



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**CORRELACIONES ENTRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA
Y LAS ANORMALIDADES ACROSOMICAS EN EL SEMEN
DE CARNERO FRESCO Y CONGELADO EN PASTILLAS
EN TRES DIFERENTES DILUENTES.**

T E S I S

**Que para obtener el Título de:
Médico Veterinario Zootecnista
Presentan**

**MAURO BERNABE SALGADO
BANI TELLO AYALA**



Diréctor de Tesis
M. V. Z. Arturo A. Trejo González

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES - CUAUTITLÁN

Cuautitlán Izcalli, México. 1985

SERVICIO DE EXAMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO



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 está 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.

I N D I C E

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y METODOS	6
RESULTADOS Y DISCUSION	11
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	16
BIBLIOGRAFIA	18
ANEXO	22

R E S U M E N

Un total de cincuenta y nueve muestras de semen de carnero se evaluaron y fraccionaron en tres partes iguales, cada fracción se diluyó en tres diferentes medios; preparados a base de leche, tris, lactosa al 11%, respectivamente. Luego se congelaron en forma de pastillas, que durante quince días se almacenaron en nitrógeno líquido. Con objeto de establecer las correlaciones entre la motilidad progresiva y la morfología del acrosoma de los espermatozoides, comparando además los tipos y cantidad de alteraciones del acrosoma en semen fresco no diluido y en el semen congelado en tres diferentes diluentes. Determinando así, la influencia del diluyente sobre anomalías del acrosoma y la motilidad progresiva del semen descongelado.

Los resultados obtenidos mostraron que la motilidad progresiva fue significativamente superior en el diluyente a base de lactosa.

Las correlaciones entre las anomalías del acrosoma y la motilidad progresiva de los espermatozoides, son inexistentes para el diluyente a base de tris, pero los diluentes a base de leche y lactosa sí las presentaron.

Observándose además que la alteración más frecuente es el hinchamiento del acrosoma en los espermatozoides.

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

Si se tiene en cuenta la situación de la ovinocultura en México, con su población ovina estancada desde hace varios años, la mala calidad genética de la misma, los rebaños pequeños, la dificultad de conseguir machos de buena calidad, agregado al encarecimiento de los seminales de importación se tiene un panorama en el que el uso de la inseminación artificial, es una alternativa a considerar para mejorar el nivel genético del rebaño nacional y con ello mejorar la producción de carne y lana. Además se puede incrementar notablemente el aprovechamiento de un semental y por ende aumentar la distribución de genes deseables en una población. Esto conduce a un mayor y más rápido avance genético que en los sistemas en que se emplea la monta natural. Un carnero utilizado en monta natural a campo puede cubrir entre veinticinco a cincuenta ovejas por empadre, esta cifra se duplica bajo condiciones de monta controlada. Mientras que utilizando inseminación artificial con semen fresco o congelado se pueden inseminar más de cinco mil ovejas con un mismo semental. La inseminación artificial con semen congelado tiene ventajas adicionales tales como; el productor podría beneficiarse con el uso de carneros de excelente calidad genética sin que ello significara la compra, el cuidado, la alimentación y el riesgo de mantenerlo en el establecimiento. Por ello también facilita los programas de cruzamiento (López y Pérez, 1984.). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora son inferiores a los obtenidos con semen fresco. Ello se debe fundamentalmente al daño acrosómico que sufre el espermatozoide de carnero durante el proceso de congelación y descongelación (López y Pérez, 1984.).

No obstante, se han encontrado ocasionalmente resultados satisfactorios de trabajos con semen congelado de carnero en estaciones experimentales. Aunque generalmente se ha observado, una seria pérdida en el poder fertilizante de los espermatozoides al congelado (Salamon, 1967.). Por lo que la congelación de semen ovino, no ha pasado aún del nivel experimental, por lo tanto no se ha desarrollado en forma comercial (Iritani, 1980; citado por Cano, 1981.).

En el presente trabajo se tomaron en consideración algunas características del semen relacionadas con la evaluación y proceso de congelación, tales como; motilidad progresiva, morfología acrosómica, tipo de diluyente y se establecieron las correlaciones existentes entre ellas.

La motilidad progresiva de los espermatozoides proporciona un medio simple para evaluar el estado fisiológico de una muestra de semen, por si misma, ella no es una forma exacta de predecir la capacidad potencial de fecundación de la célula espermática. Sin embargo, la motilidad espermática sigue siendo una herramienta útil para evaluar la viabilidad del espermatozoide (Garner y Hafez, 1980.).

Otro elemento útil para evaluar la viabilidad espermática, es la determinación del estado morfológico del acrosoma (Krause, 1970.). El acrosoma es un saco membranoso delgado de doble capa que se adosa fuertemente al núcleo durante la espermiogénesis, cubre la porción final anterior al núcleo del espermatozoide, es una estructura similar a un capuchón que contiene enzimas proteolíticas (Mc. Rorie y Wi-----

Williams, 1974; Morton, 1976; citados por Garner y Hafez, 1980.). Aunque el daño acrosomal, no se considera como el único factor que influye en la fertilidad después de la inseminación artificial (Mattner -- Entwistle y Martin, 1969; Ligfoot y Salamon, 1970; citados por Tasseron et. al. 1977.). Es importante señalar que el daño acrosomal es más severo en el semen de carnero en comparación a otras especies después de la congelación profunda (Colas, 1980.).

Para observar los cambios acrosomales satisfactoriamente, se empleó la técnica de coloración Wells-Awa, que permite la evaluación de rutina en el microscopio compuesto, sin necesidad del microscopio de contraste de fases (Wells y Awa, 1970.).

El semen de carnero es muy difícil de congelar, por lo que se han desarrollado gran cantidad de diluentes (Larsson, 1978; citado por Foote 1980.), ya que estos ejercen un influjo significativo sobre el porcentaje de espermatozoides móviles, (Roy Choundhury y Bhambhani, 1977.). Las formulaciones más comúnmente recomendadas para diluentes, son a base de yema de huevo, amortiguadores con citrato o preparados con leche calentada (Salisbury y Cols., 1978; citado por Foote, 1980.), se utiliza un carbohidrato simple como fuente de energía que además tiene un efecto deshidratante. La yema de huevo o leche protegen a las células cuando se enfrían de temperatura corporal a 5°C, además proporcionan otros nutrientes, se adicionan también amortiguadores, que mantengan el pH cercano a la neutralidad y una presión osmótica equivalente a la del semen, además se agregan antibióticos que inhiben el crecimiento bacteriano y glicerol que evita la cristalización (Foote, 1980.).

O B J E T I V O S

Establecer las posibles correlaciones entre la morfología acrosómica y la motilidad progresiva de espermatozoides procedentes de dos razas ovinas, congelados en pastillas en tres diferentes diluentes.

Comparar y determinar los tipos de alteraciones acrosómicas de los espermatozoides de carnero, en el semen fresco y en el semen congelado en pastillas, almacenado durante quince días en nitrógeno líquido.

Determinar la posible influencia del diluyente sobre la motilidad progresiva y anomalías acrosómicas de los espermatozoides de carnero, durante el proceso de congelación y descongelación.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en Cuautitlán Izcalli Estado de México y que se localiza geográficamente a 2,450 metros sobre el nivel del mar y a $19^{\circ} 43'$ latitud Norte y $99^{\circ} 14'$ de longitud Poniente (García, 1973.).

Durante los meses de abril, mayo y junio de 1984, se obtuvieron cincuenta y nueve muestras de semen procedentes de dos carneros Suffolk y dos de raza Rambouillet, todos entrenados para trabajar con vagina artificial.

Las vaginas utilizadas consistían de un tubo rígido de material plástico, una funda de polietileno y un cono del mismo material, el tubo-colector (tubo graduado de centrifuga), con su protector correspondiente.

La temperatura y la presión interior de la vagina se logró llenándola con agua caliente a 50°C .

Obtenidos los eyaculados, se medía el volumen del semen, el cual se conservó a una temperatura de 37°C en un baño maría.

Para evaluar la motilidad progresiva y la morfología acrosómica de los espermatozoides en semen fresco, se hacía una dilución 1:100 (V/V) lográndose ésto al depositar 0.1 ml. de semen en un tubo de ensaye, que previamente contenía 9.9 ml. de una solución de citrato de sodio al 2.9% y con la temperatura adecuada proporcionada por el baño maría.

La motilidad progresiva se determinó en un microscopio compuesto con el objetivo seco débil (10x) y con el que se observó una gota de semen fresco diluido sobre un portaobjetos. El campo fué observado por tres personas, por lo que se determinó el porcentaje promedio del número de espermatozoides en movimiento. El microscopio estaba equipado con una platina caliente mantenida a una temperatura de 35-40°C.

Para determinar alteraciones acrosómicas en el semen fresco se preparó un frotis a partir de la mezcla de una gota de colorante según la técnica Wells-Awa, y una gota de semen diluido, todo el material y reactivos a la temperatura de 35-40°C para evitar alteraciones espermáticas causadas por cambios térmicos.

El procedimiento siguiente era dividir el semen en tres porciones iguales para agregar en cada alícuota un diluyente diferente, previamente preparado.

El primer diluyente fué preparado con leche descremada calentada a 95°C durante diez minutos, para inactivar la lactenina, que es una sustancia espermiotóxica presente en la leche (Vinha y Coubrough, 1972; Foote, 1980; López y Pérez, 1984.).

El segundo diluyente fué a base de lactosa al 11% (Roy Choudhury y Bhambhani, 1977.).

El tercer diluyente preparado a base del amortiguador orgánico denominado Tris (Hidroximetil-aminometano), con el cual han trabajado varios investigadores obteniendo buenos resultados (Salamon y Visser, 1972; Abdelhankeam, 1978; Fukui, 1979; Acuña y Valencia, 1982).

La proporción final semen-diluyente fué de 1:3 (V/V). (Anexo 1).

El periodo de adaptación se realizó utilizando vasos de poliestireno donde eran colocadas las alcuotas en tubos de ensaye, sumergidos en agua caliente del baño maría e inmediatamente metidos al refrigerador con una temperatura aproximada de 5°C. Al completarse las dos horas del periodo de adaptación se procedió a congelar el semen. Utilizándose para esto un bloque de bióxido de carbono sólido, al que se hicieron orificios a manera de moldes que dan la forma de pastillas.

Las pastillas de semen congelado, fueron depositadas en envases adaptados de los utilizados para pajillas de semen bovino y almacenadas en nitrógeno líquido durante quince días.

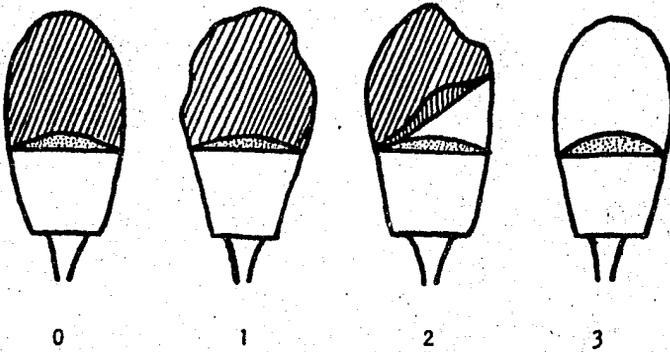
Al término del periodo de almacenamiento se descongeló el semen en una solución de citrato de sodio al 2.9% con una temperatura de 37°C durante cinco minutos (Trejo, 1983). Al cabo de esto se evaluaba la motilidad progresiva y se elaboraban laminillas con la técnica ya descrita, para cuantificar las alteraciones acrosómicas de los tres diferentes diluentes.

Se observaron cuatro laminillas por cada muestra colectada, una de ellas correspondió al semen fresco y las tres restantes a cada uno de los diluentes después de la congelación. Esto se realizó observando al microscopio compuesto con el objetivo de inmersión (100x)*; se evaluaron cien espermatozoides por cada laminilla tomando en consideración la clasificación de Watson y Martin:

Normal, Hinchado, Roto y Ausente, refiriéndose estas características al estado del acrosoma espermático (Fig. No. 1.).

FIGURA NO. 1

ESPERMATOZOIDES CON DIFERENTES GRADOS DE ALTERACION DEL ACROSOMA.



- 0 - Espermatozoide con acrosoma normal.
- 1 - Espermatozoide con acrosoma abombado e hinchado.
- 2 - Espermatozoide con acrosoma roto y separado parcialmente.
- 3 - Espermatozoide que ha perdido totalmente el acrosoma (Ausente).

Clasificación según Watson y Martin, (1972).

Los resultados fueron procesados por el Centro de Estadística y Cálculo, del Colegio de Postgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo.

El análisis de varianza en arreglo totalmente azarizado en cincuenta y nueve bloques y tres tratamientos (Steel y Torrie, 1980.).

* Multiplíquese por (10X) del ocular.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dentro de las características generales del semen se observó que el volumen y la concentración fueron mayores para la raza Rambouillet, sin embargo estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Asimismo la motilidad progresiva de los espermatozoides fué muy superior en el semen fresco con respecto al congelado (cuadro no. 1).

El semen descongelado mostró una motilidad progresiva mayor en el diluyente a base de lactosa, ésta diferencia fué estadísticamente significativa ($P < 0.01$). Esto coincide con lo reportado por Aandal y -- Anderson (1968), para el uso de la lactosa, pero es muy bajo comparado con los resultados reportados por Fukui (1979), usando diluyente a base de Tris.

Las anomalías del acrosoma no mostraron diferencias significativas entre los diluyentes (cuadro no. 2).

En cuanto a las correlaciones entre anomalías acrosómicas y la motilidad progresiva de los espermatozoides, se observó que tanto en el semen fresco como en el congelado en Tris, no existieron estas correlaciones, aunque estas sí se presentaron en los diluyentes a base de leche y lactosa.

Lo que indica un efecto del diluyente sobre la presentación del daño acrosomal. Estas correlaciones se presentaron con signo negativo para el tipo de anomalía más abundante que fué la hinchazón del acrosoma y ésto se reflejó en el total de anomalías del ca--

puchón cefálico, ésto es acorde con los resultados obtenidos por Tasserón et. al. (1977), también Watson y Martin (1972), reportan que el principal deterioro acrosomal del semen durante el proceso de congelación y descongelación fué el hinchamiento. Si bien el daño acrosomal es causante de infertilidad, mucho más importante es la motilidad progresiva de los espermatozoides (Tasserón, Amir y Schindler, - 1977).(cuadro No. 3).

Un efecto de la raza se manifestó sobre la cantidad de acrosomas hinchados, observandose mayor cantidad de éstos en el semen de carnero-Rambouillet.

C U A D R O N O . 1

CARACTERISTICAS GENERALES DEL SEMEN DE CARNERO, RECIEN COLECTADO Y DESPUES DE LA CONGELACION EN PASTILLAS USANDO TRES DILUENTES DIFERENTES.

RAZA	VOLUMEN	CONCENT.	MPF.	MPM.	MPL.	MPT
SUFFOLK	.65	4187	78.8	4.5	11.8	3.44
RAMBOUILLET	.74	5490	79.3	3.6	8.0	3.44

MPF. Motilidad progresiva del semen fresco.

MPM. Motilidad progresiva del semen descongelado, diluido a base de leche.

MPL. Motilidad progresiva del semen descongelado, diluido a base de lactosa.

MPT. Motilidad progresiva del semen descongelado, diluido a base de Tris.

CUADRO N O . 2

MOTILIDAD PROGRESIVA Y PORCENTAJE DE ANORMALIDADES DEL ACROSOMA EN EL SEMEN DE CARNERO (EVALUACION HECHA AL DESCONGELADO).

	LECHE	LACTOSA	TRIS
MOTILIDAD PROGRESIVA	4.0 ^a	9.6 ^b	3.44 ^a
ACROSOMAS HINCHADOS	25.7 ^a	20.2 ^a	23.5 ^a
ACROSOMAS ROTOS	4.7 ^a	5.4 ^a	5.6 ^a
ACROSOMAS AUSENTES	1.1 ^a	2.3 ^a	1.2 ^a
TOTAL DE ACROSOMAS ANORMALES	31.0 ^a	28.0 ^a	30.0 ^a

Análisis de varianza, letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.01$).

C U A D R O N O . 3

CORRELACIONES ENTRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA Y LAS ANORMALIDADES ACROSOMICAS DEL SEMEN DE CARNERO, RECIEN COLECTADO (FRESCO) Y - CONGELADO EN PASTILLAS CON TRES DIFERENTES DILUENTES.

		ANORMALIDADES ACROSOMICAS				
		HINCHADOS	ROTOS	AUSENTES	TOTAL	
MOTILIDAD PROGRESIVA	FRESCO	S	NS	NS	NS	NS
		R	NS	NS	NS	NS
		TOTAL	NS	NS	NS	NS
	LICHE	S	NS	NS	NS	NS
		R	-0.37 0.03 33	NS	NS	-0.34 0.04 33
		TOTAL	-0.32 0.01 58	NS	NS	NS
	LACTOS	S	NS	NS	NS	NS
		R	-0.51 0.002 33	NS	NS	-0.43 0.01 33
		TOTAL	-0.35 0.007 58	NS	NS	-0.29 0.02 58
	TRIS	S	NS	NS	NS	NS
		R	NS	NS	NS	NS
		TOTAL	NS	NS	NS	NS

NS - No significativo. S - Suffolk. R - Rambouillet.

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

En base a los resultados obtenidos, se observó que los diluentes a base de leche y lactosa presentaron una correlación negativa entre anomalías del acrosoma y la motilidad progresiva de los espermatozoides; mientras que en el diluyente a base de Tris no hay esta correlación. Lo anterior indica un efecto del diluyente sobre la presentación del daño acrosomal.

La motilidad progresiva fué mayor en el diluyente a base de lactosa - lo cuál es estadísticamente significativo ($P < 0.01$).

En relación a las anomalías del acrosoma de los espermatozoides, concluimos que la más frecuente en los tres diluentes fué el hinchamiento del acrosoma espermático.

De las dos razas muestreadas, la Rambouillet presentó mayor volumen, concentración y acrosomas hinchados.

Sin embargo, debido al número reducido de animales empleado, los resultados no son significativos. Por lo tanto recomendamos que se trabaje con un número mayor de animales. Además que se tomen en cuenta factores de gran importancia al congelar semen ovino, tales como: Época del año, edad de los sementales, fertilidad de los mismos, técnica de recolección de semen, tipo de diluyente, el periodo de adaptación, método de congelación, tiempo de almacenamiento, solución descongelante, temperatura usada al descongelar y algo de importancia relevante que deberá considerarse que es la pureza química de los componentes del diluyente.

Las técnicas de congelación de semen ovino, no son nada satisfactorias aún, es por ésto que la inseminación artificial en ésta especie no se practica en forma comercial. De esto se desprende la urgente necesidad de mejorar dichas técnicas y así poder aprovechar los beneficios que reporta el uso de la inseminación artificial como en otras especies.

Finalmente, como ha mencionado Cano (1981) recomendamos; que todo posible aumento de la eficiencia de las técnicas de congelación de semen de carnero, deberá fundamentarse en un aumento de la protección conferida a las membranas espermáticas, por la adición de sustancias capaces de constituir protectores sobre las mismas.

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

- 1.- Abdelhakeam S.M.T., Tassen A.M. and El-Alamy M.A., (1978).
"Ram sperm motility aged in glucose and Tris buffered extenders—
at 5°C".
Journal Agric. Research., 26(2); 301 - 308.
- 2.- Acuña A.M., y Valencia Z.M., (1982).
"Evaluación de diluentes para congelar semen de borrego Pelibuey"
Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México.
Octubre: 594-599.
- 3.- Cano E.A., (1981).
"Congelación de semen de carnero".
Terceras jornadas Veterinarias de ovinos. Centro Médico de Tacua-
rembo, Uruguay: 8 pp.
- 4.- Colas G. (1980).
"Suggest international standars for ram semen exchange".
9th. Int. Congress. Animal Reprod. I.A. Madrid España: RT-G-4.
- 5.- Foote R.H., (1980).
Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.
"Inseminación Artificial".
4a. Ed. Editorial Interamericana: Pag. 497-520.
- 6.- Fukui Y. (1979).
"Effects different diluents, thawing temperatures and materials -
of thawing containers on survival of ram spermatozoa frozen by —

the pellet methods".

Japan J. Anim. Reprod, 25; 160-169.

7.- García E. (1973).

"Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köpen.
Universidad Nacional Autónoma de México.

8.- Garner D.L; Hafez E.S.E. (1980).

"Espermatozoide".

Reproducción e Inseminación Artificial en Animales.

4a. Ed. Editorial Interamericana; Pag. 160-180.

9.- Krause D. (1970).

"Modern Methods for Evaluation of Deep-Frozen Semen".

Reprod. Artif. Insem. National Ass. Anim. Breeders February: 3-16.

10.- López P. A., Pérez C. R. (1984).

"Inseminación Artificial en Ovinos".

Memorias del curso Bases de la crfa ovina".

Toluca, México: Pag. 52-58.

11.- Roy Choudhury P.N. and Bhamhani G. (1977).

"Pellet freezing of ram spermatozoa".

Zbl. Vet. Med. A. 24, 696-700.

12.- Salamon S. and Visser D. (1972).

"Effect of composition of tris-based-diluent of thawing solution-
on survival of ram spermatozoa frozen by pellet method".

Aust. J. Biol. Sci. (25); 605-608.

13.- Shani K. L. and Roy A. (1972).

"A study on the effect of deep-freezing-79°C on post-thawing - revival of sheep and goat spermatozoa".

Indian J. Anim. Sci. 42(2); 102-105.

14.- Steel, R.G.D., and Torrie J.H. (1980).

"Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach"

2nd. Ed. Mc. Graw Hill. U.S.A.

15.- Tasseron F., Amir D., and Schindler H. (1977).

"Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling -- and freezing".

J. Reprod. Fert., 51; 461-462.

16.- Trejo G. A. (1983).

"Congelación de Semen de carnero en pastillas (pellets).

1.- Efecto de la congelación sobre la motilidad progresiva, la morfología espermática y la fertilidad".

Memorias Reunión de Investigación Pecuaria en México 30-2.

Noviembre-Diciembre: 110-113.

17.- Vinha N.A. and Coubrough R.I. (1972).

"Gelatinized media for diluting ram semen a preliminary report - concerning in vitro trials".

J.S. Afr. Vet. Med. Ass. 43(3): 267-270.

18.- Watson P. F., and Martin I.C.A., (1972).

"Comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and -
bull spermatozoa".

J. Reprod. Fert., 28; 99-101.

19.- Wells M.E., and Awa O.A. (1970).

"New technique for assessing acrosomal characteristics of sperma
tozoa".

J. Dairy Sci., 53(2):227-232.

CONTENIDO DE LOS DILUENTES EMPLEADOS EN ESTE TRABAJO.

	1	2	3
Leche descremada calentada durante 10 minutos a 92°C.	46.3 ml.		
Lactosa al 11%		36.3 ml.	
Tris			1.63 g.
Yema de huevo		10.0 ml	10.0 ml.
Acido cítrico			0.915 g.
Fructuosa			0.675 g.
Glicerol	3.5 ml.	3.5 ml.	3.5 ml.
Penicilina 800,000 U.1/2 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
Estreptomicina 1 g./2 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.	0.1 ml.
Agua destilada			c.b.p 50.0 ml.
T o t a l	50.0 ml.	50.0 ml.	50.0 ml.