

25
29.



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

*“EFECTO DEL GLICEROLADO LENTO Y RAPIDO
SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA Y EL
DAÑO ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES
CONGELADOS DE CARNERO Y MACHO
CAPRINO”*

T E S I S

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

p r e s e n t a n

*Castro Melgarejo Pedro
Peralta Lailson Marisela*

*Director de Tesis:
M.V.Z. Arturo A. Trejo González*

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 1986



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.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	9
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS Y DISCUSION	17
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	29
BIBLIOGRAFIA	30
ANEXOS	35

INTRODUCCION

Los pequeños rumiantes comprenden a los ovinos y caprinos, especies que fueron domesticadas antes que cualquier otra por el hombre para servir de ellas como abrigo y alimento (carne, leche). (López, 1980)

Las altas concentraciones de éstas especies, generalmente coinciden con concentraciones bajas de humanos. Encontrándose los ovinos, casi siempre en lugares ricos en alimentos, en áreas con una precipitación pluvial superior a 500 ml. anuales, como en el caso de Uruguay, Australia y Nueva Zelanda. Datos recientes establecen que la URSS tiene la mayor población ovina, siguiendole Australia, China y Nueva Zelanda, principalmente. (Arbiza, 1978)

La cabra es una especie que tradicionalmente ha sido relegada debido a que se le considera como la generadora de la erosión o por transmitir la brucelosis o fiebre de malta. Este animal sin embargo, ha demostrado tener un gran poder de adaptabilidad y con buenas posibilidades de producción, además que puede lograr esto último bajo condiciones que son difíciles o parcialmente imposibles para otras especies. (Corteel, 1975)

El crecimiento acelerado de la población en relación al lento crecimiento de la producción de alimentos trajo como consecuencia que se buscaran caminos alternos, para aumentar la producción de alimentos. Uno de esos caminos fué el impulso que se le dió a la producción ganadera, pero éste impulso se vió limitado unicamente al ganado vacuno, relegando a los ovinos y caprinos a segundo término.

Es por esto que en últimas fechas, al darse cuenta de la gran adap-

tabilidad y rusticidad que tienen estas especies al medio ambiente, se han buscado diferentes procesos para aumentar su productividad.

Uno de esos procesos ha sido el mejoramiento de ovinos y caprinos por medio de cruzamientos de razas nativas y mejoradas con el objeto de aumentar su producción, constituyendo esto, una necesidad imperativa -- del país. Por razones económicas y técnicas la mejor manera para lograr éste objetivo es la aplicación de la Inseminación Artificial (I.A.). - (Arbiza, 1978)

La I.A. ayuda a un incremento rápido y continuo del suministro de víveres del pueblo. A éste respecto, esta técnica juega un papel importante tanto cuantitativa como cualitativamente. (Lunca, 1965)

Esta técnica es la más importante de las creadas para el mejora--- miento genético de los animales. Esto es posible, ya que con unos pocos machos altamente seleccionados se producen suficientes espermatozoides para inseminar miles de hembras al año, mientras que en contraste, se obtiene poca progenie de las hembras seleccionadas, para transplante de embriones, por año. Siendo el principal objetivo de esta técnica el me--- joramiento de poblaciones animales a través de la más eficiente utiliza--- ción de sementales seleccionados para transmitir características de im--- portancia económica. (Carrillo y Orozco, 1983)

La I.A. en los animales se ha desarrollado ampliamente desde la Se--- gunda Guerra Mundial; aunque su avance ha sido rápido, no se sabe preci--- sar el origen de esta en los ovinos y caprinos. De acuerdo con las le--- yendas, parece que desde la época pastoril se práctico la I.A. en ove--- jas y cabras, trasladando el semen del donante a la hembra receptora. -

Así como en los ovinos se considera a la URSS pionera de dicho método de reproducción animal, Francia lo es en las cabras. (Rodríguez, 1978)

La I.A. en ovinos y caprinos esta lejos de alcanzar las proporciones que alcanzado esta técnica en el ganado vacuno. Aunque ello forme el objeto de investigaciones en muchos países ya desde el comienzo de nuestro siglo. (Lunca, 1965)

Tal vez la mayor limitante de esta, en los ovinos y caprinos en México, es que aún falta la infraestructura y organización necesaria, para que se pueda realizar en gran escala, pero esto no quiere decir, que se deben descuidar los aspectos que contribuyen al mejoramiento de la producción. (De Lucas, 1982) Aunque su incremento en los últimos años se debe a que es una técnica muy práctica y sencilla, cuando se tiene la experiencia necesaria. (Foote, 1980)

La I.A. en ovejas y cabras todavía tiene una serie de problemas teóricos y prácticos los cuales necesitan urgentemente soluciones para incrementar la proporción de explotaciones de estas especies. (Lunca, 1965) Uno de los principales problemas al que se enfrenta es la conservación del semen y el lograr mantenerlo viable hasta el momento de su aplicación; problema que no se ha podido resolver debido al corto tiempo que puede mantenerse viable el semen de estas especies.

Es por ello que en estas especies la ejecución de la técnica ha quedado restringida al uso de 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, la recuperación de la motilidad-

postdescongelado y de fertilidad obtenida con semen descongelado, se ha aumentado sensiblemente con el desarrollo de nuevas técnicas de congelación e inseminación. (Mc. Donald, 1975)

En especies de reproducción estacional, como la oveja y la cabra, una ventaja en la conservación del semen, 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 hembras. Varios autores (Lighthfoot y Salomon, 1970; Mattner, Entwistle y Martin, 1969; Watson y Martin, 1972), citados por Tasseron, et. al., 1977, señalan que la baja fertilidad del semen congelado es debido a fallas en el transporte espermático en la hembra, a una reducción de la motilidad espermática en el tracto genital de la hembra y en mínima parte al daño acrosomal causado por el congelado.

Entre los medios de dilución que se han trabajado para conservar el semen, está el de yema de huevo, el cuál tiene un papel importante en la motilidad espermática al descongelado, observándose que un incremento de niveles de yema de huevo del 5 al 13 %, provoca una mejora de la motilidad espermática del 34.8 a 37.9 %. (Entwistle y Martin, 1972)

Otro medio que se ha probado con buenos resultados es TRIS, éste medio se comparó con el de glucosa observándose que la motilidad espermática del semen diluido en TRIS y almacenado a 5 °C por tres días era superior en éste medio que al de glucosa, lo cuál propone al medio a base de TRIS-yema de huevo, como uno de los medios indicados para el semen de estas especies. (Abdelhakean, et. al., 1978)

Estudios realizados por Fukui (1979) demuestran que el semen diluí

do en proporción 1:4 (V/V) con TRIS-yema de huevo, muestra mejor supervivencia espermática después del congelado y descongelado a 37 °C, que los diluentes Lactosa-yema de huevo y Rafinosa-yema de huevo. Aunque algunos trabajos demuestran que existe buena fertilidad (60.7 %) utilizando el diluyente Rafinosa-yema de huevo. (Salomon y Visser, 1973)

Otro diluyente que funciona de manera adecuada es el de Lactosa-yema de huevo, aunque al compararlo con el diluyente TRIS-yema de huevo, se observó que la motilidad progresiva era ligeramente inferior. (Peña y Melesio, 1984) Aunque los mejores porcentajes de motilidad espermática se han obtenido con Lactosa al 11 % que cuando se usó al 9 % . (Roychoondhury y Bhambhani, 1977)

Más recientemente, diluentes sintéticos que contienen azúcares y electrolitos, ambos en pequeñas proporciones de leche o yema de huevo, han sido desarrollados, dando un grado de protección al espermatozoide de carnero durante la fase de congelado y descongelado que es comparable, o en algunos casos excede, al que dan los diluentes a base de Leche calentada o con yema de huevo. (Jones y Martin, 1965; citado por Entwistle y Martin, 1972)

Los estudios realizados en cabras demuestran que se han tenido mejores resultados utilizando como diluyente la leche descremada y calentada durante 10 minutos a 80-90 °C. Con los medios que contienen yema de huevo, se tuvieron resultados contradictorios en cuanto a fertilidad, puesto que algunos autores mencionan que no es conveniente su uso, debido a que en el semen del macho caprino se encuentra una enzima (fosfata

sa) que se produce en las glándulas de Cowper (Roy, 1957), que degrada la lecitina del huevo, produciendo lisolecitina y ácidos grasos, que son tóxicos para los espermatozoides. (Corteel, 1980) Por lo anterior, es necesario centrifugar y diluir el semen para tratar de eliminar la mayor cantidad de plasma seminal, mejorándose con esto las tasas de fertilidad del semen congelado, al utilizar yema de huevo. (Corteel, 1981)

Otro elemento importante que limita la fertilidad del semen, es el daño acrosomal que se produce durante la dilución y equilibración, así como, en menor cantidad, durante el congelado. (Fornusek, et. al., 1981)

El acrosoma es un saco membranoso delgado, de doble capa, que se adosa fuertemente al núcleo durante la espermiogénesis, cubre la porción anterior del núcleo. Es una estructura similar a un capuchón, que contiene enzimas líticas. (Mc. Rorie y Williams, 1974; Morton, 1976; citados por Garner y Hafez, 1980)

El daño acrosomal no se considera como el único factor que influye en la fertilidad después de la I.A. (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)

Al comparar los daños acrosomales que se producen al utilizar lactosa-yema de huevo y TRIS-yema de huevo, se observó que la diferencia de estos dos medios era poco significativa. (Peña y Melesio, 1984) En cuanto a las correlaciones entre anomalías acrosómicas, no muestra

diferencias significativas entre el diluyente Lactosa-yema de huevo y -- TRIS-yema de huevo, así como el diluyente a base de Leche. (Bernabe y Te llo, 1985)

Aunque Fornusek, et. al., (1981) reportan que no hubo diferencias entre los diluentes Lactosa y TRIS al microscopio compuesto, en rela--- ción al semen fresco, en el microscopio electrónico el daño acrosomal - encontrado fué de un 44 % para Lactosa y un 59 % para TRIS, a diferen--- cia del control con 16 %.

Otro de los importantes descubrimientos en éste campo es el hecho por Polge, et. al., (1949); citados por Foote, (1982) con la utiliza--- ción del glicerol como crioprotector durante el congelado, con lo que - evita las lesiones acrosómicas que afectan la fertilidad del semen, al evitar el daño que sufren los espermatozoides a temperaturas por debajo del punto de congelación.

El dimetilsulfóxido (DMSO) y los azúcares como la Lactosa y Rafino sa también pueden ser benéficos, ya que sirven como agentes deshidratan tes. (Foote, 1980)

El glicerol se adiciona por lo general al semen después de enfriar lo a 5 °C; sin embargo, ofrece igual protección cuando se adiciona an--- tes del enfriamiento a 22 °C. (Costa, 1982)

Entwistle y Martín (1972) menciona que no hay diferencia significa tiva en la recuperación de la motilidad progresiva al método de agregar el glicerol en forma lenta o rápida. Así mismo indican que a temperatu--- ra de 5 °C, no hay ventajas en agregar el glicerol en forma lenta o rá--- pida, quedando un volúmen final de 5-7 % (V/V) estando en contraste es--- tos resultados con los reportados en la preparación de semen bovino. --

Sin embargo, con la técnica de congelado en pellets, una dilución con glicerol a 30 °C puede ser tan satisfactorio como la dilución del diluente glicerolado, después del enfriamiento a 5 °C.

Estudios recientes mencionan que se debe adicionar el glicerol, -goteandolo o añadiendo pequeñas cantidades durante un período de dos horas, para permitir que se equilibren los espermatozoides con el glicerol, todo esto a una temperatura de 5 °C. (Foote, 1980)

En cuanto al porcentaje final recomendado de glicerol para el diluente, se han observado mejores rangos de fertilidad al utilizarlo al 8 %, que cuando se congela al 4 % de glicerol. (Costa, 1982)

OBJETIVOS

1. Comparar la motilidad progresiva antes y después del congelado-
de semen de carnero y macho caprino, trabajando con tres diluen-
tes, glicerolados en forma rápida y en forma lenta.
2. Comparar el porcentaje de anomalías acrosómicas antes y des-
pués del congelamiento de semen de carnero y del macho caprino-
en tres diferentes diluentes, utilizando glicerolado rápido y -
glicerolado lento.

MATERIAL Y METODOS

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Laboratorio de Reproducción Animal); localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 2450 metros sobre el nivel del mar, a 19° 43' de latitud Norte, y a 99° 14' de longitud Poniente. (García, 1973)

Se trabajó durante los meses de Enero a Junio de 1985, utilizando, para ello, 2 carneros adultos de la raza Suffolk y uno de la raza Rambouillet; así como, 5 machos caprinos adultos, 2 de la raza Saanen, 1 Alpino, 1 Nubia y 1 Toggenburg; todos ellos entrenados para ser trabajados con vagina artificial (V.A.).

Previo limpieza del prepucio, para evitar posible contaminación del semen, se procedió a la obtención de 35 muestras de semen por especie; siendo para los ovinos un volumen promedio de 0.92 ml. \pm 0.36 y -- una concentración promedio de 5099.91 \pm 376.72/ml. Mientras que para -- los machos caprinos el promedio de cada eyaculado fué de 0.87 ml. \pm 0.28 con una concentración de 3786.74 \pm 397.56/ml.

Las V.A. que se utilizaron, consistían de un tubo rígido de 15-20-cm. de largo y de 3.5-5 cm. de diámetro, al que se le colocaba una funda de polietileno sujeta firmemente a ambos extremos; así mismo, en -- uno de los extremos se colocó un cono de polietileno, el cuál contenía a su vez un tubo colector (tubo graduado de centrífuga), con un protector.

A cada V.A. se le dió presión y temperatura, mediante la utilización de agua caliente a 44 °C.

La metodología dentro de éste trabajo fué la siguiente:

En primer término la preparación de diluentes, en el caso de los ovinos se prepararon para su utilización los diluentes Leche, TRIS y Lactosa; mientras que para los machos caprinos se prepararon solamente los diluentes Leche y TRIS (De acuerdo a la formulación de los Anexos 1, 2 y 3).

El diluyente base Leche, fué preparado con leche en polvo descremada y calentada a 95 °C durante 10 minutos, ésto para inactivar la lacteína, substancia espermiotóxica presente en la leche. (Foote, 1980; López y Pérez 1984)

El diluyente TRIS, fué preparado a base del amortiguador orgánico - Hidroximetil-aminometano. (Abdelhakean, 1978; Fukui, 1979)

El diluyente Lactosa se preparó con Lactosa al 11 % (Roy Choundhury y Bhambhani, 1977)

Cada uno de los diluentes se dividió en dos tratamientos. El primer tratamiento (I) o de glicerolado rápido, el cuál se colocó diluyente con glicerol al 5 % a una temperatura de 37 °C (baño María). El segundo Tratamiento (II) o de glicerolado lento, al que se le subdividió en dos porciones a su vez, la primera que contenía solo el diluyente (A) y que fué trabajado a una temperatura de 37 °C (baño María) y la segunda porción que contenía la otra mitad del diluyente (B), más glicerol al 5 % - con una temperatura de 5 °C.

Una vez preparados todos los medios y teniéndolos a temperaturas adecuadas, se procedió a la obtención del semen de cada animal, utilizando para ello V.A.

Al obtenerse cada eyaculado, éste se evaluó, tanto en sus caracte-
rísticas macroscópicas (volumen, densidad y color), como en sus caracte-
rísticas microscópicas (motilidad progresiva, concentración espermática
y anormalidades acrosómicas).

Para ello, se realizó la dilución del semen en citrato de sodio al
2.9 % (0.1 ml. de semen en 9.9 ml. de citrato de sodio quedando una di-
lución final de 1:100 V/V); y a partir de esta dilución se determinó --
sus características microscópicas.

La motilidad progresiva se determinó al observarse al microscopio-
compuesto (100X), una gota de dicha solución, determinándose el porcen-
taje promedio del número de espermatozoides móviles; procurándose traba-
jar con una temperatura promedio de 37 °C para evitar alteraciones por
cambio térmico. Así mismo, de esta dilución se midió la concentración -
espermática, utilizando el método de espectrofotometría. (Martínez, ---
1985)

Para poder evaluar el daño acrosomal, se realizaron frotis, que fue
ron elaborados a partir de una gota de semen en dilución con citrato, --
por dos gotas de la tinción de Wells Awa, permaneciendo en contacto por-
5 minutos, antes de que se realizaran los frotis. (Wells Awa, 1970)

El material y los reactivos se mantuvieron a una temperatura de ---
35-40 °C, para evitar el daño espermático por choque térmico.

Una vez evaluado el semen en todas sus características, se procedió
en el caso de los ovinos, a la división de dicho semen en 6 alícuotas de
0.1 ml. cada una se numeraron en tubos de ensaye del 1 al 6, y se traba-
jaron de esta forma: los números nones se le agregó un ml. de diluyente -

(Leche, TRIS o Lactosa) para cada tubo que contenía el glicerol en forma rápida (tratamiento I); y para los números pares se les agregó 0.5 ml. del diluyente A (tratamiento II).

Las seis alícuotas se colocaron en vasos de polietileno, que contenían agua a 37 °C, y que fueron llevados al refrigerador con una temperatura promedio de 5 °C, para iniciar su etapa de adaptación al congelado.

A partir de éste momento, se inició el adiconamiento de la parte complementaria del diluyente (tratamiento II porción B), a los tubos que contenían el diluyente A (tratamiento II); éste adiconamiento se fué -- realizando en forma lenta a intervalos de 30 minutos, durante los cuales se les fué agregando 0.125 ml. de dicho diluyente. por 4 veces hasta obtener un volúmen final de 1.1 ml. (dilución final de 1:10 V/V) con un 4-6 % de glicerol.

En el caso del semen de macho caprino la metodología seguida fué -- similar a la anterior, solo que los diluyentes que se trabajaron fueron Leche y TRIS, por lo que el semen se dividió solo en cuatro alícuotas.

Luego de la última adición de diluyente B (tratamiento II), se dejó en reposo, a todas las alícuotas, durante dos horas, permitiendo con esto, la estabilización del semen con el crioprotector.

Al complementarse el período de adaptación, se inició la congela--ción del semen; para esto, en el caso de los ovinos se utilizaron dos -- diferentes técnicas de congelamiento, siendo para las alícuotas en dilu--ción de Leche utilizadas pajillas de un volúmen de 0.25 ml.; las que -- una vez llenadas y selladas con alcohol polivinílico, fueron deposita--

das durante 30 minutos en vapor de nitrógeno líquido, a una temperatura aproximada de - 79 °C; mientras que para las alícuotas que contenían -- los diluentes TRIS y Lactosa, se utilizó la técnica de congelación en pellets, utilizándose para ello bloques de Bioxido de Carbono sólido -- (hielo seco), sobre estos bloques fueron moldeándose pastillas de 0.1 - ml. de muestra, permaneciendo sobre este medio durante 5 minutos. (Trejo, 1983)

Tanto pajillas como pellets, fueron puestos en gobelets y almacenados en nitrógeno líquido (- 196 °C), de 10 a 15 días.

Para las muestras de semen de macho caprino, sólo se utilizó la -- técnica de congelamiento en pajillas de forma similar a la técnica ya -- descrita.

Al concluir el período de almacenamiento, se descongelaron las pajillas en baño María a 37 °C por 5 minutos. Posterior a esto se colocó el contenido de estas en 0.5 ml. de citrato de sodio al 2.9 %. Mientras que para descongelar los pellets sólo se procedió a agregar estos en -- 0.9 ml. de citrato de sodio al 2.9 %, todo ello trabajado a 37 °C. (Trejo, 1983)

Se procedió a la evaluación de la motilidad progresiva de las muestras tras al momento del descongelado, así como a la elaboración de frotis, -- utilizando la misma técnica que para el semen fresco, con esto se cuantificó el daño acrosomal de todas las muestras.

Se observaron 7 laminillas de cada muestra; 1 de semen fresco ---- (S.F.) y las 6 restantes de los diluentes: Leche glicerolado rápido --- (LGR), Leche glicerolado lento (LGL), TRIS glicerolado rápido (TGR), --

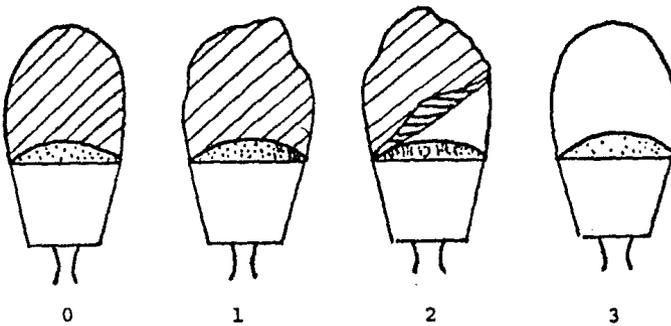
TRIS glicerolado lento (TGL), Lactosa glicerolado rápido (LAGR) y Lactosa glicerolado lento (LAGL); esto para las muestras de ovinos. Mientras que para las muestras de macho caprino, se utilizaron 5 frotis -- por muestra; una de S.F. y las 4 restantes de los diluentes: LGR, IGL, TGR y TGL.

A partir de estos frotis, se contaron 100 espermatozoides en el microscopio compuesto (1000 X), y se clasificaron según la tabla de Watson y Martin (1972), la cuál los clasifica en normal, hinchado, roto y ausente, refiriéndose al estado del acrosoma. (Figura No. 1)

Una vez codificados todos los datos, se procedió a transformar -- los valores a arco seno, para que posteriormente estos se trabajaran - en análisis de varianza (simple y factorial), así como en la prueba de Duncan. (Reyes, 1978; Steel y Torrier, 1980)

Figura No. 1

Clasificación espermática de acuerdo a los diferentes -
grados de alteración acrosómica.



- 0 - Espermatozoide con acrosoma normal
- 1 - Espermatozoide con acrosoma abombado o hinchado
- 2 - Espermatozoide con acrosoma roto, separado de la cabeza del mismo.
- 3 - Espermatozoide con acrosoma enteramente perdido (ausente)

Tomado de Watson P.F. and Martin I.C.A. (1972)

RESULTADOS Y DISCUSION

Se observó con respecto a la característica de Motilidad Progresiva (M.P.) del semen ovino, que existe una diferencia significativa ---- ($P < 0.01$), entre la motilidad del semen fresco (79.71 %), con respecto a las encontradas en el semen congelado, con diferentes diluentes. (Cuadro 1)

Así mismo, se encontró que la M.P. más alta, en el semen congelado, fué para el diluyente a base de Lactosa, coincidiendo con lo reportado - por Aamdal y Anderson (1968); citado por Fukui (1979); y Bernabe y Tello (1985). No encontrándose para éste diluyente ninguna diferencia significativa ($P > 0.05$) en la forma en la que se le agregue el glicerol, ya sea en forma rápida (46.57 %), como en su forma lenta (50.05 %).

Los diluentes LGL (23.14 %) y LGR (17.85 %), se comportaron de manera similar al diluyente TGL (19.00 %), no manifestandose diferencia -- significativa ($P > 0.05$), entre estos tres tratamientos, no así con el - diluyente de Lactosa ($P < 0.01$).

Por último se encontró que el diluyente TGR (12.14 %) fué el diluyente que más bajo porcentaje presento, pero no teniendo diferencia significativa ($P > 0.05$) con el diluyente LGR.

A diferencia de lo reportado por Fukui (1979) y Abdelhakean (1978), que obtienen mejores resultados con el diluyente TRIS. Trabajos recientes (Peña y Melesio, 1984; Bernabe y Tello, 1985), reportan mejores resultados con el diluyente Lactosa, siguiendole Leche y por último TRIS.

Con respecto al adiconamiento del glicerol, a diferencia de lo reportado por Entwistle y Martin (1972), si se reportan diferencias signi

ficativas si se adiciona en forma lenta o rápida.

Por lo que se refiere a la Recuperación de la Motilidad Progresiva (R.M.P.), los resultados se distribuyen de mayor a menor de la siguiente manera: LAGL (65.94 %), LAGR (57.57 %), LGL (29.64 %), TGL (24.20 %) LGR (22.95 %) y por último TGR (15.62 %); no observándose diferencias significativas ($P > 0.05$) entre TGL y LGL, así como entre TGL y LGR. En los restantes tratamientos si se observó diferencia significativa ($P < 0.01$). (Cuadro 1)

Al analizar los cuadros (2, 3 y 4) se observa que hay diferencia significativa ($P < 0.01$) para la M.P. y la R.M.P., en cada uno de los 6 tratamientos, así mismo existió diferencia significativa ($P < 0.01$) al utilizar el glicerol en forma lenta o rápida; siendo el mejor el glicerolado lento en todos los casos. Sin embargo se encontró que no existe una interacción entre el diluyente utilizado y la técnica de adición del glicerol.

En cuanto al daño acrosomal (D.A.) no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre el semen fresco y los diluentes utilizados. No así en el método de adición del glicerol, en el que se observan mejores resultados en los tratamientos de glicerolado lento sobre el glicerolado rápido. (Cuadro 5 y 6) Siendo esto similar a lo reportado por Peña y Melesio (1984); Bernabe y Tello (1985); y Fornusek, et. al., (1981), utilizando el microscopio compuesto.

En cuanto a los resultados obtenidos en macho caprino, para la característica de M.P., se observa que de igual manera, como sucedió en los ovinos, existe una diferencia significativa ($P < 0.01$) entre la M.P.

del semen fresco (73.14 %), con respecto a los valores encontrados para éste parámetro en los 4 tratamientos utilizados. (Cuadro 7)

Igualmente, existió una variación considerable en el método de adición del glicerol, observándose una mejor M.P. en los tratamientos don-de el glicerol se adicionó en forma lenta (40.00 %), habiendo así mismo diferencia significativa ($P < 0.01$) al usar LGR (35.14 %) y TGR (28.42 %)

Con respecto a la R.M.P., se encontró que no hay diferencia signi-ficativa ($P > 0.05$) entre los tratamientos que son: LGL (54.60 %), TGL - (54.57 %) y LGR (48.02 %): sin embargo, para el diluyente TGR (38.70 %), se encontró una diferencia significativa ($P < 0.01$) con el resto de los diluyentes. Así mismo fué éste en el que no se obtuvieron buenos resultados, no así al adicionarle al diluyente TRIS el glicerol en forma lenta.

Al analizar los cuadros (8, 9 y 10) se observó diferencia signifi-cativa ($P < 0.05$), para la M.P., no presentándose efecto del glicerolado en los 4 tratamientos. En cuanto a la Recuperación de la Motilidad Pro-gresiva, se encontró una marcada diferencia para éste parámetro en to--dos los tratamientos y de igual manera, no se observa efecto del glice-rolado.

En ambos casos no existe una interacción entre el diluyente en la - forma de adición del glicerol.

En cuanto al D.A. se observó que el menor porcentaje fué para el - semen fresco (18.65 %), siguiendole en orden creciente: TGR (28.40 %), - TGL (28.97 %), LGL (32.74 %) y por último LGR (41.54 %).

No observandose diferencia significativa ($P > 0.05$) con el diluyente TRIS, tanto en su forma de glicerolado lento, como en el glicerolado rá

pido. Sin embargo, se observa una diferencia significativa ($P < 0.01$) entre el diluyente TRIS y el diluyente de Leche, tanto en su forma de glicerolado lento como rápido, así como entre estos dos últimos. (Cuadro 11)

Se observó un efecto del diluyente y el método de adición del glicerol, sobre la presentación del D.A., así como una interacción entre ambos. (Cuadro 12)

Aunque existió un efecto sobre la presentación del D.A. con respecto a el método de adición del glicerol; se observó que no existe ninguna variación en cuanto a la frecuencia del D.A. (Normal, hinchado, roto y ausente) en relación al diluyente o al método de adición del glicerol. Encontrándose que la frecuencia del D.A. tanto en semen fresco como en semen congelado fué siempre de mayor a menor: Normal, hinchado, roto y ausente, coincidiendo con lo reportado por Watson y Martin, 1972; Tasseron, et. al., 1977; Fornusek, et. al., 1981; Peña y Melesio, 1984; y -- Bernabe y Tello, 1985.

Finalmente en lo que respecta al método de congelación encontramos que los pellets, tienen algunas ventajas sobre el método en pajilla, al ser esta técnica más simple, rápida y consecuentemente más económica. Pero su utilización tiene el inconveniente de ser difícil su identificación, su eventual contaminación por bacterias y por último al requerir un método delicado para depositar el semen en el tracto genital femenino, lo hace un método impráctico en la I.A.

Algunos trabajos mencionan que es mejor la I.A. usando semen congelado en pajillas que en pellets, pero no hay diferencia en cuanto a la fertilidad entre ambos métodos de congelación. (Colas, 1980)

CUADRO 1

EFFECTO DEL GLICEROLADO RAPIDO Y LENTO SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA,
 RECUPERACION DE LA MOTILIDAD Y ANORMALIDADES ACROSOMICAS DEL SEMEN -
 DE CARNERO UTILIZANDO TRES DIFERENTES DILUENTES.

CARACTERISTICAS	SF	LGR	LGL	TGR	TGL	LAGR	LAGL
MOTILIDAD PROGRESIVA (M.P.)	79.71 ^a +12.00	17.85 ^{de} +10.59	23.14 ^d +12.31	12.14 ^{ce} + 7.79	19.00 ^d + 12.82	46.57 ^b +18.89	50.05 ^b +24.10
RECUPERACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA (R.M.P.)		22.95 ^{de} +15.68	29.64 ^c +17.86	15.62 ^f +10.69	24.20 ^{ce} +15.27	57.57 ^b +19.93	65.94 ^a +22.41
ANORMALIDADES ACROSOMICAS (A.A.)	23.77 ^a + 8.68	28.71 ^a + 7.89	27.94 ^a + 7.40	33.51 ^a + 9.73	34.97 ^a +12.40	31.42 ^a + 8.45	26.94 ^a + 8.83

Análisis de varianza, letras diferentes en los renglones representan diferencias significativas.

M. P. (P < 0.01) (LGL VS TGR; P < 0.05)

R.M.P. (P < 0.01) (LGL VS LGR; LGR VS TGR; P < 0.05)

A.A. (P > 0.05)

CUADRO 2

ANDEVA para el efecto del glicerolado rápido y lento sobre la motilidad progresiva del semen ovino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	244	83681.41	342.95	
TRAT.	6	54291.02	9048.50	73.27**
ERROR	238	29390.39	123.48	

CUADRO 3

ANDEVA con arreglo factorial para el efecto del diluyente y el glicerolado rápido y lento sobre la motilidad progresiva del semen ovino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	209	48304.13	231.55	
TRAT.	5	21319.40	4263.88	32.12**
A	1	942.78	942.78	7.10**
B	2	20337.12	101.68.56	76.62**
A X B	2	39.5	19.75	0.1ANS
ERROR	204	27074.73	132.71	

* ($P < 0.05$)

** ($P < 0.01$)

NS ($P > 0.05$)

CUADRO 4

ANDEVA con arreglo factorial para el efecto del diluyente y el glicerolado rápido y lento sobre la recuperación de la motilidad progresiva del semen ovino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	209	35633.85	266.19	
TRAT.	5	30568.70	6113.74	49.79 **
A	1	1686.96	1686.96	13.73 **
B	2	28873.10	14436.55	117.56 **
A X B	2	8.64	4.32	0.03 NS
ERROR	204	25065.15	122.86	

* ($P < 0.05$)

** ($P < 0.01$)

NS ($P > 0.05$)

CUADRO 5

ANDEVA para el efecto del glicerolado rápido y lento sobre el daño acrosomal del semen ovino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	244	337422.82	1382.88	
TRAT	6	1408.20	234.70	0.16NS
ERROR	238	336014.62	1411.82	

CUADRO 6

ANDEVA con arreglo factorial para el efecto del diluyente y el glicerolado rápido y lento sobre el daño acrosomal del semen ovino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	209	5005.66	23.95	
TRAT.	5	692.51	138.50	6.55 **
A	1	55.19	55.19	2.61NS
B	2	518.84	259.42	12.27 **
A X B	2	118.48	59.23	2.80NS
ERROR	204	4313.15	21.14	

* (P < 0.05)

** (P < 0.01)

NS (P > 0.05)

CUADRO 7

EFFECTO DEL GLICEROLADO RAPIDO Y LENTO SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA,
 RECUPERACION DE LA MOTILIDAD Y ANORMALIDADES ACROSOMICAS DEL SEMEN -
 DE MACHO CAPRINO UTILIZANDO DOS DIFERENTES DILUENTES.

CARACTERISTICAS	SF	LGR	LGL	TGR	TGL
MOTILIDAD PROGRESIVA (M.P.)	73.14 ^a ± 8.66	35.14 ^c ±15.55	40.00 ^b ±16.62	28.42 ^d ±17.05	40.00 ^b ±16.08
RECUPERACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA (R.M.P.)		48.02 ^a ±20.25	54.60 ^a ±21.34	38.70 ^b ±22.63	54.57 ^a ±20.32
ANORMALIDADES ACROSOMICAS (A.A.)	18.65 ^a ± 8.33	41.54 ^d ±11.60	32.74 ^c ± 9.17	28.40 ^b ± 7.07	28.97 ^b ± 7.64

Análisis de varianza, letras diferentes en los renglones representan diferencias significativas.

M.P. (P<0.01) (LGL VS LGR; TGL VS LGR; P<0.05)

R.M.P. (P<0.01)

A.A. (P<0.01)

CUADRO 8

ANDEVA para el efecto del glicerolado rápido y lento sobre la motilidad progresiva del semen de macho caprino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	174	33814.06	194.33	
TRAT.	4	18367.38	4591.84	50.53 **
ERROR	170	15446.68	90.86	

CUADRO 9

ANDEVA con arreglo factorial para el efecto del diluyente y- el glicerolado rápido y lento sobre la motilidad progresiva del semen de macho caprino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	139	23349.72	167.98	
TRAT.	3	1350.52	450.10	2.78 *
A	1	977.38	977.38	6.04 *
B	1	169.67	169.67	1.04 NS
A X B	1	203.47	203.47	1.25 NS
ERROR	136	21999.20	161.70	

* ($P < 0.05$)

** ($P < 0.01$)

NS ($P > 0.05$)

CUADRO 10

ANDEVA con arreglo factorial para el efecto del diluyente y el glicerolado rápido y lento sobre la recuperación de la motilidad progresiva del semen de macho caprino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	139	28565.65	205.50	
TRAT.	3	2299.54	766.51	3.96 **
A	1	1623.83	1623.83	8.40 **
B	1	239.98	239.98	1.24 NS
A X B	1	435.72	435.72	2.25 NS
ERROR	136	26256.11	193.13	

* ($P < 0.05$)

** ($P < 0.01$)

NS ($P > 0.05$)

CUADRO 11

ANDEVA para el efecto del glicerolado rápido y lento sobre el daño acrosomal del semen de macho caprino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	174	8768.65	50.39	
TRAT.	4	4015.11	1003.77	35.90 **
ERROR	170	4753.54	27.96	

CUADRO 12

ANDEVA con arreglo factorial para el efecto del diluyente y el glicerolado rápido y lento sobre el daño acrosomal del semen de macho caprino.

FUENTE V.	G.L.	S.C.	C.M.	F
TOTAL	139	4977.30	35.80	
TRAT.	3	1385.71	461.90	17.49 **
A	1	243.77	243.77	9.23 **
B	1	888.24	888.24	33.64 **
A X B	1	253.70	253.70	9.60 **
ERROR	136	3591.59	26.40	

* ($P < 0.05$)

** ($P < 0.01$)

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos en éste trabajo, se --
concluye lo siguiente:

- Los mejores resultados con lo que respecta a la calidad seminal,
se obtuvieron al adicionar el glicerol lentamente.

- Para el semen ovino, el diluyente a base de Lactosa mostró mejo--
res resultados, que los diluyentes a base de Leche y/o de TRIS.

- Para el semen de macho caprino, tanto el diluyente a base de Le--
che, como el a base de TRIS, permitieron una mayor recuperación de la -
motilidad progresiva cuando se les adicionó el glicerol lentamente.

- Finalmente, los daños del acrosoma en el semen caprino, se vie--
rón afectados por la congelación, el diluyente y el glicerol, pero no --
ocurrió así en el caso de los ovinos.

Sin embargo, se sugiere que se tomen en cuenta factores de marcada
importancia al trabajar semen de estas especies, como pudieran ser: épo
ca del año, número de animales, raza de los mismos, temperatura al des-
congelado, centrifugación del semen y por último la pureza química de -
los diluyentes.

Así mismo, sería de gran importancia, verificar su correlación con
la fertilidad.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelhakean S. M. T., Yassen A. M. and El-Alamy M. A. Ram sperm motility aged in glucose and TRIS buffered extenders at 5 °C. Journal Agricultural Research. 26 (2) 301-308 1978.
- Arbiza S. 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 1978.
- Bernabe S. M. y Tello A. B. Correlaciones entre la motilidad progresiva y las anomalías acrosómicas en el semen de carnero fresco y congelado en pastillas en tres diferentes diluentes. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. 16-18 1985.
- Carrillo A. L. y Orozco C. E. El efecto de la temperatura en el manejo de la muestra del semen antes de la dilución y la temperatura de descongelado sobre la motilidad progresiva de los espermatozoides de carnero. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. 1-4 1983.
- Olas G. Suggest international standars for ram semen exchange. 9 th. Inter. Congress. Animal Reprod. I.A. Madrid España: RT-G-4 1980.
- Corteel J. M. Production du sperme chez le bouc; variation saisonniere de la quantite et de la qualite de sperme colecte selon l'age des animaux. 1er. Journées de la Recherche ovine et caprine. 1; 4-17 1975a.
- Corteel J. M. Production, storage and insemination of goat semen. Reprod. Nutr. Develop. 20; 115-127 1980.

- Corteel J. M. Collection, processing and artificial insemination of ---
goat semen. In: Gall (ed) Goat Prod. Academic Press Inc. London --
LTD. 1981.
- Costa M. R. Untersuchungen über den Einflub Verschiedener kryobiologis-
cher Faktoren auf die Qualität und Befruchtungsfähigkeit von tief-
gefrorenem Schafesperma. Aus der Klinik Fur Andrologie und Besamung
der Haustiere der Tierarztlichen Hochschule Hannover. 559-564 ---
1982.
- De Lucas T. J. Inseminación Artificial en ovinos. Memorias 3er. curso -
teórico-práctico de Inseminación Artificial. Facultad de Estudios-
Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. 1982.
- Entwistle W. K. and Martin I. C. A. Effects of composition of diluent,-
method of addition of glycerol freezing rate and storage temperatu
re on the revival of ram spermatozoa after deep-freezing. Aust. J.
Biol. Sci. 25; 379-386 1972.
- Foote H. R. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4a. edi
ción, Editirial Interamericana. 497-520 1980.
- Foote H. R. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination:
Past, present and future. American Society of Andrology. 3; 85-100
1982.
- Fornusek L. Vetvicka V. Petelíková J. The effect of long term storage di
luents on the ocrosome of ram spermatozoa. Vet. Med., Praha. 26 (4)
213-221 1981.
- Rukui Y. Effects of different diluents, thawing temperatures and mate---
rials of thawing containers on survival of ram spermatozoa frozen -

- by the pellet method. Japan J. Animal Reprod. 25; 160-169 1979.
- García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopen. U.N.A.M. 1973.
- Garner D. L. y Hafez E. S. E. Espermatozoide. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4a. Edición, Editorial Interamericana; 160-180 1980.
- Hackett A. J., Juskeep E.K., Robertson H. A., Sherestha J. N. and Woly-netz M. S. 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 1979.
- López C. P. Enciclopedia Ilustrada Cumbre. Editorial Cumbre S. A. 21a. Edición, tomo 9, 308-309 1980.
- López P. A. y Pérez C. R. Inseminación Artificial en ovinos. Memorias del curso Bases de la Cría Ovina. Toluca. 52-58 1984.
- Lunca N. The present state of artificial insemination in sheep and goat. World Review of Animal Production. 1 (1) 73-80 1965.
- Martínez C. A. M. Correlaciones de tres métodos para determinar la concentración espermática de semen de ovinos y caprinos. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. 20-24 1985.
- Mc. Donald L. E. Veterinary Endocrinology and Reproduction. 3th. Edition Editorial Lea and Febiger, 254-332 1975.
- Peña V. M. y Melesio A. F. Comparación de la Motilidad Progresiva y anomalías de los espermatozoides de carnero de la raza Merino Australiano, antes y después de la descongelación en pellets en tres -

- diferentes diluentes. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M. 1-24 1984.
- Reyes C. P. Diseño de experimentos agrícolas. Editorial Trillas. 315--318 1978.
- Rodríguez P. U. Inseminación Artificial. Editorial Pueblo y Educación. 100-103 1978.
- Roy A. Egg yolk-coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. Nature. 179; 318-319 1957.
- Roy C. P. N. and Bhambhani G. pellets freezing of ram spermatozoa. ZBL-Vet. Med. A. 24; 696-700 1977.
- Salomon S. and Visser D. Effect of composition of TRIS-based-diluent of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by pellet method. Aust. J. Biol. Sci. 26; 291 1973.
- Steel R. G. D. and Torrier J. M. Principies and procedures of statistics a Biometrical Approach. 2a. Edición, Editorial Mc. Graw Hill.-1980.
- Tasseron F., Amir D. and Schindler H. Acrosome Damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. J. Reprod. Fert. 51; --461-462 1977.
- Trejo G.A. 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) 110-113 1983.
- Watson P. F. and Martin I. C. A. Comparison of changes in the acrosome of deep frozen ram and bull spermatozoa. J. Reprod. Fert. 28; 99--

101 1972.

Wells M. E. and Awa O. A. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. J. Dairy Sci. 53 (2); 227-232 1970.

ANEXO 1

CONTENIDO DE LOS DILUENTES UTILIZADOS EN ESTE

TRABAJO

LECHE⁶

Leche descremada en polvo calentada		
durante 10 minutos a 90 °C	10	gr.
Glucosa	0.194	gr.
Penicilina	1000	U.I./ml.
Estreptomicina	1	mcg/ml.
Agua desmineralizada	100	

⁶ Este diluyente se dividió a su vez, de la siguiente forma:

	GLICEROLADO RAPIDO TRATAMIENTO I	GLICEROLADO LENTO TRATAMIENTO II	
		A	B
LECHE	50 ml.	25 ml.	25 ml.
GLICEROL	2 ml.		2 ml.

Adaptado de la fórmula de Corteel (1981).

ANEXO 2

CONTENIDO DE LOS DILUENTES UTILIZADOS EN ESTE
TRABAJO

TRIS*

TRIS	199	mM
Acido cítrico	1.3	g
Fructuosa	55	mM
Yema de huevo	20	g
Penicilina	1000	U.I./ml.
Estreptomycin	1	mcg/ml.
Agua desmineralizada		aforar

*Este diluyente a su vez se dividió de la siguiente forma:

	GLICEROLADO RAPIDO	GLICEROLADO LENTO	
	TRATAMIENTO I	TRATAMIENTO II	
		A	B
TRIS	50 ml.	25 ml.	25 ml.
GLICEROL	3 ml.		3 ml.

ANEXO 3

CONTENIDO DE LOS DILUENTES UTILIZADOS EN ESTE
TRABAJO

LACTOSA°

Lactosa	305	mM
Yema de huevo	20	%
Penicilina	1000	U.I./ml.
Estreptomina	1	mcg/ml.
Agua desmineralizada		aforar

°Este diluyente a su vez, se dividió de la siguiente forma:

	GLICEROLADO RAPIDO TRATAMIENTO I	GLICEROLADO LENTO TRATAMIENTO II	
		A	B
LACTOSA	50 ml.	25 ml.	25 ml.
GLICEROL	2.5 ml.		2.5 ml.