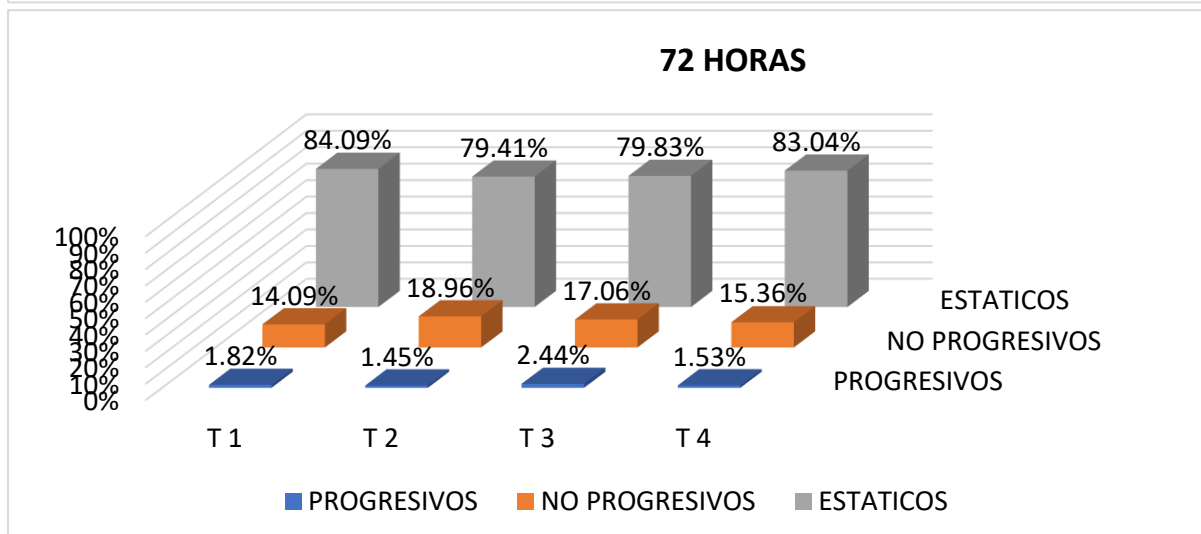
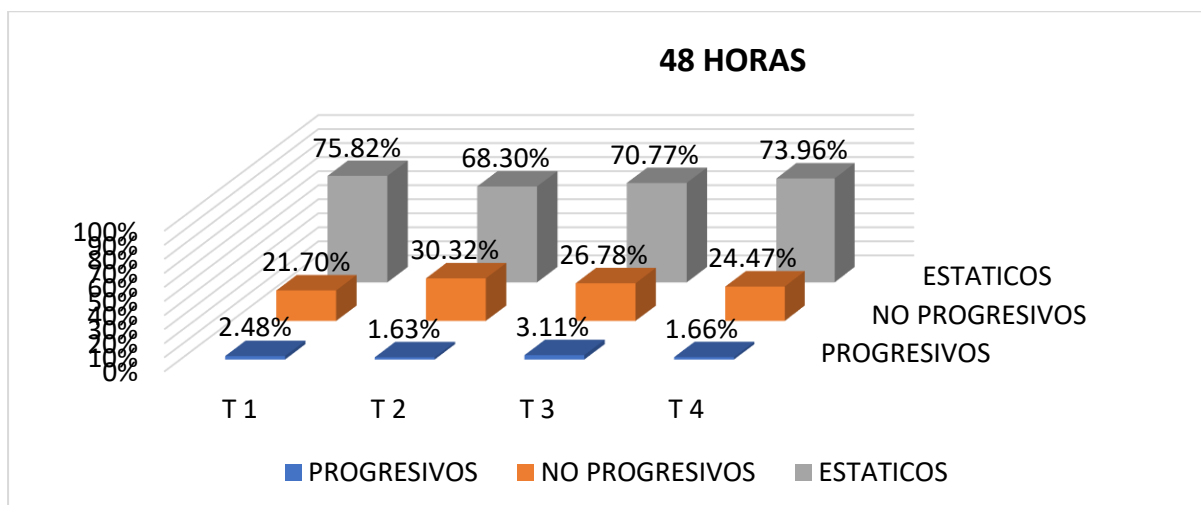
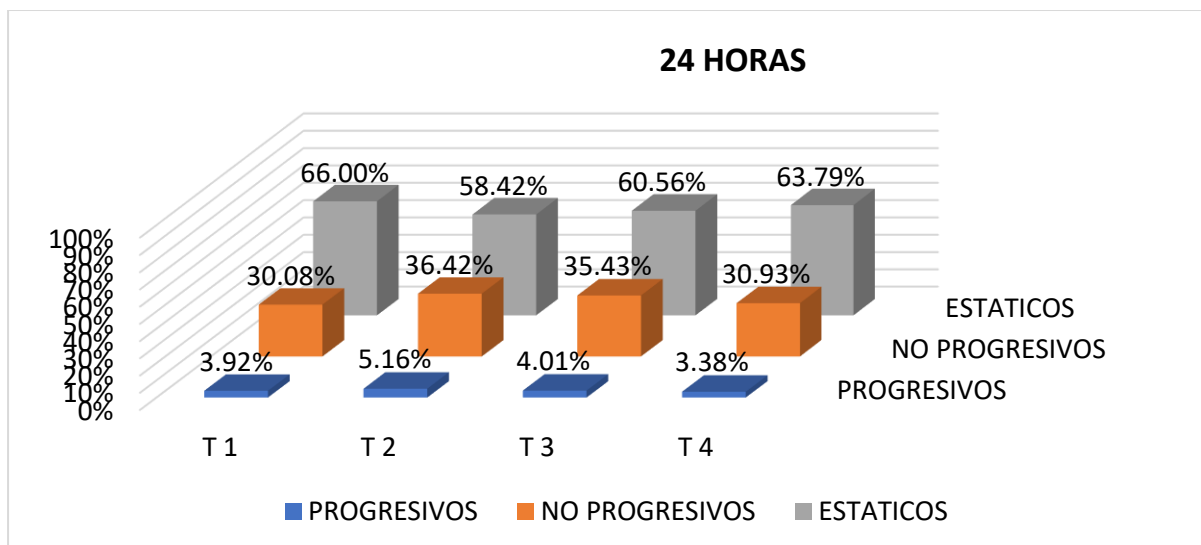
(a,b,c,d): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La ubicación de las letras va del valor favorable (a) al desfavorable (c-d).

En el cuadro 1. Se observa como los valores para el tratamiento T2 y T3 son los que tiene menores pérdidas en los espermatozoides progresivos a las 24 H, aunque el mejor tratamiento

después de las 48 H es T3 y se mantiene con los mejores valores hasta las 72 H, teniendo en cuenta lo anterior, se presenta un comportamiento similar en los espermatozoides no progresivos y estáticos.

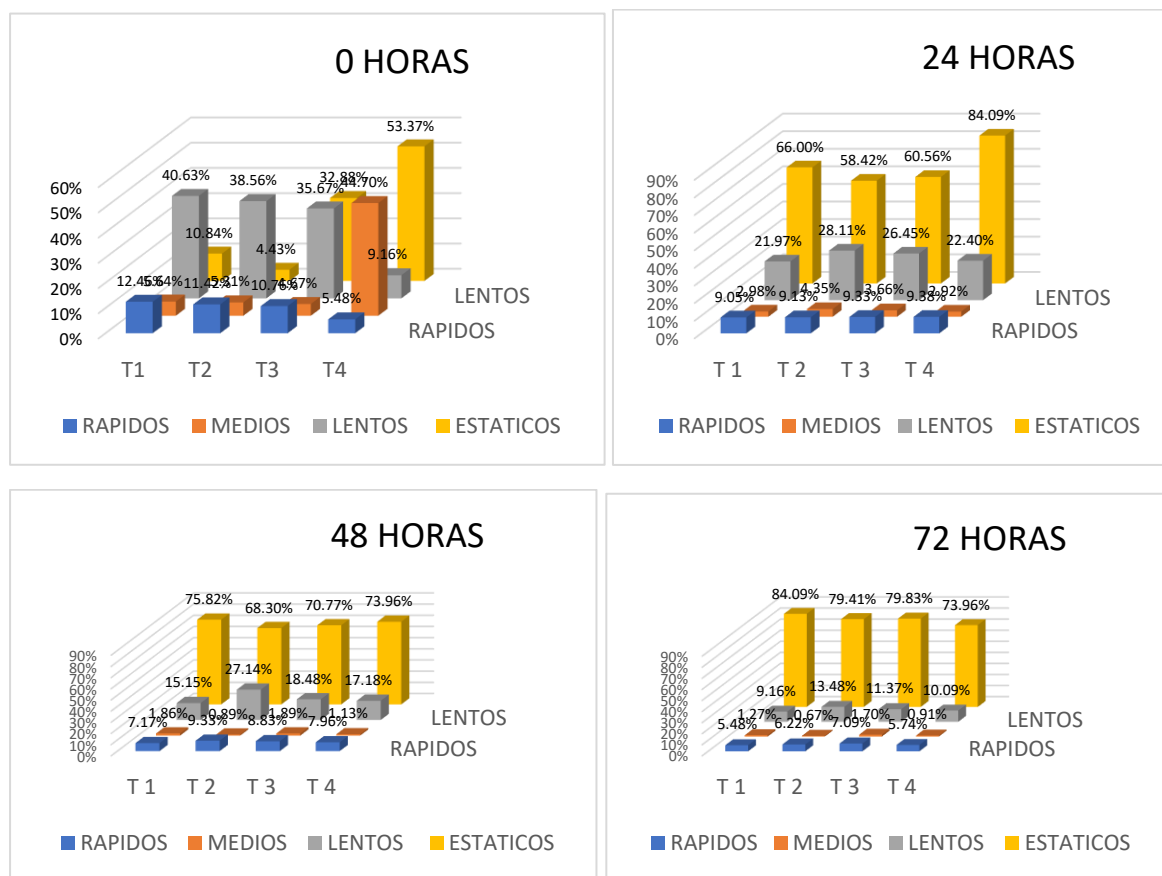
Al observar el cuadro 2. Los porcentajes de pérdidas de las células espermáticas se tiene en cuenta los descensos empezando en espermios progresivos, seguido con no progresivos hasta que terminan como estáticos, en cuanto a T3 en células progresivas presentan las menores pérdidas con un 40.98%.





(a,b,c,d): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La ubicación de las letras va del valor favorable (a) al desfavorable (c-d).

En la motilidad espermática se evaluó también, con base a los patrones de velocidad, tomando en consideración el porcentaje de espermatozoides que se mueven de manera rápida, media, lenta o estática (espermatozoides inmóviles). Obteniendo a través del sistema CASA, la estimación de los patrones de movimiento para los niveles de metformina comparados con las diferentes horas de evaluación. En el cuadro 3. Se muestran las velocidades espermáticas, para los espermios rápidos el T3 termina a las 72 H con mejores valores, seguido de T2, en los medios es T3 seguido de T1, en lentos T2 seguido de T3 y en células espermáticas estáticas T2 es igual que T3. Sin embargo, los espermatozoides que tiene las características de rápidos y medios son los que pueden ser útiles para la fecundación.



Grafica 2. Motilidad espermática evaluada mediante el CASA en función de la velocidad de los espermatozoides de Ovino. Fuente: Bolaños, 2019.

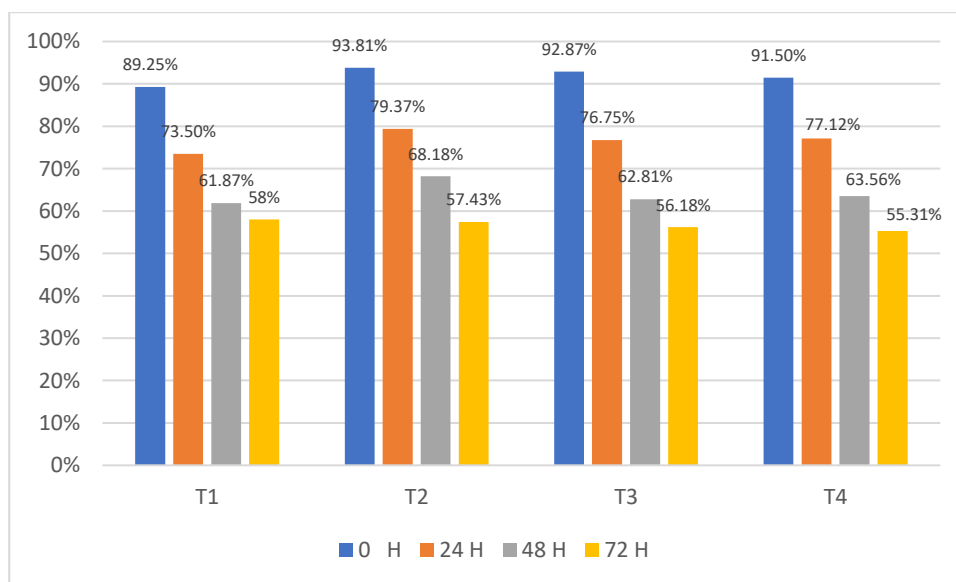
4.2. Análisis de la vitalidad espermática.

Cuadro 4. Comparación de las medias de vitalidad espermática (%) (Media \pm Desviación estándar), Fuente: Autor, 2019.

Sig	Horas	T1	T2	T3	T4
		P \geq 0.05			
Vitalidad	0 H	89.25 \pm 3.8 ^a	93.81 \pm 4.2 ^a	92.87 \pm 5.1 ^a	91.50 \pm 5.5 ^a
	24 H	73.50 \pm 1.3 ^b	79.37 \pm 1.8 ^b	76.75 \pm 1.6 ^b	77.12 \pm 1.3 ^b
	48 H	61.87 \pm 2.4 ^b	68.18 \pm 1.9 ^{bc}	62.81 \pm 2.2 ^c	63.56 \pm 2.2 ^{bc}
	72 H	58.00 \pm 1.5 ^c	57.43 \pm 1.4 ^c	56.18 \pm 1.5 ^c	55.31 \pm 1.6 ^c

(a,b,c): Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$). La ubicación de las letras va del valor favorable (a) al desfavorable (b-c).

En el cuadro 4. Se observa los porcentajes de vitalidad de los espermatozoides a medida que pasan las horas en los diferentes tratamientos, existiendo una tasa muy similar de mortalidad a través que pasan las horas en los valores presentados en el estudio.



Grafica 3. Comparación de los porcentajes de vitalidad espermática niveles de metformina versus las horas de estudio. Fuente: Bolaños, 2019

5. Discusión

Durante el proceso de refrigeración, las células espermáticas sufren de estrés oxidativo en la membrana cuando se inicia el descenso de temperatura, los daños son irreversibles en la gran parte de los organelos y se observan cambios en la actividad enzimática dando como resultado una reducción en la motilidad (Bucak et al., 2009, allai et al., 2015). Según Tuncer et al., (2010) el semen refrigerado es oxidado más fácilmente y la capacidad antioxidante intracelular se disminuye después del cambio de temperatura.

Las mitocondrias que generan los ATP recubren el axonema y las fibras asociadas de la pieza intermedia, y son las encargadas de la motilidad espermática. Según los estudios de Meneses et al., (2015) la metformina es considerada un antioxidante que actúa en defensa de las injurias causadas en las membranas celulares por acción de los radicales libres (ROS).

Sin embargo, el aumento de la concentración de ROS es inevitable como consecuencia de las condiciones aerobias de las muestras seminales (Agarwal et al., 2005). Los espermatozoides ovinos son muy sensibles a la peroxidación lipídica, como consecuencia de la oxidación de los lípidos de la membrana por las moléculas de oxígeno siendo reducidas a superóxido, peróxido de hidrogeno y radicales hidroxilos (Gadea, 2004; Aziz et al., 2004). Esto último causa una inhibición de la fructólisis y la respiración, daño estructural y pérdida de la motilidad de las células (Arando et al., 2019).

Según lo descrito por Onken et al., (2010) la metformina tiene la capacidad de activar el factor de transcripción Nrf2 y subsecuentemente los genes antioxidantes de la célula. En el citoplasma, hace que se disminuya la actividad del complejo mitocondrial I, formando de esta manera los

ROS menos reactivos. Adicionalmente, estudios realizados por Zhou et al. (2001), describieron como se activa el AMP a AMPK (proteína quinasa), el cual se convierte en un regulador del balance energético en la célula, cambiándola de un estado catabólico a un estado anabólico.

Hurtado de Lleras et al., (2012) encontraron que la AMPK está involucrada en la fisiología espermática y en especial en la motilidad, logrando buenos resultados en fertilización in vitro en ratones.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo la disminución de la temperatura y su mantenimiento constante hasta las 72 horas, causo los daños graduales y pérdidas en la motilidad espermática en el semen ovino refrigerado, lo cual se evidencia en los valores presentados en los diferentes tratamientos. Por otra parte, la inclusión de metformina a niveles de 2.5 y 5 mg, mejoró la presencia de espermios progresivos y por ende la presencia de células espermáticas clasificadas como rápidas y medianamente rápidas lo que concuerda con el estudio desarrollado por Bertoldo et al., (2014) en el cual, a través de la adición de metformina al semen de ratón, lograron buenos resultados en los parámetros de motilidad y morfología espermática.

En cuanto a la variable de vitalidad espermática trabajada en la investigación, el tratamiento control presento un índice de mortalidad celular igual a los tratamientos que tenían adición de metformina; por lo tanto, a pesar de que los estudios de Loft et al., (2003) y Bosman et al., (2014), describieron como éste antioxidante protege a la célula espermática y logra mantener la supervivencia de los espermios, en la presente investigación, el uso o no uso del producto en el parámetro de conservación y protección de los espermatozoides ante procesos apoptóticos y de muerte, no difirió.

Para que un diluyente se considere exitoso debe preservar la motilidad de los espermatozoides y las funciones metabólicas (Hernández-Corredor et al., 2018), por cuanto el crioprotector puede considerarse como el factor que puede conllevar a la intoxicación de las células espermáticas al momento de la inseminación. Teniendo en cuenta que en la presente investigación, el semen solo se refrigeró a 5 °C, el glicerol que es el crioprotector del medio utilizado en el estudio, pudo aumentar la concentración de solutos y de esta manera afectar los procesos metabólicos en el semen de ovino (Aboagla y Trade, 2004). Con esta condición se puede explicar el daño sufrido en la evaluación del uso de metformina como coadyuvante en el proceso de refrigeración de semen ovino, ya que se observó que muy a pesar que éste antioxidante logara su objetivo el glicerol del diluyente pudo aumentar el daño de los espermios.

Es de resaltar que la interacción entre los diluyentes y los antioxidantes han mejorado las variables espermáticas después de la preservación con refrigeración o por congelación (Mata-Campusano et al., 2015, Mojtaba et al. 2019).

6. Conclusiones

El uso de antioxidantes permite proteger a las células espermáticas de los cambios bioquímicos en los procesos fisiológicos que se presentan en los métodos de conservación seminal.

En la investigación, los tratamientos no presentaron diferencias significativas en los niveles de inclusión de la metformina; se presentaron diferencias a las horas de conservación de los espermatozoides para las variables de progresividad y motilidad espermática a través de los parámetros del CASA.

En la presente investigación, el estudio de vitalidad de los espermatozoides, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos de inclusión o no del antioxidante metformina ni diferencias estadísticas para las horas de conservación.

Se puede concluir que los tratamientos T2 (2.5 mg) y T3 (5 mg) con inclusiones de metformina tienen una leve tendencia a presentar mejores resultados para la motilidad, progresividad y vitalidad espermática en el presente estudio.

7. Recomendaciones

Se recomienda proponer más trabajos de investigación empleando otras razas ovinas con el fin de obtener un referente que se constituya en la base de nuevos estudios. Igualmente, se recomienda trabajar con otros diluyentes realizando evaluaciones cada 6 horas.

Evaluar morfometría espermática bajo las mismas pautas de la presente investigación con el fin de observar los posibles cambios en las medidas de la cabeza de los espermatozoides ovinos.

Investigar el uso de diferentes crioprotectores (DMSO, PVP, SUCROSA) y diluyentes con base a yema de huevo y lipoproteína de soya teniendo en cuenta su interacción con la metformina.

Continuar investigando sobre la función que ejerce la metformina sobre las células espermáticas de ovino.

Estudiar el efecto de la inclusión de metformina en semen en las diferentes especies domésticas.

Evaluar la metformina como antioxidante en medios de preservación alternativos como en los que se emplea agua de coco y citrato de sodio para analizar si los daños estructurales y funcionales de las células espermáticas disminuyen.

Referencias Bibliográficas

- Aguado, M.J.; Garcia-Cervigon, M.; Manso, A.; Perez-Guzman, M.D.; Garde, J.; Montoro, V. (1998) – Estudio preliminar del poder fecundante del semen de ovino manchego. N° XXIII-SEOC. pp: 521-524.
- Aguado, M.J.; Garde, J.; Perez-Guzman, M.D.; Montoro, V.; Vázquez, I. (1994) - Variaciones estacionales de la crioresistencia del semen de morueco Manchego. Producción ovina y caprina. N° XIX-SEOC. Burgos, España. pp: 507-509
- Aisen, E. G.; Veturino, A. (2004) – Recolección y evaluación del semen. En Reproduccion ovina y caprina. Ed. Aisen, E. Inter-Medica. Buenos Aires, argentina. pp. 55-69.
- Aisen, E.; Quintana, M.; Medina, V.; Morello, H.; Venturino, A. (2005) - Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology.*, 50: 239–249
- Aisen, E.G.; Medina, V.H.; Venturino, A. (2002) - Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trealose concentrations. *Theriogenology.*, 57: 1801-1808.
- Alonso de Miguel, M.; Cognié, Y. (1980) - Variaciones de la actividad sexual de la oveja «Rasa Aragonesa» durante el período del anoestro estacionario. Efecto de la edad, de las condiciones climáticas y, de la presencia de machos. IX Congreso Intern. de Reprod. Anim. e IA, Madrid, 16-20 de junio, Vol. IV: 387-392
- Álvarez, M.; Kaabi, M.; Boixo, J.C.; Anel, E.; Chamorro, C.A.; Martínez, S.; Anel, L. (2000) - Características seminales de las razas ovinas Churra y Assaf. SEOC, Teruel, España. pp: 567-569.
- Arévalo, A.; Correa G. 2013. Tecnología en la ovinocultura colombiana: estado del arte. *Revista Ciencia Animal.* 6:125-142.

- Avellanet, R.; Arangune-Méndez, J.A.; Jordana, J. (2005) – La raza ovina Xisqueta en España: Caracterización estructural de las explotaciones. Boletín de información sobre Recursos Genéticos Animales., 37: 21-30.
- Barrio, F.; Peña, A.I.; Quintela, L.A.; Herradóm, P.G. (1995) - Influencia del factor individual sobre las características espermáticas de la raza ovina Gallega. Producción ovina y caprina. Nº XX-SEOC. Madrid, España.127-130.
- Barrios, B.; Pérez-Pé, R.; Gallego, M.; Tato, A.; Osada, J.; Muino-Blanco, T.; Cebrián- Pérez, J.A. (2000) - Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod.*, 1531-1537.
- Barrios, C. E. (2006) Elección de la raza en la granja ovina. ASOOVINOS
- Barrios, M. (2007). Guía práctica de ovinocultura enfocada hacia la producción de carne. Bogotá D.C. : bacom ltda.. Empresa del sector agropecuario y ambiental- rancho de la oveja – granja demostrativa de ovinos
- Beltrán de Heredia, I. (2009) – Reproducción y control reproductivo en el macho. En Ovinotecnia (Producción y Economía de la Especie). Eds: Sañudo, C.; Cepero Briz, R. Prensas Universitarias de Zaragoza. Zaragoza, España. pp: 105-114.
- Bertoldo, M. J., Guibert, E., Tartarin, P., Guillory, V., & Froment, P. (2014). Effect of metformin on the fertilizing ability of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 68(2), 262-268.
- Blanco, O.M. (1998) - Análisis objetivo de la motilidad espermática: evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Murcia, España.

- Bosman, E., Esterhuizen, A. D., Rodrigues, F. A., Becker, P. J., & Hoffmann, W. A. (2015). Effect of metformin therapy and dietary supplements on semen parameters in hyperinsulinaemic males. *Andrologia*, 47(9), 974-979.
- Bravo, J. (2010) - Estudio de la influencia de la estación sobre los parámetros seminales y morfométricos del espermatozoide del morueco de la raza Ile de France. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura, España
- Bravo, J.A.; Roy, T.J. (2003) - Influencia de los implantes de melatonina sobre las características espermáticas y actividad sexual del morueco en estación no sexual. N° XXVIII-SEOC. Badajoz, España. pp: 152-159.
- Buffoni, A. (2013) - Efecto de los implantes de melatonina sobre los rendimientos en la obtención de embriones in vivo, la calidad seminal y la actividad reproductiva de ovinos en la región patagónica argentina. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, España. 163
- Bulla, A (2014) Comparación de indicadores productivos en sistemas de producción ovina y bovina. Facultad de ciencias agropecuarias. Programa de Zootecnia. Universidad de La Salle. Bogotá, Colombia
- Espinal, C.; Martínez, H.; Amézquita, J. (2006) La cadena ovinos y caprinos en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo no. 125
- Fourie P, Neser F, Olivier J, Westhuizen C (2002) Relationship between production performance, visual appraisal and body measurements of young Dorper rams. *South African Journal of Animal Science* 32, (4).
- García R. M. (1988). Sanidad Ganadera. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 158 pp.

- González-Garduño, R.; Torres-Hernández, G.; Arece-García, J. 2010. Comportamiento productivo y reproductivo de ovinos Pelibuey en un sistema de pariciones aceleradas con tres épocas de empadre al año. *Zootecnia Tropical* 28(1):51-56.
- Instituto colombiano agropecuario ICA. (2015) Censo pecuario nacional. Obtenido de <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b9cdbfb07fcac/Censos2008.aspx>
- Lopez C, Ramirez R.G, Aguilera-Soto J.I, Aréchiga C.F, Rodriguez H. (2010) Size and shape analyses in hair sheep ram lambs and its relationship with growth performance. *Livestock Science* 131, 203-211
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. (2010). La cadena Ovinos y Caprinos en Colombia. Bogotá D.C.
- Moreno, D., & Grajales, H. (2008). *Apreciación del estado actual de la producción ovina y caprina: Sistema de Producción de Pequeños Rumiantes*. . Bogotá, Colombia.: D.P.A – F.M.V.Z Universidad Nacional de Colombia No 142.
- Morgante, G., Tosti, C., Orvieto, R., Musacchio, M. C., Piomboni, P., & De Leo, V. (2011). Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertility and sterility*, 95(6), 2150-2152.
- Romero, O., Bravo, S. (2012). Fundamentos de la producción ovina en la Región de la Araucanía. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, 24-38. • Rooyen I, Fourie P, Schwalbach L (2012) *South African Journal of Animal Science* 5 (1).
- Salazar, C. O. 2015. Evaluación de la implementación de Buenas Prácticas Pecuarías en la producción de ovinos y caprinos en la zona metropolitana de los municipios de Bucaramanga y Lebrija. [Trabajo de grado Maestría]. Universidad de Manizales Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas; Manizales, Colombia.

- Salazar, O.L., (2015) Evaluación de la implementación de buenas prácticas pecuarias en la producción de ovinos y caprinos en la zona metropolitana de los municipios de Bucaramanga y Lebrija. Facultad de Ciencias Contables Económicas y Administrativas de la Universidad de Manizales. Manizales, Colombia.
- Sandoval-Castro., A.; Sarmiento-Franco.; ; Santos-Ricalde.; Ronald, H. 2013 ¿Qué son y cuál es el papel de las especies menores? *Bioagrobiencias*, 6(2):51-56
- Scanlon T, Almeida A.M, Burgel A, Kilminster T, Milton J, Greeff J, Oldham C. (2013) Live weight parameters and feed intake in Dorper, Damara and Australian Merino lambs exposed to restricted feeding. *Small Ruminant Research* 109, 101- 106
- Steinfeld, H.; Gerber, P.; Wassenaar, T.; Castel, V.; Rosales, M.; Haan, C. 2009. La larga sombra del Ganado, problemas ambientales y opciones. FAO – LEAD – FIDA. Roma, 493 p
- Upegui, M (2011) Sistema de producción mixto ovino-bovino aplicado en el predio el porvenir (Región del Tolima) con el fin de mejorar la rentabilidad de la explotación. Universidad de ciencias aplicadas y ambientales UDCA, facultad de zootecnia, Bogotá
- Vargas, V.E., Estrada, A., Hernández, S et al. (2011) Guía práctica para pequeños productores ovinos. Tunja, Colombia
- Vega Pérez, C. A., Grajales Lombana, H. A. y Afanador Téllez, G. (2014). Prácticas ganaderas en sistemas de producción en ovinos y caprinos: desafíos para el mejoramiento de la competitividad del sector en Colombia. *Revista Ciencia Animal* (8), 41-65
- Vivas, N (2013) Diversidad genética de ovinos criollos colombianos. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias agropecuarias. Coordinación general de Posgrados, Palmira.

Yan, W. J., Mu, Y., Yu, N., Yi, T. L., Zhang, Y., Pang, X. L., ... & Yang, J. (2015). Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(7), 1097-1104.