



110
2 rej

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

"COMPARACION ENTRE LA MOTILIDAD Y MORFOLOGIA DE LOS
ESPERMATOZOIDES DE CARNERO ANTES Y DESPUES DE LA
CONGELACION DE MUESTRAS OBTENIDAS CON VAGINA ARTI-
FICIAL Y ELECTROEYACULADOR"

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P r e s e n t a

JOSE BERNARDO NERIA VILLANUEVA

en colaboración con:

ARSENIO JULIAN SOLAR PEREZ

Asesor: M. V. Z. **ARTURO A. TREJO GONZALEZ**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y METODOS.....	15
RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..	23
BIBLIOGRAFIA.....	25
ANEXO 1.....	30
ANEXO 2.....	32

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

El ovino es uno de los animales que primero domesticó el hombre, para utilizar sus cueros como abrigo y para servirse de su carne y leche como alimento. Gracias a inteligentes cruces y persistentes selecciones, existen hoy numerosas razas de ovejas en las que se han desarrollado al máximo, las particularidades que el hombre ha deseado explotar en cada caso. Partiendo de los caracteres que poseían las especies salvajes, se han ido modificando poco a poco, hasta obtenerlos de las ovejas domésticas de nuestros días. (López, 1980).

Generalmente las concentraciones altas de ovejas coinciden con concentraciones bajas de humanos, exceptuando China e India que poseen un gran territorio. Casi siempre se encuentran en lugares ricos en alimentos, coincidiendo con precipitación pluvial de 500 ml; - Uruguay, Australia, Nueva Zelanda. Los datos más recientes establecen que la URSS, tiene la mayor población ovina siguiéndole Australia, China y Nueva Zelanda principalmente. México en sus dos millones de kilómetros cuadrados posee solo cinco millones de ovejas. Los españoles las trajeron consigo pero actualmente se han introducido tantas razas que se han combinado y no se diferencian algunas veces. (Arbliza, 1978).

En la zona norte del país se encuentran las razas más definidas y en su mayoría predominan razas productoras de lana fina. En el centro, las ovejas son destinadas para el abasto existiendo gran variedad de razas y cruzas. En la zona sur la lana se usa para artesanas y la carne para consumo local. También existe gran variedad de razas y cruzas. En las costas de nuestro país no hay producción de ovejas y en el trópico se está difundiendo la raza Pelibuey. (Arbiza, 1978).

La inseminación artificial nos ayuda al incremento rápido y continuo de los requerimientos de víveres del pueblo. A este respecto la inseminación artificial juega un importante papel tanto cuantitativa como cualitativamente. Después de la Segunda Guerra Mundial, la inseminación artificial ha sido más apreciada y se ha convertido en un método eficiente de trabajo en el mejoramiento de razas do--mesticas. (Lunca, 1965).

La inseminación artificial es una técnica que se ha incrementado en los últimos años ya que es muy práctica y sencilla cuando se tiene la experiencia necesaria. (Foote, 1980).

En los bovinos, la inseminación artificial ha sido más estudiada y por lo tanto más desarrollada que en otras especies por razones--técnicas y económicas. (Faulkner y Pineda, 1978).

Una de las ventajas de la inseminación artificial es el mejora--miento genérico ya que podemos seleccionar el semen del semental

más productivo para nuestra mejor hembra y así obtener una cría fenotípica y genotípicamente superior. (Foote, 1980).

Además debemos considerar la capacidad de poder inseminar a un gran número de hembras con la muestra de un solo semental (40 hembras por eyaculado; Faulkner y Pineda, 1978), y esto desde el punto de vista económico tiene mucha importancia ya que con un menor número de sementales se obtienen más crías.

Con la inseminación artificial se pueden controlar enfermedades venéreas como son la vibriosis genital y la tricomoniasis en bovinos. También puede actuar como vehículo de diseminación amplia y rápida de éstas enfermedades, y otras como la brucelosis ovina que puede transmitirse por medio de la inseminación artificial. (Faulkner y Pineda, 1978).

Para evitar alguna transmisión por la inseminación artificial se debe realizar técnicas sanitarias apropiadas, y si se puede, utilizar material desechable. (Faulkner y Pineda, 1978).

La inseminación artificial ha sido una importante técnica dentro de la producción animal, ya que por medio de ésta se ha podido explotar intensamente, y difundir ampliamente el potencial genético de los animales superiores. (Langford, et al., 1979). Sin embargo, en la especie ovina la inseminación artificial se encuentra limitada, a pesar de que se han estado reportando exitosos resultados desde finales de la década de los cincuentas. (Graham, et al., 1975). Actualmente, el uso de esta técnica a ni --

vel comercial en los ovinos, se reduce a la zona Este y Centro de Europa, la Unión Soviética y algunas áreas de Sudamérica. (Inskeep, 1974).

Mediante la utilización de la inseminación artificial con semen congelado en los ovinos, sería posible acelerar el mejoramiento genético, ya que aumenta la posibilidad y diversifica la utilización de genes. (Orizaga, 1982).

La inseminación artificial en ovejas todavía tiene una serie de problemas teóricos y prácticos los cuales necesitan urgentemente soluciones para incrementar la proporción de explotaciones de esta especie. (Lunca, 1965).

La congelación de semen y la inseminación artificial en ovinos son temas de abundantes investigaciones en nuestros días. (López y Valencia, 1982).

A pesar de que hace muchos años que se practica la inseminación artificial en esta especie, su ejecución ha estado restringida al uso del semen fresco y refrigerado, por los bajos porcentajes de fertilidad que se obtienen con semen congelado. (Hackett, et. al., 1979).

Sin embargo en los últimos años los resultados de recuperación de motilidad post-descongelado y de fertilidad obtenida con semen descongelado se ha aumentado sensiblemente con el desarrollo de nuevas técnicas de congelación y de inseminación. (Vissser, 1974a).

Una de las principales causas del poco uso de la técnica en los ovinos es la dificultad para conservar el semen. (Durán del Campo, 1980).

Entre los principales obstáculos que han frenado el desarrollo de la inseminación artificial en los ovinos, está el corto tiempo que puede mantenerse viable el semen del borrego. Varios autores (Colas y Court, 1976; First, et. al., 1961; Langfort, 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 inseminación artificial, como lo han hecho ya, la ganadería bovina en la industria lechera. (Acaña y Valencia, 1982).

Una ventaja en la conservación del semen en especies de reproducción estacional como los ovinos es que se puede almacenar en la estación reproductiva cuando éste se produce de mejor calidad y puede ser aplicado en cualquier época a las ovejas. (Rao y Pandey, 1977).

La vagina artificial es un medio muy útil para recoger semen de machos de muchas especies. El producto recogido de esta manera se haya libre de contaminación y es netamente representativo de la eyaculación normal. La recolección en vagina artificial requiere la presencia de una hembra o de un falso animal que sirvan de estimulantes y de un macho con buena libido. A veces es necesario un periodo de adiestramiento para que el macho a--

prenda a comportarse de manera adecuada. (Faulkner y Pineda, 1978).

La temperatura de la vagina artificial deberá estar entre 41° a 44°C al momento de la colección. La vagina artificial es lubricada con un lubricante estéril no tóxico y la presión es ajustada a mano. (Rhodes, 1980).

La electroeyacuación constituye un método muy útil para obtener muestras de semen de toro o de carnero cuando no resulta posible o práctico el empleo de la vagina artificial. (Faulkner y Pineda, 1978).

La electroeyacuación ha sido reportada satisfactoriamente en ganado bovino, ovino, zorras, roedores y cabras. (Austin, et. al., 1968).

Gunn fué uno de los primeros en coleccionar semen de algunas especies domésticas por electroeyacuación. El usó 60 ciclos de corriente de cerca de 30 volts aplicados por medio de una sonda rectal y una sonda lumbar. El trabajó primeramente con carneros. (Dziuk, et. al., 1954).

La electroeyacuación hace posible la colección del semen de animales domésticos bajo condiciones difíciles si no es que imposibles que impiden la colección por métodos usuales. Así, no parece haber ningún efecto adverso sobre el semen colectado o sobre los animales usados. La electroeyacuación podría ser un su

plemento a los métodos usuales de colección de semen tanto para trabajos experimentales como para la aplicación práctica de la inseminación artificial. (Dziuk, et. al., 1954).

Actualmente la alta calidad del semen puede ser obtenida rápidamente de machos de diferentes especies con el uso de la electroeyaculación sin ningún efecto nocivo sobre la libido o la espermatogénesis. (Austin, et. al., 1968).

Se ha comprobado que las características del semen recogido por electroeyaculación son en absoluto distintas a las correspondientes al obtenido con vagina artificial. En términos generales la electroeyaculación proporciona muestras de mayor volumen (Austin encontró con electroeyaculador 1.93ml y con vagina artificial 0.84ml en chivos), y pH más alto (Faulkner y Pineda encontraron con electroeyaculador 7.3 ± 0.11 y con vagina artificial 6.7 ± 0.99 en bovinos), pero cuyas concentraciones de células espermáticas (Austin encontró con electroeyaculador 1197×10^6 espermatozoides y con vagina artificial 2456.5×10^6 espermatozoides también en bovinos) y de fructosa son decididamente inferiores.

El volumen de la muestra y la concentración de células espermáticas están influenciados por la intensidad y duración del estímulo, las cuales pueden ser alteradas. Por consiguiente, los citados caracteres del semen son pocas veces representativos del eyaculado real. Un trabajo realizado en borregos sugirió que el-

semen obtenido por electroeyaculación podría ser de mejor calidad que el obtenido por otros métodos. Por lo general, las muestras de semen obtenidas por electroeyaculación son adecuadas para estudios de motilidad y morfología. (Zemjanis, 1973).

Los requerimientos mínimos de semen satisfactorios son semen lechoso, 60% de motilidad espermática, motilidad moderada y menos del 25% de espermatozoides anormales. Las diferentes anomalías morfológicas y el estado de degeneración dan una buena indicación en la severidad de la disfunción reproductiva. Espermatozoides degenerados, espermatozoides con cabezas piriformes y residuo celular, todo sugiere severa disfunción de la espermatogénesis, mientras una gran proporción de gotas protoplasmáticas en una diferente muestra normal, podría sugerir que el proceso reproductivo está en la fase de recuperación. (Rhodes, 1980).

En cada eyaculación habrá espermatozoides anormales. El límite esperado de 8 a 10% no tiene efectos adversos sobre la fertilidad. Si los espermatozoides anormales son más de 25% del total eyaculado, se puede anticipar una reducción de la fertilidad. (Bearden y Fuquay, 1982).

Los espermatozoides pueden ser clasificados como (1) normal; (2) inmaduro -gotas protoplasmáticas proximales y distales; (3) teniendo anomalías que ocurren durante la espermatogéne

sis -piriformes, pequeños, grandes y cabezas gemelas; (4) teniendo anomalías que ocurren post-espermatogénesis -cabezas -- sin colas, cuellos rotos, enrollados, colas rotas y severamente envueltas y (5) teniendo artefactos -colas envueltas. (Rhodes, -- 1980).

La evidencia morfológica sobre los tipos de anomalías y la parte del semen afectado es el más sensitivo indicio de la -- contribución de grado de alteración en la espermatogénesis. -- (Sahni y Roy, 1972).

Las laminillas que se preparan para conteo de espermatozoos vivos y muertos son según la técnica de tinción de Eosina-- Nigrosina que se utiliza para el conteo de espermatozoides anormales. (Sahni y Roy, 1972).

Shukla y Bhattacharya (1952) observaron que las colas torcidas eran más frecuentes en invierno que en las otras estaciones. La proporción de espermatozoides anormales se incrementó considerablemente en los periodos más calientes del año, aproximadamente 40 a 63%. Semen de excelente calidad, prácticamente libre de anomalías primarias, fué obtenido de Diciembre a mediados de Febrero. (Sahni y Roy, 1972).

En primavera, cuando la calidad del semen es generalmente más baja, es posible desechar los eyaculados pobres al revisar el porcentaje de espermatozoides anormales. (Colas, 1979).

El semen de carnero ha sido congelado por diferentes métodos (pellet, ampolleta y pajilla francesa). El método de pellet -- tan registrado en la literatura parece ser el método más común de congelación de semen de carnero. (Graham, Crabo y Pace, -- 1975).

Sin embargo, en términos generales, cabe afirmar que el semen obtenido por electroeyaculación no sobrevive tan bien como el recogido con vagina artificial a ciertas situaciones de alarma, como por ejemplo, la congelación. (Faulkner y Pineda, 1978).

El volumen del semen y la densidad son más variables colectados por la estimulación eléctrica que comparado con el semen-colectado por vagina artificial. Sin embargo, la calidad de los -espermatozoides obtenidos por estimulación eléctrica es indistinguible a los obtenidos con la vagina artificial en el momento de-colección. (Rhodes, 1980).

El semen colectado con un electroeyaculador o con vagina artificial mostraron similares cambios estacionarios en volumen de eyaculado, concentración espermática, motilidad, porcentaje de -espermatozoides vivos, porcentaje de espermatozoides anormales. (Cupps, et. al., 1960).

Como efecto colateral indeseable de la electroeyaculación cabe citar la estimulación de las contracciones de los músculos de la región lumbar y de los extensores de las extremidades poste-

riores. (Faulkner y Pineda, 1978).

La investigación sobre el almacenamiento por congelación de semen de carnero ha sido llevada por más de 20 años y en general siguiendo las líneas semejantes que con el semen de toro. - Los diluyentes comunmente usados son isotónicos o medios ligeramente hipertónicos y la inclusión de azúcares, notablemente aquellos de alto peso molecular, fué establecido para tener efectos benéficos. El crioprotector comunmente usado, tanto para el semen de toro, es el glicerol. (Visser, 1974a).

La más baja proporción de dilución (1:2 a 1:4) de semen son generalmente reportados por ser más convenientes, pero esto -- puede ser influenciado por factores tales como la composición -- del diluyente y el método de congelación. Los resultados sobre las proporciones indicaron que la refrigeración lenta a 5°C por uno o dos horas es requerido y que períodos cortos relativamente de equilibración a 5°C dan resultados satisfactorios con semen de carnero. El semen de carnero puede ser congelado exitosamente en ampollitas, pajillas o en forma de pellet, y la elección del método de congelación que le parezca a uno depende ampliamente de la preferencia individual y las necesidades. (Visser, 1974-a).

Un efecto importante de variación de la proporción de la dilución precongelación sobre la recuperación y supervivencia del espermatozoide de carnero fué ilustrada por Lightfoot y Salamon

(1969). Los mejores resultados fueron obtenidos cuando el semen fué diluído 4 a 6 veces con una menor recuperación para ambos, tanto con más baja como con más alta proporción de dilución. Este efecto fué en todo caso, dependiente de los componentes del diluyente y fueron ajustados para tener la misma concentración en el semen diluído, indiferentemente de la proporción de la dilución. La recuperación y supervivencia de los espermatozoides después de la congelación esta influenciada substancialmente por el proceso de descongelación, donde el daño añadido a las células puede ocurrir con técnicas subóptimas. (Visser, 1974a).

Las temperaturas registradas mostraron que las velocidades de congelación y de descongelación del semen congelado en pellets fué afectado significativamente por el volumen del pellet, la temperatura de descongelación y la proporción de la dilución en la descongelación. (Visser, 1974b).

Cuando se compararon diferentes diluyentes la motilidad del semen fué significativamente superior ($p < 0.01$) en diluciones de TRIS (69% de motilidad del semen) que en diluciones de glucosa (60% de motilidad del semen). (Abdelhakeam, et. al., 1978).

De los eficaces reportes, aparece que la yema de huevo citrato fructosa glicerina; leche descremada yema glucosa fructosa; y CUE con o sin catalasa son mejores para diluir el semen de carnero. (Rao y Pandey, 1977).

Acuña y Valencia no observaron diferencia en el porcentaje de motilidad progresiva entre los diluentes TES (21.4%) y TRIS (19.4%), pero estos fueron diferentes ($p < 0.05$) al Citrato de Sodio (16.5%). Los porcentajes de motilidad progresiva al descongelar fueron más altos en diluentes TES, TRIS y Citrato de Sodio, respectivamente; las variaciones en la motilidad fueron más manifiestas en Citrato de Sodio y en TRIS. En base a la recuperación de la motilidad espermática al descongelado se determinó que -- los diluentes TES y TRIS tienen posibilidades para lograr fertilidad aceptable.

OBJETIVOS.

El presente trabajo tiene como objetivos evaluar la calidad - del semen antes y después de la congelación en las característi- cas de motilidad y anormalidades morfológicas de los espermato- zoides con el fin de sentar las bases para un programa de Inves- tiguación en inseminación artificial de ovinos implementado por el área de Reproducción de la F.E.S.-C..

Así como la comparación de la calidad del semen de carne- ro obtenido con vagina artificial y con electroeyaculador.

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

El presente trabajo se realizó en el "Centro Nacional de Investigaciones para Fomento Ovino" de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos localizado en Chapa de Mota, Estado de México con la siguiente ubicación:

19° 46' Latitud.

99° 29' Longitud.

2400 Metros de altura sobre el nivel del mar.

Se trabajaron 60 muestras de semen en total; las 30 primeras muestras fueron obtenidas mediante la vagina artificial y las siguientes 30 muestras por medio del electroeyaculador, procedentes de varios carneros entre 2 y 4 años de edad pertenecientes a cinco diferentes razas (Suffolk, Rambouillet, Romney Marsh, Pelibuey y Criollo), durante los meses de Julio a Septiembre.

Se usaron vaginas artificiales de 15cm de largo y 5cm de diámetro con fundas y conos desechables de polietileno, la temperatura del agua se mantuvo entre 42 y 44°C. La presión se suministró por un llenado completo de la vagina con agua.

Se utilizó también un electroeyaculador denominado Electrojac Electronic Ejaculator de la Ideal Instruments, Inc., con un transformador de corriente convirtiendo los 115V. de corriente alterna a 13V. de corriente directa.

Este aparato va aumentando automáticamente la intensidad del estímulo durante 32 periodos de estimulación sucesiva o ciclos, - no siendo necesario completar los 32 ciclos ya que en promedio a los 17 ciclos se presenta la eyaculación. El tiempo de los periodos de estimulación y de descanso son iguales (1.5 seg.).

Se debe sujetar perfectamente al animal y se lava y seca el prepucio para evitar que se contamine el semen. Si es necesario se quita el pelo de dicha zona.

Las muestras de semen se obtuvieron en tubos de vidrio para centrífuga, graduados de 1 a 10ml, que se conservaron a 37°C y protegidos de la luz directa. En estos tubos se midió el volumen directamente.

Cada muestra se conservó en baño maría entre 30-35°C -- mientras se realizaba su evaluación antes de efectuar la dilución.

La concentración espermática por ml. se realizó mediante el método del espectrofotómetro previamente calibrado con una longitud de onda de 600 nanómetros.

La motilidad se calculó en el momento de la obtención de la muestra y en el momento de descongelar cada pellet. Esta motilidad progresiva se evaluó en porcentaje observando tres campos del microscopio, de acuerdo con Zemjanis (1973). Para calcular la motilidad de la muestra descongelada se sacó el promedio de la motilidad para tres pellets en cada caso.

Para medir el pH se utilizó una cinta de papel reactivo con un rango de 6.2 a 7.2. Se sumerge una porción de la cinta directamente en la dilución del semen antes y después de congelarlo y se compara con un patrón establecido.

Cada muestra de semen fué diluída en proporción 1:5 (V/V) con diluyente para semen a base de lactosa-yema de huevo-glicerina. (Anexo 1).

Para identificar las anomalías primarias y secundarias se realizaron frotis de semen, teñidos por el método de Eosina-Nigrosina (Sahni y Roy, 1972). (Anexo 2). Y se clasificaron de acuerdo a una tabla modificada de Zemjanis, 1973; Moss, 1979; y Kendrick, 1978.

Los frotis se hicieron con semen al momento de la dilución y después de descongelar cada muestra. De cada muestra se contaron 200 espermatozoides (Sorensen, 1978), se expresó el resultado en porcentaje, considerando cada una de las anomalías descritas por Zemjanis, (1973); Moss, (1979) y Kendrick, (1978).

Cada muestra, una vez diluída y a 31-35°C, se sometió a un periodo de adaptación conservándose en refrigeración entre 5 y 10°C durante dos horas. Después de este proceso se congelaron pellets de 0.1ml sobre una placa perforada de Bióxido de Carbono sólido (hielo seco) a una temperatura aproximada de -79°C durante 5 minutos.

Una vez congelados los pellets, se almacenaron en Nitrógeno líquido a -196°C durante 8 días, los pellets correspondientes a cada muestra, fueron identificados con el número progresivo y colocado en recipientes plásticos, de los utilizados para almacenar las pajillas de semen congelado de toros.

De cada muestra se descongelaron tres pellets utilizando 0.9 ml de Citrato de Sodio al 2.9% a 37°C . La evaluación de motilidad y el frotis para identificar anomalías se realizó inmediatamente después de haber sido descongelada la muestra.

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de hipótesis utilizando los valores de "Z" para diferencia entre dos proporciones a grados de significación (p<0.01 y p<0.05).

R E S U L T A D O S Y D I S C U S I O N .

En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos para las características del semen tanto con la vagina artificial como con el electroeyaculador.

El volumen muestra una diferencia significativa a $p < 0.05$ en favor de las muestras que se colectaron con electroeyaculador - 0.91 ± 0.7 contra 0.61 ± 0.35 ml. Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por Austin, et. al., 1968.

La concentración espermática en cambio, fué superior para las muestras colectadas con vagina artificial, esta diferencia fué estadísticamente significativa a un grado de significación de $p < 0.01$ y representó 1288×10^6 de espermatozoides más por mililitro. Sin embargo, éstos dos valores, volumen y concentración espermática, se encuentran dentro del rango normal reportado para la especie.

La producción promedio de espermatozoides por eyaculado que resulta de multiplicar el promedio de concentración por el promedio del volumen fué también ligeramente superior en el caso de la vagina artificial y ésta diferencia representó 54×10^6 de espermatozoides más por cada eyaculado.

La motilidad progresiva de los espermatozoides en la muestra recién obtenida fué mayor en la vagina artificial que con el -

electroeyaculador, $89.3 \pm 7.5\%$ y $74.8 \pm 22.7\%$ respectivamente, sin embargo, esta diferencia no fué significativa estadísticamente. Estos valores de motilidad progresiva estan de acuerdo con lo reportado por muchos autores. (75%: Faulkner y Pineda, 1978; $71.28 \pm 6.75\%$: López y Valencia, 1982; $82.3 \pm 5.1\%$: Orizaga, - Bustamante, Valencia, 1982).

El total de anormalidades antes de la congelación fué de -- 13.7% para la vagina artificial y 10.7% para el electroeyaculador.

Las anormalidades primarias de los espermatozoides antes de la congelación fueron más frecuentes en el electroeyaculador- $2.6 \pm 6.9\%$ que en la vagina artificial $1.8 \pm 2.3\%$. Según lo reportado en la literatura, éstas anormalidades parecen ser de tipo genético y presentarse en forma constante para cada individuo por lo tanto esta diferencia que también se refleja en el semen - después de descongelar podría ser explicada por el hecho de que algún carnero trabajado con electroeyaculador presentara una mayor frecuencia de éstas anormalidades, o bien, a las diferencias de criterio expresadas por diversos autores al presentar sus cuadros básicos de guía para clasificación de anormalidades.

Las anormalidades secundarias tuvieron una tendencia a ser mayores para la vagina artificial $11.2 \pm 8.8\%$ y $8.2 \pm 5.3\%$ antes y después de la congelación respectivamente que para las -- muestras electroeyaculadas $8.1 \pm 10\%$ y $6.7 \pm 5.5\%$ respectiva--

mente. Estos resultados coinciden con lo reportado por Sahni y Roy, en 1972.

La motilidad progresiva después de la congelación fué sumamente baja en comparación con la motilidad de la muestra y no presentó diferencias significativas entre los dos métodos de recolección.

El pH de la dilución antes de congelar y después de congelar fué superior en las muestras por electroestimulación y las diferencias fueron estadísticamente significativas $p < 0.01$ antes de la congelación y $p < 0.05$ después de descongelar. Sin embargo, los valores permanecieron dentro de los rangos normales reportados para la especie.

El pH presentó en ambos casos una tendencia a ser mayor antes de la congelación que después de ésta y las diferencias -- fueron estadísticamente significativas a $p < 0.01$ en caso del electroeyaculador y $p < 0.05$ en caso de la vagina artificial.

CUADRO 1. CARACTERISTICAS DEL SENEN DE CARNERO, OBTENIDO CON VAGINA ARTIFICIAL Y ELECTROEYACULADOR, ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PASTILLAS (PELLETS) DURANTE LOS MESES DE JULIO A SEPTIEMBRE.

TRATAMIENTO	n	VOLUMEN ml	CONCENTRACION $\times 10^6$	MOTILIDAD PROGRESIVA %		ANORMALIDADES PRIMARIAS %		ANORMALIDADES SECUNDARIAS %		pH DE LA DILUCION	
				FRESCO	DESCONGE GELADO	FRESCO	DESCONGE GELADO	FRESCO	DESCONGE GELADO	FRESCO	DESCONGE GELADO
VAGINA ARTIFICIAL	30	0.51±0.35 a	3729±471.8 a	89.3±7.5 1	15.03±9.3 2**	1.8±2.3 a 1	3.0±2.4 a 2*	11.2±8.8	8.2±5.3	6.8±0.1 a 1	6.7±0.1 2**
ELECTROEYACULADOR	30	0.91±0.35 b*	2441±1358 b**	74.8±22.7 1	13.20±11.3 2**	2.6±6.9 b* 1	1.3±1.4 b* 2**	8.1±10.0	6.7±5.5	7.0±0.1 b** 1	6.8±0.1 2**

Letras diferentes en las columnas representan diferencias significativas.

Números diferentes en los renglones representan diferencias significativas.

(**p < 0.01) (*p < 0.05).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- Las muestras de semen obtenidas por medio de la vagina artificial se podrían considerar de mejor calidad si tomamos en cuenta la concentración espermática, la motilidad progresiva antes y después de la congelación y el pH de la dilución inicial que queda dentro del promedio normal de la especie.

- Las diferencias fundamentales entre el semen obtenido por estos dos métodos son, un mayor volumen en favor del electroeyaculador, lo que incrementa el pH del eyaculado y por lo tanto, el pH de la dilución inicial y una mayor concentración espermática en favor de la vagina artificial lo que representa un mayor aprovechamiento del eyaculado cuando se practica la inseminación artificial.

- Ambas formas de recolección de semen en los ovinos podrían ser utilizadas para la evaluación de sementales antes del empadre, siempre y cuando, se use el mismo método para todos los carneros de una explotación, ya que la concentración y la motilidad progresiva quedan dentro de los rangos normales para la especie.

- Las muestras obtenidas por electroeyaculación podrían ser usadas para conservarse en congelación ya que la recuperación de los espermatozoides expresada en motilidad progresiva no --

mostró diferencias significativas.

- El aumento del pH en las muestras obtenidas con electro-eyaculador podría estar relacionado con un incremento en la presentación de anomalías del acrosoma por lo que se sugiere realizar más trabajos al respecto.

- Aunque la motilidad espermática mostró una tendencia a -- ser menor en los eyaculados obtenidos por estimulación eléctrica, ésta diferencia no fué significativa, por lo que se sugiere realizar ensayos de inseminación de hembras con semen fresco y congelado para evaluar la fertilidad del semen obtenido por ambos - métodos.

B I B L I O G R A F I A .

- Abdelhakeam., Tony S.M., Yassen A.M. y El-Alamy M.A., (1978).
Ram sperm motility aged in glucose and tris buffered extenders
at 5C. Alex. J. Agric. Res. 26 (2) 301-308.
- Acuña M. y Valencia M., (1982). Evaluación de diluentes para con-
gelar semen de borrego Pelibuey. VIII Congreso Nacional de --
Buiatria. 499-500.
- Arbiza S., (1978). Estado actual de la producción animal en México.
Boletín de Rumiantes. Escuela Nacional de Estudios Profesionales
Cuautitlán, U.N.A.M.. 2 (2) 91-122.
- Austin J.W., Leidy R.B., Krise G.M. y Hupp E.W., (1968). Normal
Values for semen collected from Spanish goats by two methods.
Journal of Applied Physiology, Vol. 24, N°3 March. 369-372.
- Bearden H.J. y Fuquay J., (1982). Reproducción animal aplicada. Edi-
torial El Manual Moderno. 127.
- Colas G., Court M., (1976). Storage of ram semen. Sheep Breeding
Proceeding of the 1976 International Congress. Western Austra--
lian Institute of Techonology. 455-466.
- Colas G., (1979). Fertility in the ewe after artificial insemination -
with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influen-
ce of the photoperiod on the semen quality of the ram. Lives---
tock Production Science, 6, 153-166.

- Cupps P. T., McGowan B., Rahlmann D.F., Reddon A.R. y Weir W.C., (1960). Seasonal changes in the semen of rams. *J. Animal Sci.* -- Vol. 19, 208-213.
- Durán del Campo, (1980). Anatomía y fisiología de la reproducción e inseminación de los ovinos. Editorial Hemisferio Sur Uruguay.
- Dziuk P.J., Graham E.F., Donker J.D., Marion G.B. y Petersen W.E., (1954). Some observations in collection of semen from bulls, goats, boars and rams by electrical stimulation. *Veterinary Medicine, - General Practice.* 455-458.
- Faulkner L.C. y Pineda M.H., (1978). Inseminación artificial. En: -- Reproducción y endocrinología veterinarias. Segunda Edición. Ed. Interamericana. 288-325.
- First N.L., Henneman H.A., Magee W.T., Williams J.A., (1961). - The frozen storage of ram semen. *Jour. of Anim. Sci.* 20, 74-78.
- Foote R.H., (1980). Artificial insemination. In: *Reproduction in --- farm animals.* 4th. Ed. Lea and Febiger. U.S.A., 521-545.
- Graham E.F., Crabo B.G., Pace M.M., (1975). Current status of - semen preservation in the ram, boar and stallion. *J. Anim. Sci.* 37; 80-118.
- Hackett A.J., Juskeep E.K., Robertson H.A., Sherestha J.N.B. and Wolynetz M.S., (1979). Comparison of artificial insemination and natural mating on reproductive performance of five strains of - sheep during the anestrus season in an intensive system. *Can.J. Anim. Sci.* 59: 675-683.

- Inskeep E.K., (1974). Artificial insemination and preservation of ram semen. West Virginia University Agricultural Experiment Station. Bulletin 629. 5-24.
- Kendrick J.W., (1978). Semen handling and evaluation. En: Temas selectos en reproducción. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Reproducción. México. 134-154.
- Langford G.A., Marcus G.J., Hackett A.J., Ainsworth L., Wolynetz M.S., Peters H.E., (1979). Comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. *Can. J. Anim. Sci.* - 59, 635-691.
- López Cortezo P., (1980). Enciclopedia ilustrada cumbre. Editorial Cumbre S.A.; Vigésima primera edición. Tomo 9. 308-309.
- López G.A.P., Valencia M., (1982). Técnica descriptiva de la colección, evaluación y congelación de semen de carnero Pelibuey. -- VIII Congreso Nacional de Buiatria. 494-498.
- Lunca N., (1965). The present state of artificial insemination in -- sheep and goats. *World Review of Animal Production*. 1 (1), -- 73-80.
- Moss J.A., Melrose D.R., Reed H.C.B., Vandeplassche M., (1979). Spermatozoa, semen and artificial insemination. In: Fertility -- and infertility in domestic animals. 3th Ed. Bailliere Tindall. - London U.K.; 59-91.

- Orizaga J.A., Bustamante G., Valencia J., (1982). Efecto del congelamiento sobre la motilidad progresiva y la estructura acrosomal del espermatozoide de morueco. VIII Congreso Nacional de Buiteria. 504-505.
- Ramírez R.S., (1982). Evaluación de la motilidad y anormalidades en los espermatozoides ovinos antes y después de la congelación de semen en pellets. Tesis de Licenciatura, F.E.S.-C., U.N.A.M.
- Rao B.R. y Pandey J.N., (1977). Preservation of semen of Corriedale and Nali rams in different diluents. Indian Journal Animal Sciences. 47 (4) 193-196.
- Rhodes A., (1980). Semen collection and evaluation. In: Current therapy in theriogenology; Diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. 944-950.
- Sahni K.L. y Roy A., (1972). A note on seasonal variation in the occurrence of abnormal spermatozoa in different breeds of sheep and goat under tropical conditions. Indian F. Anm. Sci. 42; 501-504.
- Sorensen A.M. Jr., (1979). Animal reproduction; principles and practices. Ed. McGraw Hill Publications in the Agricultural Sciences. U.S.A.
- Visser D., (1974a). Recent advances in the deep-freeze preservation of ram semen. S. Afr. J. Anm. Sci., 4, 275-288.

Visser D., (1974b). The effect of pellet volumen, dilution rates pre-freezing and at thawing temperature on the survival and acrosome-morphology of frozen ram spermatozoa. S. Afr. J. Anim. - Sci., 4, 147-155.

Zemjanis Raymound, (1973). Examen del semen. Patología Clínica - Veterinaria. Unión Tipográfica Editorial Hispano Americana, México. 506-519.

A N E X O 1

PREPARACION DEL SEMEN DE CARNERO EN PELLETS.

1. - Obtención del semen.

Prepare el carnero y tome la muestra bajo condiciones higiénicas.

2. - Evaluación del semen.

a) Examen macroscópico: (Volumen, Color y Concentración).

b) Examen microscópico: (Motilidad y Anormalidades).

3. - Diluyente.

Dilución de lactosa al 11%	75.3%	75.3	37.65	18.823
Yema de huevo	20.0%	20.0	10.00	5.000
Glicerina	4.7%	4.7	2.5	1.175
Total	100.0%	100ml	50.1ml	24.99ml

Penicilina -----1000 UI/ml.

Estreptomocina ----- 1 mg/ml.

4. - Adaptación.

Coloque el semen diluído de 2 a 5 horas en un refrigerador o cuarto frío a 5°C para permitir la adaptación.

5.- Congelamiento.

Para congelar coloque con una pipeta 0.1ml de semen diluido en pequeños orificios hechos en hielo seco (CO_2 sólido a -79°C).

Después de 5 minutos retire los pellets del hielo seco y colóquelos en Nitrógeno líquido.

6.- Descongelamiento.

Tome un pellet y colóquelo en 0.9ml de medio descongelante.

a) Leche estéril.

b) Citrato de Sodio (NaOH_3) al 2.9%.

A N E X O 2

TECNICA DE TINCION DE EOSINA-NIGROSINA PARA CON --
SERVACION DE LA MORFOLOGIA EN LOS ESPERMATOZOI-
DES DE CARNERO.

La tinción es una mezcla isotónica que contiene:

10% de Nigrosina.

4% de Eosina.

Se coloca una gota de Eosina sobre un portaobjetos cóncavo, mientras tanto el colorante como el material de cristalería se mantiene a 37°C.

El semen se diluye en proporción 1:100 en citrato de sodio - al 2.9% mantenido en baño maría a 37°C.

Se agregan dos gotas de semen con una pipeta Pasteur.

Posteriormente se agregan dos gotas de Nigrosina a 37°C, - se mezcla suavemente y se espera cinco minutos para realizar - un frotis.