

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán



Comparación de la Motilidad Progresiva del Semen de Carnero Merino Australiano ántes y después de la Congelación en Pajillas Centrifugando y sin Centrifugar, utilizando dos clases de Diluentes

## TESIS

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS

SUPERIORES CUAUTITLÁN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

### MEDICO VETERINARIO ZOTECNISTA



PRESENTA:

SECCION DE EXAMENES

ARTURO RANGEL NERI

ASESOR:

M.V.Z. Arturo A. Trejo González

1985



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 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

	Pag.
I.- INTRODUCCION	1
II.- OBJETIVOS	6
III.- MATERIALES Y METODOS	7
IV.- RESULTADOS Y DISCUSION	16
V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	21
VI.- BIBLIOGRAFIA	22

## I.- INTRODUCCION

La Ovinocultura Nacional ha mostrado en los últimos treinta años un decremento considerable en la producción de carne y lana, debido a múltiples factores, señalándose como los más importantes; el empleo de tradicionales técnicas de manejo, insuficiente -- asesoría técnica especializada, deficiente capacitación y organización de productores, mala planeación en la producción y conservación de forrajes, inadecuado manejo de las áreas de pastoreo, escasez de infraestructura y anacrónicos sistemas de comercialización ( SARH, 1980 ).

La carencia de eficientes programas reproductivos y de mejoramiento genético han dado origen a los cruzamientos sin control, trayendo como consecuencia la degeneración genética del ganado ovino nacional, ya que el 95% de la población es considerada de tipo criollo, con un potencial productivo bastante bajo - ( Moreno, 1976 ).

Nuestro país, a pesar de los factores antes mencionados, reúne las características geográficas, sociales y económicas para lograr la autosuficiencia, tanto en la producción de lana como de carne de ovino. Por ello es de suma importancia desarrollar y -

aplicar técnicas adecuadas que logren hacer de esta ganadería una industria altamente rentable y productiva.

Tal sería el caso de la Inseminación Artificial, la cual tuvo su primer uso en el año de 1780 por Spallanzani, fisiólogo italiano, al lograr por este método cachorros caninos viables ( Hafez, - - 1980 ).

Esta técnica se ha empleado en forma intensiva desde el año de 1940 en Rusia, reportándose una producción de 200 a 500 corderos producto de un solo semental por año, en casos aislados se han obtenido hasta 10,000 animales en una estación reproductiva, en dicho país ( Jheltobruch, 1979 ).

Con la aplicación exitosa de la Inseminación Artificial el mejoramiento genético de esta especie se aceleraría, obteniéndose animales cada vez más especializados y de mayor productividad, evitando así la fuga de divisas con la adquisición de animales del extranjero, la propagación de enfermedades venéreas que afectan la reproducción y se cubriría un mayor número de vientres a menor costo, pudiéndose además aplicar esta técnica en determinadas épocas del año, mediante la sincronización de calores,

lográndose producir así una mayor cosecha de corde-  
ros al año ( Bustamante y Valencia, 1981 ).

La Inseminación Artificial en ovinos ha sido --  
más utilizada con semen fresco, ya que al aplicar --  
semen congelado se han obtenido bajos porcentajes --  
de fertilidad ( Hackett, et. al., 1979. López y --  
Valencia, 1982 ).

First et. al., ( 1961 ); Colas y Court ( 1976 )  
y Langford et. al., ( 1979 ), han considerado que --  
al resolverse el problema de la congelación de se- --  
men de carnero, la ovinocultura se podría benefi- --  
ciar con la Inseminación Artificial, tanto como lo --  
ha hecho la ganadería bovina.

Se ha mencionado que los espermatozoides de --  
carnero no sobreviven durante largos períodos de --  
tiempo, a menos que se les agreguen diluyentes, los --  
cuales deben aportar energía, proteger contra los --  
efectos del enfriamiento, actuar como amortiguado- --  
res del P.H. ácido, mantener la presión osmótica y --  
el equilibrio electrolítico de dichas células - --  
( Hafez, 1980 ).

Algunos autores han señalado que entre las posi-  
bles causas de los pobres resultados de fertilidad,--

logrados con semen congelado en borregos, está el daño acrosomal de los espermatozoides por la congela--ción, ocasionado por falta de protección al cambio -térmico ( Healey 1969; Wattson y Martin, 1972 ).

Gustafsson ( 1978 ) y Bustamante ( 1980 ), coin--ciden al mencionar que con la técnica de congelación, el semen de morueco presenta débil recuperación de -la motilidad espermática post-descongelado, además -del daño acrosomal de los espermatozoides, reducién--dose la fertilidad.

Bustamante y Valencia ( 1981 ), encontraron que con el diluyente yema de huevo-tris, es suficiente -para proteger la integridad acrosomal durante el pro--ceso de congelación, mas no la motilidad espermática. No obstante, dichos autores al congelar semen con un diluyente a base de yema de huevo-tris más glicerol, observaron una mayor motilidad de los espermatozoi--des ( 31.2% ), con alto número de células con acroso--ma normal ( 59.5% ).

Sin embargo Bustamante y Valencia ( 1981 ), lo--graron menores resultados después de congelar semen--de ovinos pelibuey con tris fructosa-ácido cítrico --yema de huevo y glicerol, obteniéndose una motilidad--progresiva del 19.4%, así como también al emplear -

un diluyente compuesto por tes-tris-glucosa-yema de huevo y glicerol con 21.4% de espermatozoides móviles.

El presente estudio tuvo como finalidad, evaluar la motilidad progresiva, posterior al descongelado de semen de carnero Merino Australiano con y - sin centrifugación y diluido con dos diferentes fórmulas.

## II. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES: Contribuir a la búsqueda - de la técnica más viable - para lograr la implementación exitosa de la Inseminación Artificial con semen congelado de ovino.

OBJETIVOS ESPECIFICOS: Evaluar y comparar la motilidad progresiva del semen de carnero Merino Australiano antes y después de - la congelación en pajillas utilizando dos clases de - diluentes con y sin centrifugación de los espermatozoides.

### III. MATERIAL Y METODO

El presente trabajo se desarrolló en el Centro Nacional de Fomento Ovino, ubicado en el municipio de Chapa de Mota, Estado de México, bajo condiciones de clima templado sub-húmedo, con lluvias en verano. C ( W<sub>2</sub> ) ( W ) b ( e' ) g. ( Estado de México, - 1976 ).

#### M A T E R I A L

Se utilizaron 10 sementales de la raza Merino-Australiano; importados de Australia. El equipo básico para recolectar y congelar semen estuvo constituido por vaginas artificiales, termómetros con rango de -20°C a 120°C, microscopios bifocales de interfase con platina, espectrofotómetro, centrífuga, horno esterilizador, baño maría, balanza, termo para nitrógeno y hielo seco. Además se utilizó diverso material de laboratorio, como pipetas terminales de .1 ml. y 10 ml., matraces erlenmeyer, tubos de centrífuga graduados, probetas, vasos de precipitado, porta objetos, cubre objetos y pajillas francesas para congelar el semen.

Los reactivos empleados fueron tris ( Hidroximetil - Aminometano ), fructosa, Acido Cítrico, Ci-

trato de Sodio, Glicerol, yema de huevo, leche, Nitrógeno líquido, agua destilada, antibióticos ( Estreptomomicina y Penicilina ) y solución Hartman.

## M E T O D O

Se entrenó por cuatro días a 10 sementales de la raza Merino Australiano, para que sirvieran en vagina artificial ( V.A. ), utilizando para ello -- una oveja ovariectomizada.

Una vez familiarizados los carneros con este método se procedió a la recolección de semen, dando previamente dos montas falsas a los carneros con el objeto de lograr una mejor excitación y mayor volumen por eyaculado..

La vagina artificial ( V.A. ) fué preparada a una temperatura de 41 - 44°C al momento de la recolección y lubricada con solución KY, ( Rhodes, 1980).

Después de obtenido el semen fué depositado inmediatamente en baño maría a temperatura de 28°C. Determinándose posteriormente volumen, concentración, motilidad masal e individual del eyaculado.

El volumen fué cuantificado en el mismo tubo -

graduado que se utilizó para la recolección del semen, la concentración espermática fué determinada mediante espectrofotometría, previa dilución del semen ( 1:100 ) en una solución de Citrato de Sodio al 2.9%. La motilidad masal, se calculó por observación microscópica de una gota de semen colocada entre porta y cubreobjetos a una temperatura de 40°C, calificándose con valores del 0 al 4 ( Zemjanis, -- 1980 ) y por último la motilidad progresiva se evaluó en forma similar, con la diferencia de que la gota previamente fué diluida ( 1:100 ) en una solución al 2.9% de Citrato de Sodio, calificándose la muestra en escala porcentual.

Se realizó la dilución y congelación de 60 - - muestras de los diez animales al azar, formándose - dos lotes, compuestos cada uno por 30 muestras, de las cuales 15 de cada grupo fueron sometidas previamente a centrifugación con solución Hartman ( 1:5 ), durante 10 minutos a 300 rpm. a una temperatura de 30°C, las muestras restantes de cada lote, fueron - congeladas sin centrifugar ( Cuadro No. 1 ).

El lote 1 se empleó el diluyente AI, a base de tris - fructosa - ácido cítrico - agua destilada -- yema de huevo y antibióticos. Y el diluyente AII -- que consistió en una fórmula que contenía 94% de la

solución AI y 6% de glicerol ( Cuadro No. 2 ).

En el lote 2 se utilizó el diluyente BI consti-  
tuido por leche y antibióticos y la fórmula BII cu-  
yos componentes eran leche y glicerol al 88.0% y - -  
12.0% respectivamente ( Cuadro No. 3 ).

Para diluir las muestras del lote 1 se realizo-  
la siguiente ecuación.

$$\frac{\text{Volumen X Concentración X Motilidad Progresiva}}{300 \times 10^6 \text{ espermatozoides}} = \text{Número de do-} \\ \text{sis a prepa-} \\ \text{rar y canti-} \\ \text{dad de dilu-} \\ \text{yente AI y -} \\ \text{AII a adicio-} \\ \text{nar.}$$

Una vez calculado el total de diluyente a em- -  
plearse, se agregaron a las muestras 50% de la fórmu-  
la AI a temperatura de 28°C y posteriormente cada 30  
minutos se les añadió, 12.5% de la fórmula AII a - -  
50°C, repitiéndose esta operación, hasta complemen--  
tar el 50% restante de dicha solución, con el objeto  
de descender la temperatura paulatinamente en un lap-  
so de 2 horas.

El semen del lote 2 fué diluido, en base a la misma fórmula matemática empleada con el grupo I -- así como la adición de los diluyentes BI y BII - - ( 50% del primero y 50% del segundo en cuatro fracciones ).

El envasado de las 60 muestras, se efectuó en pajillas de tipo francés de 0.5 ml. y posteriormente fueron depositadas en hielo seco durante 15 minutos (  $-79^{\circ}\text{C}$  ) luego se introdujeron en un termo de nitrógeno líquido a una temperatura de  $-190^{\circ}\text{C}$  durante un lapso de 8 días.

#### METODO DE DESCONGELADO

Para descongelar el semen, las pajillas se colocaron en baño maría a temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  durante sesenta segundos. Evaluándose inmediatamente la motilidad progresiva del semen, previa dilución - - - ( 1:100 ) en solución de citrato de sodio al 2.9%, - en microscopio con platina caliente a  $40^{\circ}\text{C}$ , utilizándose para ello la misma escala porcentual empleada en la calificación antes de la congelación.

Los porcentajes obtenidos de motilidad progresiva con y sin centrifugación, antes y después de la congelación se evaluaron estadísticamente, median

te la prueba de análisis de varianza, ( Steele y --  
Torrie, 1960 ). Factorial 2 x 2 con bloques al azar.

CUADRO No. 1

DISEÑO EXPERIMENTAL

TOTAL DE MUESTRAS 60	
Lote 1	15 Centrifugadas
30 Muestras Diluyente A	15 No Centrifugadas
Lote 2	15 Centrifugadas
30 Muestras Diluyente B	15 No Centrifugadas

CUADRO No. 2

COMPOSICION DE DILUYENTE AI			
REACTIVO		CONCENTRACION	
B	Tris	3.08	grs.
U	Fructosa	1.25	grs.
F	Acido Cítrico	1.67	grs.
F	Agua destilada c.b.p.	100.00	ml.
E			
R			
	Solución Bufer	80.00	ml.
	Yema de huevo	20.00	ml.
	Penicilina	400,000	U.I.
	Estreptomina	1.0	grs.
DILUYENTE AII			
	Diluyente AI	94%	
	Glicerol	6%	

CUADRO No. 3

COMPOSICION DEL DILUYENTE BI	
REACTIVO	CONCENTRACION
Leche	24.5 ml.
Penicilina	1000 U.I./ml.
Estreptomocina	.01 grs./ml.
DILUYENTE BII	
Leche	22.0 ml.
Glicerol	3.0 ml.

#### IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos en el porcentaje de la motilidad, progresiva -- del semen Merino Australiano antes y después de la congelación en dos diluyentes, centrifugado y sin centrifugar.

La motilidad progresiva antes de congelar no -- mostró diferencias significativas para el diluyente o para la centrifugación, encontrándose un rango de 73.0 a 77.3%. Los valores de motilidad progresiva post-descongelado se vieron afectados respecto al diluyente, siendo la mayor motilidad, la observada en el diluyente tris de 27.7% y 22.0%, para las -- muestras centrifugadas y sin centrifugar respectivamente. Estos valores fueron diferentes estadísticamente (  $P < 0.01$  ), a las diluidas en leche que presentaron una motilidad del 13.7% y 8.4% con y sin centrifugación respectivamente.

La motilidad progresiva post-descongelado -- ( 27.7 ) de las células espermáticas, diluidas con tris - fructosa - ácido cítrico - yema de huevo - glicerol y sometidas a centrifugación fué superior a lo obtenido por Bustamante y Valencia ( 1981 ), -- López y Valencia ( 1982 ) los cuales lograron una --

motilidad post-descongelado del 19.4% y 19.9% respectivamente utilizando los mismos diluyentes tris - fructosa - ácido cítrico - yema de huevo y glicerol. Esta diferencia tal vez fué ocasionada por el efecto de la centrifugación de los diluentes utilizados.

Bustamante y Valencia ( 1981 ), lograron una motilidad progresiva del 31.2% mediante la utilización de diluyentes a base de yema de huevo-tris y glicerol, lo cual supera a lo obtenido en el presente trabajo. Posiblemente esto pueda ser atribuible a que el método de congelación empleado en el presente estudio, - fué diferente al utilizado por dichos autores, ya - que ellos utilizaron Vapor de Nitrógeno y en el presente se utilizó hielo seco. Pudiendo influir además los ingredientes y concentración empleadas para la preparación de los diluyentes.

Mann ( 1964 ) cita con posibles causas de la -- disminución de la motilidad espermática, la remoción o alteración de componentes celulares a un trastorno en el intercambio iónico, involucrando al potasio y quizá a los fosfatos que se alteraron en la dilución del semen. Es posible que el mecanismo de inactivación espermática por dilución y lavado, sea básicamente parecido al envejecimiento del espermatozoide cuando es almacenado, por hinchamiento y degeneración del complejo lipoprotéico, seguido por cambios-

físicos y químicos, como la oxidación de grupos Sulfhidrilos intracelulares , esenciales para la movilidad normal: Disminución en el contenido de coenzimas vitales como el ATP e incremento en la permeabilidad espermática, lo cual ocasiona la pérdida de proteínas intracelulares.

TABLA 1.

RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PORCENTAJE DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN DE CARNERO MERINO AUSTRALIANO ANTES Y DESPUES DE LA CONGELACION EN DOS DILUENTES CENTRIFUGADO Y SIN CENTRIFUGAR.

	CENTRIFUGADO		SIN CENTRIFUGAR	
	Antes de Congelar	Después de Congelar	Antes de Congelar	Después de Congelar
LECHE	73.6      a	13.7      c	73.0      a	8.4      c
TRIS	73.3      a	27.7      b	77.3      a	22.0      b

Letras diferentes en los renglones o las columnas representan diferencias significativas ( P <0.01 )

CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA PARA EL EFECTO DEL DILUENTE  
LA CENTRIFUGACION Y LA INTERACCION EN SEMEN CONGELADO  
DE CARNEROS MERINO AUSTRALIANO

F.r.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	Significancia
Total	119	111950.86	940.76	—	
Tratamiento	3	2192.76	730.92	4.37	**
Diluyente	1	1930.84	1930.84	11.15	**
Centrifugación	1	166.74	166.74	0.99	NS
Interacción	1	95.18	95.18	0.56	**
Bloques	29	95337.60	3262.29	29.56	**
Error	87	14538.4	167.10	—	

Factorial 2 X 2

Arreglo de bloques aleatorios

\*\* ( P < 0.01 )

## V.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El principal factor que limita el uso del semen congelado en el ganado ovino es la baja motilidad espermática que presenta después de la congelación, ya que no se ha encontrado un diluyente eficaz que proteja a los espermatozoides durante la congelación.

Bajo la metodología empleada en el presente trabajo, se concluye que, el diluyente tris es mejor que el diluyente leche y que el efecto de la centrifugación proporciona mejores resultados.

Finalmente se sugiere realizar más estudios, en caminados a encontrar un diluyente que permita la viabilidad de los espermatozoides postdescongelado. Con lo cual se precisará la metodología más exitosa, para la conservación del semen de carnero y lograr de esta forma mayores adelantos genéticos en la ganadería ovina.

## V.- BIBLIOGRAFIA

Acuña M., ( 1982 ) Evaluación de los diluyentes para congelar semen de borregos Pelibuey. Tesis de Licenciatura. F.E.S.-C. U.N.A.M.

Bustamante, C.G., ( 1980 ) Acción del acrosoma del - espermatozoide de carnero durante la congela-- ción. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina- Veterinaria y Zootecnia., U.N.A.M., México.

Bustamante, C.G., Valencia, M.J., ( 1981 ). Acción- del Sulfóxido de dimetilo y glicerol como agen- tes crioprotectores del acrosoma del espermato- zoide de carnero durante la congelación. Revis- ta Veterinaria U.N.A.M., Volumen XIII, Número- 4, Pág. 211-216.

Colas G., Court M., ( 1976 ). Storage of Ram semen, Sheep Breeding Proceeding of the International Congress, Western Australian Institute of - - Technology, 455-456.

Estado de México., PANORAMICA SOCIO ECONOMICA EN -- ( 1976 ). Tomo II, Toluca, Méx., Pág. 31.

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

Gustafsson, B.K., ( 1978 ). Aspects of fertility --  
with frozen-thawed Ram Semen cryobiol, 15, - -  
358-361.

Hackett, A.J., Juskeep, E.K., Robertson, H.A., She-  
restha, J.N.B. and Wolynets, M.S., ( 1979 ). -  
Comparison of Artificial Insemination and natu-  
ral Mating on reproductive performance of five  
strains of sheep during the anestrus season in  
an intensive system., Can. J. Anim. Sci. 59; -  
675-683.

Hafez, E.S.E., ( 1980 ). Reproduction in Farm Ani--  
mals. 4 th. Ed. Lea and Febiger. U.S.A.: 220 -223.

Healey, P., ( 1969 ). Effect of freezing on the ul--  
trastructure of spermatozoa of somedomestical-  
animals. J. Reprod. Fert., 18: 21-27

Jheltobruch. N.A., ( 1979 ). The Sheep industry and  
sheep breeding in Rusia Edition Butterworths. -  
U.K.: 85-90

Langford G.A., Marcurs 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, G.A.P., M. Valencia, Z., ( 1982 ), Técnica - Descriptiva de la Colección, Evaluación y Congelación de Semen de Carnero Pelibuey - VIII - Congreso Nacional de Buiatría, Págs. 494-498.

Mann, T., ( 1964 ). The biochemistry of semen and the Male reproductive tract., Methuen and Co.-Ltd., London.

Moreno, Ch. R., ( 1976 ). Estado actual y perspectiva de la Producción ovina en México, Vet-Méx., 136-141.

Rhodes, A.P., ( 1980 ). Semen collection and Evaluation, Current Therapy in theriogenology, Saunders Company, Págs. 944-947.

S.A.R.H., ( 1980 ). Aspectos Prácticos - Básicos en la Producción de Ovinos, Departamento de Gado Ovino, Págs. 1-6.

Steele, R.G.D. and Torrie J.H., ( 1960 ). Princi-

ples and Procedures of Statistics, MacGraw-Hill Book Co., New York.

Wattson, P.F. and Martin, I.C.A., ( 1972 ). Comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram bull Spermatozoa. J. Reprod. Fert., 28: - - 99-101.

Zenjanis, R., ( 1980 ). Reproducción animal, quinta reimpresión, pág. 165, editorial Limusa, Méx.