

36
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"COMPARACION DE LA MOTILIDAD PROGRESIVA
DEL SEMEN CAPRINO DILUIDO EN DOS MEDIOS
Y REFRIGERADO A 5°C. DURANTE 24 HORAS"

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N .

**JOSE DAVID HERRERA OLIVARES
GERMAN ANTONIO SIMAN CINTA**

ASESOR: M.V.Z. ARTURO ANGEL TREJO GONZALEZ



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1988



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 :

(page.)

Resumen

Introducción

Objetivos

Material y Método

Resultados y Discusión

Conclusiones

Bibliografía

RESUMEN:

El principal objetivo de la Inseminación Artificial (I.A.), estriba en el mejoramiento genético en masa de las poblaciones animales, por medio de la utilización más eficaz de los sementales seleccionados de la manera más científica posible, por su capacidad para transmitir rasgos ó caracteres de importancia económica.

En el presente trabajo, se utilizaron 5 sementales caprinos de las razas Alpina y Nubia, de los cuales se obtuvieron 20 eyaculados por medio de la vagina artificial.

Cada eyaculado se conservó en refrigeración durante 24 horas en dos diluentes diferentes; I) Yema de huevo-Sacarosa y II) Yema de huevo-lactosa-EDTA.

La motilidad progresiva fué evaluada en semen fresco, así como en semen refrigerado a las 2 y a las 24 horas, bajo tres métodos diferentes:

- 1) Prueba de la reducción del azul de metileno.
- 2) Prueba de la migración espermática en moco cervical de vaca en celo y contenido en tubo capilar.
- 3) Observación al microscopio óptico de semen diluido 1:100 en citrato de sodio.

La primera prueba consiste en la determinación del tiempo necesario para que una muestra de semen decolore cierta cantidad de reactivo (azul de metileno), a 37°C de incubación.

Para efectuar la segunda prueba, primeramente se llenaron los tubos capilares con el moco cervical, para posteriormente ser introducidos verticalmente en tubos de ensaye que contienen 1 ml. de semen diluido en cada uno de los diluentes mencionados y se incubaron durante 1 hr. a 37°C. Al transcurrir éste periodo de tiempo, los capilares se conservaron en refrigeración para su lectura posterior.

La última prueba se realizó colocando una gota del semen diluido directamente en un portaobjetos, para ser observado en el microscopio óptico.

En los resultados obtenidos, se observó que existió un efecto del diluyente (P<0.005), del tiempo de conservación en refrigeración, así como una interacción diluyente-tiempo (P<0.005).

INTRODUCCION:

El principal objetivo de la I.A., estriba en el mejoramiento genético en masa de las poblaciones animales, por medio de la utilización más eficaz de los sementales seleccionados de la manera más científica posible, por su capacidad para transmitir rasgos ó caracteres de importancia económica. (Mc Donald, 1978).

La I.A. es una herramienta que puede resultar de utilidad en todos aquellos casos en que interese hacer uso más intensivo de los reproductores machos. Tal parece ser la situación en caso de ser objetivo, la absorción de una raza por otra y de ser reducido el número de ejemplares de la raza absorbente. En éste sentido a sido utilizado con éxito, absorbiendo razas nativas con razas mejoradas. (Ponzoni, 1973).

La I.A. ha logrado un notable avance y gran difusión en la industria ganadera y constituye el esfuerzo más importante en pro de la producción del ganado lechero. En asociación con su enorme potencial para la amplia distribución de material genético a partir de sementales seleccionados, la I.A. ha estimulado la investigación básica y aplicada en la producción, crianza y economía animal. (Mc Donald, 1978).

Desde el punto de vista del mejoramiento genético dentro de una raza, la ventaja de la I.A. radica en las posibilidades que ofrece de aumentar la intensidad de selección al permitir mayor uso de los carneros superiores. Al mismo tiempo, al reducirse el número de carneros empleados, el aumento de consanguinidad por generación será mayor, aunque se dice que los efectos de la consanguinidad son más notorios en rebaños de tamaño reducido. (Ponzoni, 1973).

En otras especies animales, la I.A. no ha avanzado en el mismo grado que en los bovinos, debido principalmente a razones técnicas y económicas.

Es esencial una restricción racional en la aplicación de la I.A. a grandes poblaciones, ya que se puede distribuir ampliamente material genético inferior, así como también se puede lograr mejoramiento genético. (Mc Donald, 1978).

En especies de reproducción estacional como los caprinos, una ventaja en la conservación del semen, es que puede al-

ocurrirse en la estación reproductiva cuando éste es producido con mejor calidad. (Rao y Pandey, 1977).

Una de las principales causas del poco uso de la técnica en caprinos, es la dificultad que existe para conservar el semen (Moreno, 1984), y por el número de hembras cubiertas por semental.

La congelación del semen en forma de pastillas o pellet, - puede ser una solución a futuro por su fácil manejo, aunque actualmente no podemos esperar resultados del todo satisfactorios.

Rao y Pandey (1977), reportan que probando cinco diluyentes durante diferentes estaciones del año, el semen producido durante la estación más fría, tenía mejores características que el obtenido en la estación más cálida. También reportan, que utilizando un diluyente a base de yema de huevo, citrato, fructuosa y glicerina, se encontró una aceptable motilidad y viabilidad de los espermatozoides obtenidos y mantenidos a 5°C hasta por 144 horas.

Cuando se ha utilizado un diluyente a base de yema de huevo, azúcares y glicerina, los resultados de fertilidad no han sido muy alentadores, obteniéndose valores entre 50 y 60% de concepción, y solamente en algunas ocasiones se han logrado porcentajes mayores. (Asudal y Andersen, 1968; Vissler, 1974; y Miller, 1980).

El éxito de los programas de I.A., depende en gran medida de la calidad del semen que se aplica. Para ésto, se han desarrollado métodos que pueden estimar in vitro la capacidad fertilizante de los espermatozoides y se han propuesto como pruebas de rutina, las siguientes: a) El volumen, b) La concentración y c) La motilidad progresiva. (Cott y Yemon, 1980).

Entre el volumen de eyaculado y la concentración espermática por ml., se determina la cantidad de espermatozoides que contiene la muestra obtenida, mientras que la motilidad progresiva es un estimador de la capacidad fecundante de dichos espermatozoides, siendo además la estimación in vitro que más correlación presenta con la fertilidad del semen $r = 0.88$ (Corteel, 1976) y $r = 0.66$ (Peralta et. al., 1987).

Por lo tanto se han desarrollado una serie de técnicas que permiten hacer esta evaluación en forma más objetiva posible,

El procedimiento utilizado con mayor frecuencia es la observación microscópica directa con semen diluido. Los primeros métodos bioquímicos incluyeron la reducción del azul de metileno y el índice de fructuolisis, ambos basados en el metabolismo espermiático de la fructuosa (Linn, 1964), y recientemente se utiliza la medición de enzimas como la transaminasa glutámico-oxalacética y la deshidrogenasa láctica (Zhao-Qi Lu et. al., 1982). Otras técnicas físicas agrupan cámaras de vidrio (Makler, 1976), métodos fotográficos (Revel y Wood, 1978) y fotométricos (Bartov et. al., 1981); además, existe un método biológico basado en la migración de los espermatozoides a través de moco cervical (Langford et. al., 1984).

O B J E T I V O S :

- 1) Comparar la viabilidad del semen caprino refrigerado y diluido en dos medios diferentes.
- 2) Correlacionar varios métodos para estimar la motilidad progresiva del semen caprino refrigerado.

MATERIAL Y METODO:

El presente trabajo experimental, se llevó a cabo en el Laboratorio de Reproducción Animal de la F.E.S. Cuautitlán, localizado en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Se utilizaron 5 sementales caprinos de las razas Alpina (3) y Nubia (2), de los cuales se obtuvieron, mediante vagina artificial, 20 eyaculados que se consideraron de buena calidad.

Cada eyaculado fué dividido en dos alícuotas, de tal manera que quedaron 100×10^6 espermatozoides/ml.. Cada una de las muestras se conservó en refrigeración por 24 horas, en dos diluyentes diferentes que fueron:

- I) Yema de huevo--Lactosa.
- II) Yema de huevo--Sacarosa--EDTA.

La evaluación de la motilidad progresiva se efectuó en semen fresco y refrigerado por 2 y 24 horas, bajo tres métodos diferentes que fueron:

- 1) Prueba de la reducción del azul de metileno.
- 2) Prueba de la migración en tubo capilar con moco cervical.
- 3) Observación al microscopio óptico de semen diluido 1:100 en citrato de sodio al 2.9%.

La prueba de la reducción del azul de metileno, es un método basado en la determinación del tiempo necesario para que una muestra de semen decolore cierta cantidad de reactivo, a 37°C en incubación, y que consiste en agregar a un tubo de ensaye, de 1 cm. de diámetro y capacidad de 3-4c.c., 0.1 ml. de semen + 0.4 ml. de diluyente + 0.005 de azul de metileno y una capa de aceite mineral. La prueba presenta correlación significativa con el número de espermatozoides, su movilidad inicial, la disminución de fructuosa y el enriquecimiento en ácido láctico post-incubación. Se observó constantemente hasta que -- existió un cambio de color.

Para efectuar la prueba de la migración en tubo capilar, pri

meramente se obtuvo moco cervical de vaca en celo; posteriormente, se procedió a llenar tubos capilares de 6 cms. de longitud con el moco obtenido. Una vez que estuvieron listos los capilares, fueron colocados en tubos de ensayo, que previamente fueron preparados con 1 ml. de semen diluido con los dos diluentes ya mencionados (1 capilar por tubo), y se incubaron por 1 hr. a 37°C; al transcurrir la hora, los capilares se refrigeraron para su lectura posterior. Para realizar esta prueba con el semen refrigerado, primero se incubaron los capilares a 37°C durante 10 mins.; la lectura en este caso se llevó a cabo mediante la división del capilar en tres segmentos de los cuales se extrajo el contenido de cada uno de ellos y se mezcló con el colorante Rosa de Bengala, como medio de contraste, para observar los espermatozoides al microscopio y contar los de cada segmento, depositando una gota de la muestra en una cámara de Neubauer.

La tercera prueba se realizó colocando una gota de semen diluido (1:100) en un portaobjetos, observando la motilidad directamente al microscopio óptico y dando valores en porcentaje.

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza con arreglo factorial y ecuaciones de regresión y correlación simple (Steel y Torrie 1980), bajo el siguiente método :

$$Y = \mu + D_i + T_j + TD_{ij} + E_{ijk}$$

Donde :

μ = Media poblacional

T = Tiempo

D = Diluyente

E = Error experimental

RESULTADOS Y DISCUSION:

En el cuadro #1, se presentan las medias para la motilidad progresiva evaluada en el microscopio óptico. El semen fresco tuvo la mejor motilidad progresiva $70.5 \pm 6.36\%$ y fué diferente a los demás tratamientos ($P < 0.05$). El semen refrigerado durante 2 hrs. en lactosa, fué mejor ($P < 0.05$) que el tratamiento del mismo tiempo en sacarosa $45.5 \pm 6.36\%$ y $35.5 \pm 6.86\%$ respectivamente. El semen refrigerado durante 24 hrs., perdió practicamente su motilidad y no hubo diferencia en cuanto a diluyente ($P < 0.05$), teniendo $1.06 \pm 0.99\%$ para sacarosa y $1.75 \pm 1.73\%$ para lactosa. En el mismo cuadro, se anota la cantidad de espermatozoides que avanzó en los capilares; los espermatozoides que migraron en el primer segmento, fueron en mayor número para los diluidos en lactosa, en el semen fresco y refrigerado por 2 y 24 hrs., cuando se comparó con los diluidos en sacarosa. En el semen fresco, para el diluyente lactosa migraron 148.3 ± 73.69 espermatozoides/ mm^3 y para el diluyente sacarosa 79.68 ± 34.46 espermatozoides/ mm^3 , a las 2 hrs. de refrigeración 84.56 ± 41.96 y 34.87 ± 51.77 espermatozoides/ mm^3 , y a las 24 hrs. de refrigeración 26.93 ± 14.39 para lactosa y 6.81 ± 3.76 para sacarosa espermatozoides/ mm^3 , siendo todas éstas diferencias significativas.

Para el segundo segmento no existieron diferencias significativas, ni entre el diluyente, ni entre tiempo ($P > 0.05$).

Para la prueba de la reducción del azul de metileno, no fué posible comparar entre el semen fresco y el refrigerado, debido a que las mediciones realizadas fueron diferentes.

En el cuadro #2 de analisis de varianza ($P < 0.005$), se observa que existieron diferencias entre tratamientos.

En el cuadro #3, se observa que existió un efecto del diluyente ($P < 0.005$), del tiempo de conservación en refrigeración -- ($P < 0.005$); así como, una interacción diluyente--tiempo ($P < 0.005$).

En el cuadro 4, se observa que los factores que afectan significativamente esta característica fueron: el diluyente --- (P 0.005), el tiempo (P<0.005), y el segmento del tubo capilar (P 0.005); además, también fueron significativas las siguientes interacciones: D_xT, D_xS, T_xS y T_xS_xD con (P<0.005) en todos los casos.

En el cuadro 5, se señalan las correlaciones entre la prueba del azul de metileno y la motilidad progresiva evaluada en el microscopio óptico, existiendo una correlación positiva -- $r=0.43$ (P<0.05) solamente para el diluyente sacarosa. Las correlaciones entre la cantidad de espermatozoides que migraron en el primer segmento del tubo capilar, fueron significativas para ambos diluentes, $r=0.46$ (P<0.05) para sacarosa y $r=0.42$ -- (P<0.05) para lactosa.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CUADRO # 1

MOTILIDAD PROGRESIVA DE LOS ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
MANTENIDOS VEINTICUATRO HORAS EN REFRIGERACION A 5° C.
Y EVALUADA POR TRES METODOS. (MEDIA ± DE)

METODO	SF	SFS	SFL	SR 2HS.S	SR 2HS. L	SR 24HS. S	SR 24 HS. L
MICROSCOPIO OPTICO 100 x (%)	70.5 ± 6.86 a			35.5 ± 6.56 c	45.5 ± 6.86 b	1.06 ± 0.99 d	1.75 ± 1.73 d
CANTIDAD DE ESPERMATOZ. EN EL 1er. SEGMENTO DEL TUBO CAPILAR ESP/mm.		79.68 ± 34.46 b	148.3 ± 73.69 a	34.87 ± 51.77 c	84.56 ± 41.95 b	6.81 ± 3.76 d	26.93 ± 14.39 c
CANTIDAD DE ESPERMATOZ. EN EL 2do. SEGMENTO DEL TUBO CAPILAR ESP/mm.		12.26 ± 19.73	16.7 ± 15.12	3.62 ± 5.43	10.56 ± 15.03	0.81 ± 1.22	3.43 ± 4.61

CUADRO # 2

ANALISIS DE VARIANZA GENERAL PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA DE
 ESPERMATOZOIDES CAPRINOS EVALUADA EN EL MICROSCOPIO OPTICO
 (100 x).

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TOTAL	59	5483.08	92.93	-	-
TRATAMIENTOS	2	4560.51	2280.25	140.9	0.005
ERROR	57	922.57	16.18	-	-

CUADRO # 3

ANALISIS DE VARIANZA CON ARREGLO FACTORIAL PARA LA
 MOTILIDAD PROGRESIVA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS
 REFRIGERADOS EN DOS DILUYENTES A 5° C DURANTE 2 y 24
 HORAS.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TOTAL	71	21 780.18	-----	-----	----
TRATAMIENTOS	3	20 977.41	6992.47	592.58	0.005
DILUYENTES (D)	1	263.70	263.70	22.34	0.005
TIEMPO (T)	1	20 619.62	20 619.62	1747.42	0.005
D x T	1	94.09	94.09	7.97	0.02
ERROR	60	802.77	11.80	-----	----

CUADRO # 4

ANALISIS DE VARIANZA CON ARREGLO FACTORIAL POR EL AVANCE DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS EN TUBOS CAPILARES CON MUCO CERVICAL DE BOVINO UTILIZANDO SEMEN REFRIGERADO Y DOS DI LUENTES.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBER	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TOTAL	205	623 726.06	-----	-----	-----
TRATAMIENTOS	11	422 545.72	38 413.24	37.22	0.005
DILUENTES (D)	1	36 643.63	36 643.63	35.51	0.005
TIEMPO (T)	2	108 955.40	54 477.70	52.79	0.005
SEGMENTOS DEL TUBO CAP	1	175 426.96	175 426.96	170.01	0.005
D x T	2	276 946.69	138 473.34	134.19	0.005
D x S	1	210 475.13	210 475.13	203.97	0.005
T x S	2	138 163.36	69 081.68	66.94	0.005
T x S x D	2	101 519.73	50 759.86	49.19	0.005
ERROR	194	200 180.34	1 031.85	-----	-----

CUADRO # 5

CORRELACIONES ENTRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA ESTIMADA EN EL MICROSCOPIO OPTICO (100 x) Y OTROS METODOS DE ESTIMARLA EN LOS ESPERMATOZOIDES CAPRINOS DE SEMEN FRESCO Y REFRIGERADO UTILIZANDO DOS DILUYENTES.

CARACTERIST. CORRELACION.	TIPO DE DILUYENTE	TIPO DE SEMEN	r	SIGNIFICANCIA	n	ECUACION DE MEJOR AJUSTE
REDUCCION DEL AZUL DE METILENO (1)	SAC-EDTA-YEMA	FRESCO	-0.20	NS	20	
		REFRIGERADO (2 hs)	0.43	0.05	20	$y = 26.36 \frac{x}{22.27(x)}$
	LACTOSA YEMA	FRESCO	-0.10	NS	20	
		REFRIGERADO (2 hs)	0.38	NS	20	
CANTIDAD DE ESPERMATOZ. EN EL PRIMER SEGMENTO (2)	SAC-EDTA-YEMA	FRESCO	-0.31	NS	19	
		REFRIGERADO (2 hs)	0.46	0.05	16	$y = 34.79 \frac{x}{0.035}$
	LACTOSA-YEMA	FRESCO	-0.42	0.05	19	$y = 64.61 \frac{x}{0.039(x)}$
		REFRIGERADO (2 hs)	0.24	NS	16	
CANTIDAD DE ESPERMAT. EN EL SEGUNDO SEGMENTO CAPILAR	SAC-EDTA-YEMA	FRESCO	-0.44	0.05	19	$y = 68.57 \frac{x}{0.159(x)}$
		REFRIGERADO (2 hs)	0.02	NS	16	
	LACTOSA-YEMA	FRESCO	-0.32	NS	19	
		REFRIGERADO (2 hs)	0.24	NS	19	

(1) NS= NO SIGNIFICATIVO. (P > 0.05)

(2) CAPILARES DE 6 cm CON MOCO CERVICAL DE BOVINO DIVIDIDOS EN TRES SEGMENTOS DE APROX. 2 cm.

CONCLUSIONES :

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que :
El diluyente a base de lactosa fué mejor que el de sacarosa para refrigerar semen caprino.

El semen caprino no resistió la refrigeración durante 24 hrs. en ninguno de los dos diluyentes, ya que sus características vitales decayeron considerablemente.

El método del azul de metileno solamente pudo ser utilizado con éxito en el semen fresco y refrigerado hasta 2 hrs. con el diluyente sacarosa.

La migración a través de tubos capilares, demostró ser útil para evaluar objetivamente la motilidad del semen, pero su correlación significativa con la observación directa al microscopio, hace que ésta última técnica siga prefiriéndose para las pruebas de rutina.

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

Aamdal, J.; Andersen, K. (1968). Freezing of ram semen in straws. Proc. VI th Int. Congr. Animal Reproduction, pag. 2977.

Bartov, B.; Kalay, D. and Kayevsky, A. (1981). Sperm motility analyzer (SMA). A practical tool of motility and cell concentration determinations in artificial insemination centers. Theriogenology 15(2), pages. 173-182.

Corteel, J.M. (1976). Variations de la motilité et de la fécondance des spermatozoïdes de bouc. Ann. Zootech 25(4), pag. 567.

Langford, G.A.; Hackett, A.J.; Marcus, G.J. (1984). Studies on ram sperm penetration in bovine cervical mucus. Proc. 10th international congress on animal reproduction and artificial insemination. University of Illinois at Urbana Champaign.

Makler, A. (1978). A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. Fert. Sterility 30(3), pages. 313-318.

Mann, T. (1964). Metabolism of semen; fructuolysis, respiration, and sperm energetics. IN: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract. 2nd ed. Methuen and Co. U.K., 265-307.

Mc Donald, L.E. (1978). Reproducción y Endocrinología Veterinaria. 2a ed. Ed. Interamericana. México, D.F.

Miller, S.J. (1980). Artificial breeding techniques in sheep. Current therapy in theriogenology: Diagnosis, Treatment and prevention of reproductive diseases in animals. W.B. Saunders.

Moreno, U.C.A. (1984). Inseminación artificial en ganado caprino Tesis licenciatura. PESC UNAM, Cuautitlan Edo. de Méx.

Ott, R.S. and Memon, M.A. (1980). Breeding soundness examinations of rams and bucks (A review). Theriogenology 13, pages. 155-164.

Peralta, L.M.; Trejo, G.A.; Martínez, T.A. Características seminales y tamaño testicular en machos caprinos con daño en el epidídimo. 13^o Congreso de Buiatría. En prensa.

Ponzoni, R. (1973). Aspectos modernos de la producción ovina. Universidad de la República. Uruguay.

Rao, B.R.; Pandey, J.N. (1977). Preservation of semen of Corriedale and Malli rams, in different diluents. Indian J. Animal Sci. 47.

Revell, S.G. and Wood, P.D.P. (1978). A photographic method for the measurement of motility of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 54, pages. 123-126.

Visser, D. (1978). The effect of pellet volume, dilution rates prefreezing and at Thawing, and of thawing temperature on the survival and acrozone morphology of frozen ram spermatozoa. The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. Recent advances in the deep-freeze preservation of ram semen. *S.Afr. J. Animal Sci.* 4, pages. 147-155.

Zhao-Qi Lu; Wu-Nian; Guo Xiao-hui; Liu Yun-Ying; Guan Xiao-Ling; Song Tie-Shan and Xia Luo-Jun (1982). Electron microscopic and biochemical methods used to evaluate the quality of frozen ram semen. *Acta Vet. Zoot. Sinica* 13(4), 241-246.