

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



**EVALUACION DE LOS DILUENTES PARA
CONGELAR SEMEN DE BORREGO PELIBUEY**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A:**

MARIO ALBERTO ACUÑA AGUILAR

Asesor: M.V.Z. M.Sc. Mario Valencia Zarazúa

1 9 8 2



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Pág.
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Material y Métodos.....	8
Resultados y Discusión.....	17
Conclusiones.....	20
Referencias.....	21

177

R E S U M E N

Se realizó el experimento con el objeto de determinar el diluyente más adecuado para congelar el semen del borrego Pelibuey, en base al recobre de la motilidad espermática al descongelado. Los diluyentes evaluados fueron Test, Tris y Citrato de Sodio, todos con yema de huevo 20%, y glicerol 6%. Se utilizaron 6 borregos de la raza Pelibuey, los cuales se trabajaron una vez por semana, obteniéndose dos eyaculados por animal cada vez que fueron trabajados. Se determinó el volumen, concentración espermática y porcentaje de motilidad de cada eyaculado. La dilución inicial se hizo en base a la extensión espermática de 320×10^6 espermatozoides/dosis; el enfriamiento del semen diluido se realizó de 37°C a 5°C en dos horas y el glicerol se añadió a esta temperatura. El período de equilibrio fue de cuatro horas y la congelación fue en vapor de Nitrógeno líquido. El descongelado se realizó en agua caliente a 75°C durante seis segundos, e inmediatamente se procedió a determinar el porcentaje de motilidad progresiva. No se encontraron diferencias ($p < .05$) entre los diluyentes Test y Tris, pero fueron estos dos significativamente superiores ($P < .05$) al Citrato de Sodio. Hubo interacción borrego x diluyente significativa ($P < .05$). Se concluyó que en base a la motilidad espermática al descongelado, los diluyentes Test y Tris son satisfactorios para congelar el semen del borrego Pelibuey, y que el Citrato de Sodio es el diluyente menos adecuado para congelar el semen de esta raza.

I N T R O D U C C I O N

La Inseminación Artificial (IA) ha sido una importante técnica dentro de la producción animal, ya que por medio de la IA se ha podido explotar íntegramente, y difundir ampliamente el potencial genético de los sementales superiores (Langford et al 1979)

Sin embargo, en la especie ovina la IA se encuentra limitada, a pesar de que se han estado reportando exitosos resultados desde finales de la década de los cincuentas (Graham et al sin fecha). Actualmente, el uso de esta técnica a nivel comercial en los ovinos, se reduce a la zona este y centro de Europa, la Unión Soviética y algunas áreas de Sudamérica - - - (Inskeep 1974).

Entre los principales obstáculos que han frenado el desarrollo de la IA en los ovinos, está el corto tiempo que -- puede mantenerse viable el semen del borrego (First et al 1961; Langford et al 1979). Varios autores (Colas y Court 1976; - First et al 1961; Langford et al 1979) están de acuerdo en -- que, si se pudiera resolver el problema de la conservación del semen del borrego, la ganadería ovina se podría beneficiar tanto de la IA, como lo han hecho ya, la ganadería bovina en la -- industria lechera.

Por lo tanto, si se pretende impulsar el desarrollo de la IA en esta especie, se debe tratar de incrementar el tiempo de conservación del semen del borrego optimizando el proceso de congelación.

El proceso de congelación, una vez que se ha recolectado y evaluado el semen, se inicia con la adición del diluyente. El diluyente es una mezcla de ingredientes que tiene por objeto,

preservar la capacidad fecundante de los espermatozoides durante el proceso de congelación, el período de conservación y al momento de descongelarlos, así como el de obtener varias dosis por -- eyaculado sin sacrificar los índices de concepción.

Ultimamente, se han estado haciendo considerables -- esfuerzos, por caracterizar los patrones metabólicos del semen ovino, esta información podrá ser útil en la formulación de diluentes más adecuados, para la congelación de dichos semen. ---- (Inskeep 1974).

Debido a la importancia que día con día cobra la raza ovina pelibuey en las regiones tropicales del país como fuente protéica de origen animal, existe la necesidad de incrementar rápida y eficientemente la producción; La IA por las muchas ventajas que ofrece, es indudablemente uno de los principales recursos que existen, y que se debe explotar para alcanzar esta meta.

En la actualidad, no existe reportes de trabajo realizados tendientes a congelar semen de borrego Pelibuey, por lo que el objetivo de éste trabajo es, el de evaluar a los diluentes más usados en la congelación de semen ovino, con el propósito de determinar cual de ellos es el más adecuado, que permita la aplicación de la IA a nivel comercial en ésta raza.

Este trabajo forma parte de la línea de investigación que sobre Seminología e Inseminación Artificial, realiza el Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias en la raza ovina Pelibuey.

ELEMENTOS Y CONDICIONES BASICAS DE LOS DILUENTES PARA CONGELAR SEMEN

- Agua. El agua es un solvente que diluye a los componentes seminales, por lo cual se recomienda el uso de agua bidestilada, y más aún, la esterilización de la misma antes de utilizarse en el diluyente (Salamon 1976).
- Buffers. Son sustancias que mantienen la presión osmótica, y contribuyen a formar el pH. Las desviaciones del pH en el semen hacia la acidez ó hacia la alcalinidad, reducen la viabilidad espermática. El pH normal en el semen ovino, es de aproximadamente 7.0 ó sea neutro. La acumulación de los productos residuales del metabolismo celular, bajan el pH del semen, causando inhibición metabólica a los espermatozoides. Una gran variedad de buffers y sustancias no iónicas, se han usado en la formulación de los diluyentes para semen, ya que "en la preparación del diluyente, es importante proveer a este, de un buffer que proteja a los espermatozoides de los cambios de pH" (Lapwood y Martin 1972). El Citrato de Sodio, es una de las sales que con mayor frecuencia se utiliza como buffer en los diluyentes para congelar semen, tanto bovino como ovino. Algunos autores (Salamon 1976 a; Graham et al sin fecha a,b) han reportado resultados alentadores, mientras que otros, (Lapwood y Martin 1972) reportan resultados poco satisfactorios, al utilizar este compuesto en la congelación de semen ovino. Por otro lado, se han estado estudiando como ingredientes buffer en el diluyente para semen ovino, a las sales Tris, (Hidroximetil aminometano) Tes (N Tris (hidroximetil metil 2 ácido aminometano sulfónico) y Test (Tris y Tes), obteniéndose resultados consistentemente buenos, tanto en la motilidad al descongelado como en los índices de fertilidad (Graham et al sin fecha a,b; Salamon y Visser 1972; Visser y Salamon 1973).

- c.- Sustancias orgánicas. Estas, son sustancias que tienen la propiedad de prevenir el shock por enfriamiento. A partir del descubrimiento de la yema de huevo como agente preventivo del shock por enfriamiento, este ingrediente ha sido ampliamente usado en los diluentes para congelar semen. Este efecto preventivo de la yema de huevo reside en la lipoproteína, en los fosfolípidos y la lecitina de la yema. Graham (a y b sin fecha) encontró que el semen ovino congelado en diluentes a base de yema de huevo, presentaba menor cantidad de transaminasas glutámica oxaloacética y mayor motilidad espermática al descongelado, que en el semen congelado en diluentes sin yema de huevo. El uso de la leche de vaca, ya sea entera, descremada o pulverizada en los diluentes para congelar semen, también se ha generalizado, debido al efecto preventivo del shock por enfriamiento que se le atribuye a la caseína. Aunque los constituyentes preventivos de estas sustancias han sido determinandos, la forma en que actúan, se mantiene aún oscura.
- d.- Agentes crioprotectores. Estas sustancias, protegen a los espermatozoides durante la fase de cristalización. El glicerol es el agente crioprotector más usado, y aunque se han estado probando otros agentes crioprotectores tales como DMSO (dimetil sulfóxido) el etilen-glicol y la albúmina obteniéndose buenos resultados, se ha concluido que el glicerol es superior a estos, y que en combinación con estos últimos se podría mejorar la sobrevivencia espermática. Algunos carbohidratos también poseen actividad crioprotectora y se utilizan solos o en combinación con el glicerol. (Graham et al a. sin fecha).
- e.- Azúcares. Los azúcares son fuente de energía, o crioprotectores para los espermatozoides. Es necesario proveer el di

lente de una fuente energética, ya que el requerimiento de energía para la motilidad y mantenimiento de la célula espermática es elevado. La fructuosa es el principal carbohidrato del semen, y aunque normalmente se encuentra en cantidades relativamente altas, al diluir el semen ésta disminuye considerablemente.

La presencia de carbohidratos en el diluyente, ya sean metabolizables como la fructuosa y la glucosa, o no metabolizables como la lactosa incrementan la sobrevivencia y fertilidad espermática, esto se debe en gran parte, a la actividad crioprotectora de estas sustancias (Salamon 1976).

f.-Antibióticos. Los antibióticos se utilizan para controlar el crecimiento microbial. La yema de huevo o la leche que generalmente contienen los diluyentes, son un excelente medio para el crecimiento microbial, por lo que hay que incluir antibióticos en el diluyente. El agente antimicrobial debe reunir las siguientes características: 1) fácil de usar; 2) atóxico para los espermatozoides; 3) amplio espectro y efectivo control microbial. La penicilina y la estreptomina, son los antibióticos que con mayor frecuencia han estudiado y usado, ya que reúnen las características antes mencionadas. Muchos otros antibióticos y agentes quimioterapéuticos se han estado estudiando, pero generalmente o son tóxicos para los espermatozoides, o presentan dificultades para su uso, debido a su baja solubilidad e inestabilidad (Inskeep 1974; Salomon 1976).

g.-Osmolaridad. Los componentes disueltos en el medio que rodea a los espermatozoides, determinan la Presión Osmótica. El Plasma seminal del ovino tiene una Presión Osmótica de aproximadamente 325 milliósmoles, y aún cuando los espermatozoides son capaces de tolerar cambios moderados de osmolaridad, las desviaciones drásticas de la tonicidad del medio, bajan la motilidad, e incluso pueden causar la muerte de éstos.

tos. El grado de tolerancia a estos cambios, depende del pH y de los iones presentes en el medio. Algunos autores (Inskeep 1974; Salamon 1976 b) han reportado que - el semen ovino, presenta mejor recuperación y fertilidad al descongelarse en diluentes hipertónicos, que en otras tonicidades.

h.- Temperatura. El semen es eyaculado a una temperatura de aproximadamente 37.5°C. El índice metabólico del espermatozoide es directamente proporcional a la temperatura absoluta, por lo que la exposición del semen a temperaturas ligeramente elevadas incrementan el índice metabólico de los espermatozoides, dando por resultado el agotamiento de las fuentes energéticas, y la rápida acumulación de productos tóxicos tales como, el peróxido de hidrógeno, el ácido láctico y el bióxido de carbono, lo -- cual conduce a una baja viabilidad espermática. Temperaturas por arriba de los 45°C matan a los espermatozoides. En forma contraria, el abatimiento brusco de la temperatura a menos de 10°C, produce el shock por enfriamiento dando por resultados la pérdida irreversible de la viabilidad. Los espermatozoides deben enfriarse lentamente, con el objeto de disminuir su actividad metabólica y motilidad, pudiendo recuperar estas una vez que se incremente la temperatura (Colas. 1975).

MATERIAL

1) Animales

6 ovinos machos sexualmente maduros de la raza Pelibuey.

2) Equipo para recolectar semen

3 vaginas artificiales para borregos

Jalea estéril Ky

Termómetro para laboratorio

3) Equipo de laboratorio

Dos microscopios bifocales de interfase. American Optical Corporation

Platina caliente (mesa). Chicago Surgical & Electrical Co.

Platina caliente (microscopio) F H K

Destilador de Agua. Sybron-Barnstead-Electrically Heated Stills

Espectrofotometro. Spectronic 20-Bausch & Lomb

Balanza Analítica. Mettler H33 AR

Refrigerador. America RC 250

Congelador. American CL 100

Termo para nitrógeno de boca ancha. Linde-Unión Carbide

Estufa de aire forzado. Blue M-Electrical Company

Estufa de cultivo. Heraeus

Baño María

Esterilizador

Contador de laboratorio

4) Material de laboratorio

Pipetas (1, 5 y 10 ml.)

Matraces Erlenmeyer 50 ml

Probetas 50 ml

Vasos de precipitado 50 y 100 ml

cuBRE objetos

porta objetos

Pipetas Pasteur

Hemocitómetros

Pipetas de dilución para glóbulos rojos.

Tubos de ensayo

Matraces de bola aforados 100 y 250 ml

Papel filtro

Papel de estaño.

Pajillas U.S. Continental de 0.25 ml para envasar el semen

Charolas metálicas para lavar el material

Tanques para recolectar agua destilada

5) Reactivos.

Citrato de Sodio ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$)

Tes (N-Tris (Hidroximetil Metil 2-ácido aminoetano sulfónico)

Tris (Hidroximetil - Aminometano)

Glucosa

Fructosa

Acido Cítrico.

Yema de huevo

Glicerol

Clorazene

Nitrógeno líquido.

Agua bidestilada

6) Material Humano

Dos personas experimentadas en estimar la motilidad espermática

M E T O D O S

Recolección y evaluación del semen.

El semen fue recolectado por medio de vaginas artificiales, los animales se trabajaron una vez por semana, obteniéndose dos eyaculados por animal cada vez que fueron trabajados.

Para la evaluación del semen se determinó en cada eyaculado; 1) volumen en forma directa (tubo graduado); 2) concentración espermática por medio del espectrofotómetro previamente calibrado (Apéndice 1); 3) porcentaje de espermatozoides móviles progresivos de acuerdo al criterio de dos observadores. Se utilizaron para el trabajo, únicamente eyaculados con motilidad y porcentaje de vivos iniciales, superiores al 70%.

Diluentes.

Los diluentes usados en el experimento fueron: Citrato de Sodio, Tris y Test, todos con yema de huevo al 20% y glicerol al 6% (Cuadro 1) (Watson y Martin 1973).

Diluciones.

En un lapso no mayor a 15 minutos posteriores a la recolección, el semen fue diluido inicialmente en la fracción no glicerolada de cada diluyente a 38°C. El radio de dilución, se determinó en base a la extensión espermática, fijada en 320×10^6 espermatozoides/dosis (Jones 1974; Schindler y Amir 1973), obteniéndose el siguiente número de dosis:

Borrego	1	2	3	4	5	6
Dosis	29	28	29	28	28	27
Dosis totales	169					

Composición de los diluentes usados en el presente trabajo.

Ingredientes (%)	D i l u e n t e s			
	<u>TRIS</u>	<u>TEST</u>	<u>CITRATO DE SODIO</u>	
TES	—	78.0 (P/V)	—	
TRIS	50.8	18.7 (P/V)	—	
CITRATO DE Na.	—	—	2.9 (P/V)	
GLUCOSA	—	3.2 (P/V)	—	
FRUCTUOSA	21.0 (P/V)	—	—	
AC. CITRICO	28.1 (P/V)	—	—	
YEMA DE HUEVO	20 (V/V)	20 (V/V)	20 (V/V)	
GLICEROL	6 (V/V)	6 (V/V)	6 (V/V)	

Posteriormente, el semen fue enfriado de 38°C a 5°C en dos horas. Una vez alcanzada esta temperatura, se revisó la motilidad espermática en cada una de las muestras. La dilución final se realizó al añadir a las muestras, la fracción glicerolada del diluyente a 5°C de temperatura. La fracción glicerolada del diluyente se preparó al 12% de glicerol, ya que al mezclarse con la fracción no glicerolada (dilución 1:1) se obtuvo finalmente el 6% deseado (Amir, et al 1973; Colas 1975; Entwistle y Martin 1972).

Equilibrio.

Se equilibraron las muestras durante 4 horas a 5°C. Al término del equilibrio se revisó una vez más, la motilidad de cada una de las muestras y se procedió a envasarlas, en pajillas U.S. Continental de 0.25 ml (Graham et al a y b sin fecha).

Congelación

El semen ya envasado se congeló por el método rápido en vapor de nitrógeno líquido (10 cm arriba de la superficie de nitrógeno) durante 3.5 minutos, sumergiéndose las pajillas inmediatamente después; en el nitrógeno en donde fueron almacenadas en conjunto durante una semana.

Descongelado.

El semen se descongeló en agua caliente a 75°C durante 6 segundos, determinándose inmediatamente la motilidad espermática, de acuerdo al criterio de dos lectores (Aamdal y Andersen 1968).

Evaluaciones.

Se consideró para este trabajo, la motilidad espermática al descongelado, observada en dos fechas distintas de recolección y congelación de s men, el número total de observaciones fué de 334, ya que cada una de las pajillas fue doblemente evaluada (dos lectores). El número de observaciones por diluyente fue el siguiente:

Diluyente	Tris	Test	Citrato de Sodio
Observaciones	120	108	106
Total de Obser <u>vaciones.</u>	334		

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se trabajaron mediante la transformación de arcseno \sqrt{x} (Daniel 1977), y así se sometieron al análisis de varianza. Los animales se consideraron aleatoriamente, mientras que los demás factores se tomaron como efectos fijos. Cuando se detectaron diferencias significativas, los resultados se sometieron a la prueba de Duncan, para determinar diferencias entre las medidas de los tratamientos (Snedecor y Cochran 1974).

CALIBRACION DE SPECTRONIC 20 PARA ESTIMAR LA
CONCENTRACION ESPERMATICA POR DENSIDAD OPTICA
EN EL SEMEN OVINO

Determinar la concentración espermática del semen, es una de las más importantes pruebas para seleccionar eyaculados con un alto potencial de fertilidad. Un procedimiento sencillo y confiable para estimar la concentración espermática es por medio de la espectrofotometría.

Para la realización de este trabajo se vio la necesidad de obtener una curva o regresión, que permitiera en forma rápida y precisa estimar la concentración espermática de los eyaculados recolectados. Para este propósito se calibró el Spectronic 20 (Bausch & Lomb), siguiendo los procedimientos descritos por el Departamento de Manejo Animal de la Universidad de Cornell, modificados para trabajar con semen ovino.

PROCEDIMIENTO:

El Spectronic 20 se manejó con una longitud de onda de 550 Mm, y se consideró únicamente la transmitancia; como solución "Madre", y solución "Blanco" se usó Citrato de Sodio al 2.9%.

Se recolectaron 36 eyaculados de diferentes borregos de la raza Pelibuey, los cuales se procesaron de la siguiente manera:

- 1) Cada eyaculado fue cuidadosamente mezclado en forma manual, invirtiendo el tubo colector con semen 10 veces.
- 2) Se mezcló 0.1 ml. de semen con 7.9 ml. de solución de Citrato de Sodio al 2.9%, para obtener una dilución de semen 1:80.
- 3) Se agitó manualmente 10 veces.
- 4) Se vertieron 4 ml. de esta mezcla, en las "cubetas" o tubos para el Spectronic 20, y se estimó la transmitancia.
- 5) A 1.0 ml. de la mezcla semen-Citrato de Sodio (1:80), se le añadió 4 ml. de una solución de clorazene al 3%, para obtener así una dilución de 1:400; se hizo esta modificación al procedimiento original, para facilitar la lectura del hemocitómetro.
- 6) Después de agitarse manualmente esta última solución, se procedió a llenar la pipeta para glóbulos rojos hasta la marca 101.
- 7) Se agitó la pipeta durante 2 minutos, mecánica o manualmente.
- 8) Con ayuda de un kleenex, se desecharon las 3 primeras gotas que salieron de la pipeta, y se procedió a llenar la cámara del hemocitómetro .
- 9) Se dejó "asentar" durante 3 minutos a los espermatozoides, - antes de proceder a contarlos.
- 10) Se contaron 5 cuadros grandes (cada uno dividido en 16 pequeños cuadros) en forma diagonal por 4 lectores; evitando contar los espermatozoides que se encontraron en las dobles líneas de la derecha y de abajo; el promedio de las 4 lecturas se tomó como valor verdadero.

- 11) El promedio de las 4 lecturas se multiplicó por el factor 20×10^6 (modificación hecha para compensar la dilución -- 1:400), para obtener el número de espermatozoides por mililitro.

ECUACION DE REGRESION

Para obtener la Densidad Optica se transformaron - logarítmicamente los valores de la tramitancia, y de esta mane- ra evitar obtener un modelo curvilínear inverso; para evitar - obtener un modelo lineal inverso, se restó de 2 la tramitancia logarítmicamente transformada, y de esta forma se obtuvo el mo- delo lineal positivo que se buscaba, quedando la siguiente ex- presión:

$$2 - \text{Log } R$$

R = % Tramitancia.

Para obtener la ecuación de regresión, se siguió el método descrito por Snedecor y Cochran (1974) para la regresión lineal simple a partir de la ecuación $Y = a + b x$, siendo (X) -- 2-Log R, y (Y) la lectura al hemocitómetro, obteniéndose para - este trabajo la ecuación siguiente:

$$\hat{Y} = 624.8401 X - 199.5241$$

El Coeficiente de Correlación se obtuvo a partir de la ecuación $r = \frac{\sum XY}{\sqrt{(\sum X^2) (\sum Y^2)}}$ descrita por los mismos auto- res, obteniéndose:

$$r = .969$$

Ver apéndice 1.

RESULTADOS Y DISCUSION

No hubo diferencias ($P < .05$) entre los diluentes - Test 21.4% y Tris 19.4%, pero estos dos fueron significativamente superiores ($P < .05$) al Citrato de Sodio 16.5% (cuadro 2).

Al comparar estos resultados con los reportados en la literatura, se observó que los trabajos experimentales que se han realizado para congelar semen ovino en pajillas (Aamdal y Andersen 1968 ; Salamon 1967; Langford et al 1979), se han realizado principalmente en la presentación francesa de 0.5 ml. Actualmente, no existen reportes de congelación de semen en la raza Pelibuey, por lo cual, las comparaciones que se hacen son sin considerar la raza, el tipo de envase, el método de congelación, etc., limitándose más bien a el diluyente usado. Graham et al b; (sin fecha) determinaron que Test no era significativamente superior al Citrato de Sodio + Glucosa, pero concluyeron que en base a la alta motilidad al descongelado, y a la -- baja liberación de transaminasas glutámica oxaloacéticas (TGO) al precongelado, el Test era el diluyente más adecuado para -- congelar semen ovino. En el presente trabajo, se determinó -- que Test fue significativamente superior ($P < .05$) al Citrato de Sodio.

Salamon (1976 b) recomienda al Citrato de Sodio + - Raffinosa para congelar semen óvino y congelarlo en pastillas. En otro trabajo, el mismo autor (1976 a) reportó un satisfactorio recobre de la motilidad, al descongelar semen ovino diluido en Citrato de Sodio + Glucosa, y congelarlo en ampulas, - pajillas y pastillas. Jones Martin (1965) citados por Lapwood y Martfn (1972), reportaron resultados poco satisfactorios, -- cuando utilizaron Citrato de Sodio para congelar semen ovino.

C U A D R O 2

Media (\bar{X}) y desviación estandar (σ) de la motilidad espermática al descongelado, observada en cada diluyente.

Diluyente	Observaciones	\bar{X} σ
TRIS	120	19.4 \pm 4.9 ^a
TEST	108	21.4 \pm 6.4 ^a
CITRATO DE Na	106	16.5 \pm 6.4 ^b

Valores con distinta literal son significativamente diferentes ($P < .05$)

En este experimento, el Citrato de Sodio resultó ser el diluente menos adecuado para congelar semen de borrego Pelibuey - - (P<.05), de entre los tres diluentes evaluados.

Salamon y Visser (1972), evaluaron al Tris con diferentes azúcares comunmente usados en la preparación de diluentes para congelar semen; Glucosa con 33.3% y Fructuosa con -- 29.1 fueron respectivamente, los azúcares en que mejor recuperación de la motilidad se obtuvo. En el presente experimento, se utilizó Tris + Fructuosa, consiguiéndose motilidades al descongelado de 19.4%.

Hubo diferencias (P<.05) por parte de los borregos 2 y 5, en relación a los demás animales (cuadro 3). Cabe señalar que en la raza Pelibuey, se observó "resistencia a la congelación" 1/ en los eyaculados de algunos animales (borregos 2 y 5), en forma similar a la presentada en las razas ovinas europeas, estudiadas por otros autores (Entwistle y Martin, 1972).

Los porcentajes de motilidad al descongelado más altos, fueron para el Test, Tris y Citrato de Sodio respectivamente; no hubo variaciones tan drásticas en la motilidad al descongelado por parte del Test, como en el Tris y el Citrato de Sodio, en los cuales se vió más severamente dañada la motilidad al descongelado, en los borregos 2 y 5 . La interacción borrego x diluyente fue significativa (P<.05); la pobre recuperación al descongelado que tuvieron los eyaculados de los borregos 2 y 5, podría explicar esta significancia (Gráfica 1).

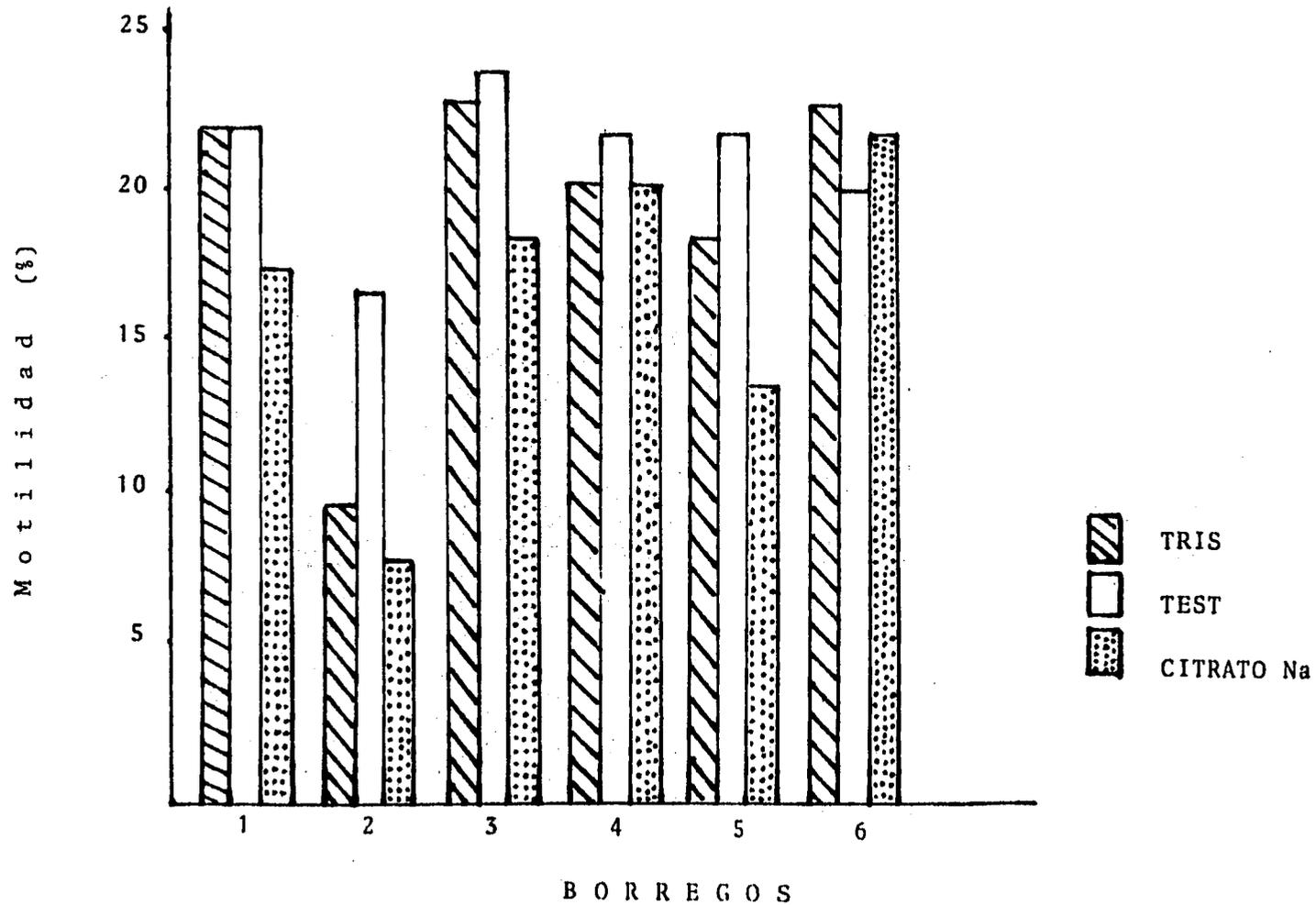
1/La resistencia a la congelación, es la poca tolerancia que presenta el semen de algunos animales a ser congelado, a pesar de haber mostrado buena motilidad antes de congelarse.

Media (\bar{X}) y desviación estandar (σ) de la motilidad espermática al descongelado que presentó cada borrego.

BORREGO	OBSERVACIONES	----- § -----		
		\bar{X}	σ	σ
1	29	20.79	\pm	0.01 ^{bc}
2	28	11.42	\pm	0.01 ^a
3	29	22.18	\pm	0.01 ^b
4	28	21.43	\pm	0.01 ^b
5	28	18.06	\pm	0.01 ^c
6	27	21.90	\pm	0.01 ^b

Valores con distinta literal son significativamente diferentes ($P < .05$).

GRAFICA I



Efecto del diluyente sobre los eyaculados descongelados de cada borrego
 Interacción Diluyente X Borrego significativa ($P < .05$)

No se observaron diferencias significativas ($P > .05$) ni entre lectores ni entre fechas de lectura, por lo que estos factores no se consideraron como fuente de variación en el presente trabajo.

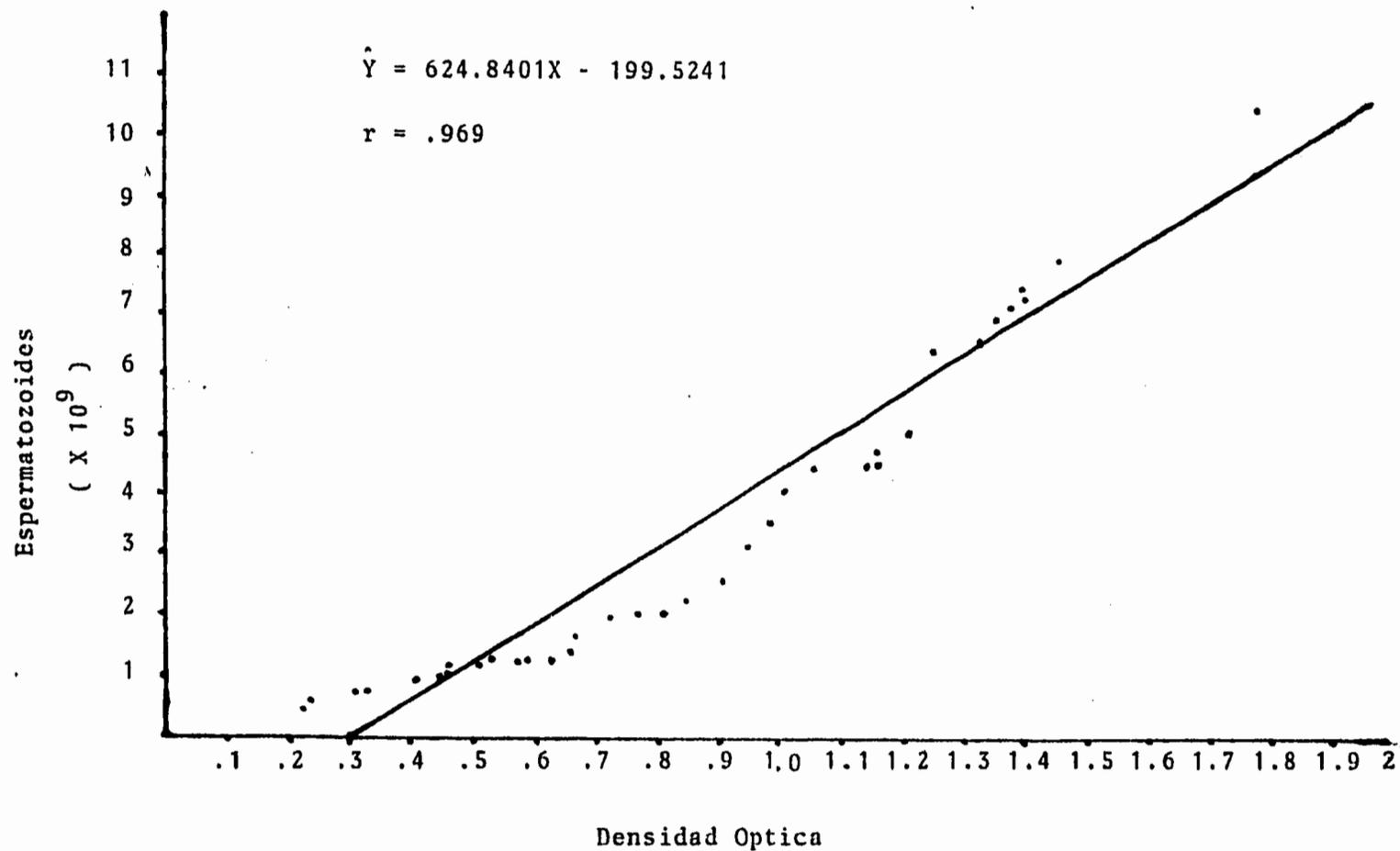
CONCLUSIONES

- 1.-) El semen del borrego Pelibuey es susceptible a congelación y descongelación rápida.

- 2.-) En base a la recuperación de la motilidad al descongelado, Test y Tris son los diluentes más adecuados para congelar semen de borrego Pelibuey. Citrato de Sodio resultó el diluyente menos adecuado.

- 3.-) Se aplicó una metodología específica, logrando la congelación y descongelación satisfactoria del semen a nivel de laboratorio, y ofrece posibilidades para lograr fertilidad efectiva.

A P E N D I C E I



Gráfica para determinar la concentración espermática através de las lecturas del Spectronic 20

REFERENCIAS

- 1.- Aamdal J. Andersen K. 1968. Freezing of Ram Semen in Straws VI Cong. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif. Paris Vo. II. 977-980.
- 2.- Amir D., Schindler H. Eyal E., Lehrer A.R., Kempenich Pinto O. 1973. The Effect of the Ratio of Dilution of Ram Semen in Different Diluents on The Conception Rate. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 13 (1), 1-5.
- 3.- Colas G. 1975. Effect of Initial Freezing Temperature, Addition of Glicerol And Dilution on the Survival and Fertilizing Ability of Deep - Frozen Ram Semen. J. Reprod. Fert. 42:277-285.
- 4.- Colas G., Court M. 1976. Storage of Ram Semen. Sheep Breeding Proceedings of the 1976 International Congress. Western Australian Institute of Technology. 455-466
- 5.- Daniel W.W. 1977. Bioestadística. 1a. ed. LIMUSA. 234-235.
- 6.- Entwistle K.W., Martin I.C.A. 1972. Effects of Composition of Diluent, Method of Addition of Glycerol. Freezing Rate, and Storage Temperature on the Revival of Ram Spermatozoa after Deep-Freezing. Aust.J. Biol. Sci. 25. 379-386.
- 7.- Entwistle K.W. Martin I.C.A. 1972. Effects of the Number of Spermatozoa and of Volumen of Diluted Semen on Fertility in the Ewe. Aust.J. Agric. Res., 23, 467-472
- 8.- First N.L., Henneman H.A., Magee W.T., Williams J.A. 1961. -- The Frozen Storage of Ram Semen. Jour. Of Anim. Scia. 20, 74-78.

- 9.- Graham E.F., Grabo B.G. Pace M.M. Current Status of Semen Preservation in the Ram, Boar and Stallion. a. Department - Animal Science. University of Minnesota, St Paul.
- 10.- Graham E.F., Schmehl M.K.L. Beccaria R. Crabo B.G. b. Laboratory and Fertility Results with Frozen Ram Semen. Scientific Journal Series Paper 8893 Minnesota Agricultural Experiment Station.
- 11.- Inskeep E.K. 1974. Artificial Insemination and Preservation of Ram Semen. West Virginia University Agricultural Experiment Station. Bulletin 629. 5-24
- 12.- Jones R.C. 1969. Influence of Diluents and Processing Times after Ejaculation on the Survival of Deep - Frozen Ram Spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 22. 995 - 1004.
- 13.- Langford G.A. Marcus G.J. Hackett A.J. Ainsworth L. Woly--netz M.S., Peters H.E. 1979. A Comparison of Fresh and Frozen Semen in the Insemination of Confined Sheep. Can J. --- Anim. Sci. 59, 635-691.
- 14.- Lapwood K.R. Martin I.C.A. 1972. Effects of some Buffers - and Inorganic and Organic Sodium Salts in Synthetic Diluents for the Storage of Ram Spermatozoa at 37 or 5°C. Aust. J. -- Biol. Scie. 25, 367-378.
- 15.- Procedure for Counting Bovine Sperm with a Hemocytometer and the Calibration and Operational use of a Photelometer to Estimate Sperm Count by Optical Density. 1956. Laboratory of Animal Breeding and Artificial Insemination. Cornell University.

- 16.- Salamon S., Visser D. 1972. Effect of Composition of Tris Based Diluent and of Thawing Solution on Survival of Ram - Spermatozoa Frozen by the Pellet Methods. Aust. J. Biol. -- Scie. 25, 605-618.
- 17.- Salamon S. 1976. a. Observations on Fertility of Ram Semen Frozen by Different Methods. Aust. J. of Ex. Agric. and Anim. Husb. 7. 559.-561.
- 18.- Salamon S. 1976. b. Artificial Insemination of Sheep. Publi- city Press Ltd. 104. pp.
- 19.- Schindler H., Amir D. 1973. The Conception Rate of Ewes in Relation to Sperm Dose and Time of Insemination. J. Reprod. Fert. 34, 191-196.
- 20.- Snedecor G.W. Cochran W.G. 1974. Métodos Estadísticos. 2a. Impresión CECSA. 321-369.
- 21.- Visser D. Salamon S. 1973. Fertility of Ram Spermatozoa - - Frozen in a Tris-Based Diluent. Aust. J. Biol. Scie. 26, - 513-516.
- 22.- Watson P.F. Martin I.C.A. 1973. The Response of Ram Sper- matozoa to Preparations of Egg Yolk in Semen Diluents Du- ring Storage at 5°C or 196°C Aust. J. Biol. Scie., 26, -- 927-935.