



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN



**“EVALUACION DE TRES CONCENTRACIONES DE YEMA DE
HUEVO SOBRE ALGUNAS CARACTERISTICAS DEL
ESPERMATOZOIDE CAPRINO UTILIZANDO DOS VELOCIDADES
DE ENFRIAMIENTO DURANTE DOS HORAS ANTES
DE LA CONGELACION”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A N:
JOSE LUIS ANAYA GARCIA
MARTIN HERNANDEZ GUZMAN**

**A S E S O R :
MVZ. MC. ARTURO A. TREJO GONZALEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1995

FALLA DE ORIGEN



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FEB-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Evaluación de tres concentraciones de yemas de huevo sobre algunas características del espermatozoide caprino utilizando dos velocidades de enfriamiento durante dos horas antes de la congelación"

que presenta el pasante: José Luis Anaya García
con número de cuenta: 8736891-6 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con:
Hernández Guzmán Martín

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Noviembre de 1994

PRESIDENTE MVZ. Fernando Osaya Gallardo
VOCAL M. en C. Arturo A. Trejo González
SECRETARIO MVZ. Miguel Ángel Pérez Razo
PRIMER SUPLENTE en C. Rosalba Soto González
SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Wilson Medina Barrera



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo sobre algunas características del espermatozoide caprino utilizando dos velocidades de enfriamiento durante dos horas antes de la congelación".

que presenta el pasante: Martín Hernández Guzmán
con número de cuenta: 8024454-3 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con :
José Luis Anaya García

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

EMENTAMENTE,
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Noviembre de 1974

PRESIDENTE	<u>MVZ. Fernando Osneya Gallardo</u>	
VOCAL	<u>MC. Arturo A. Trejo González</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Miguel A. Pérez Razo</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Rosalba Soto González</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MVZ. Wilson Medina Barrera</u>	

DEDICO ESTA TESIS:

A ti SEÑOR.

Por ser la luz que guía mi camino.

A mi Madre.

María de Jesús García Padilla

Por darme las bases para poder edificar mi vida, así como por tú amor y ejemplo.

A mis hermanas.

Mónica
Rocío
Pilar
Claudia
Luisa
María

Por apoyarme, impulsarme a ser mejor y su gran ayuda económica y moral.

A mi novia.

Mónica Judith

Por tú amor y apoyo.

PMVZ. José Luis Anaya García.

AGRADEZCO A:

El MVZ. MC. Arturo A. Trejo González por su apoyo para la realización de este trabajo.

La MVZ. María del Carmen Ramírez y el MVZ. Enrique Casillas por orientar mi camino e impulsarme a seguir adelante.

Mi gran amigo y compañero Martín Hernández Guzmán por su apoyo y consejo durante la carrera.

El MVZ. José Alfredo García Salazar (rutas) por darme la oportunidad de aprender con la práctica y por su amistad.

El MVZ. MC. José Alfredo Medrano Hernández por su amistad y los conocimientos transmitidos.

Mis tíos y primos.

La familia Segura Gutiérrez por brindarme su amistad y permitirme participar del calor de su hogar.

Mis amigos:

Alejandra
Bety
Guadalupe
Rosario

Daniel
Humberto
Jorge

Por escucharme y brindarme su amistad, así como por soportarme y ubicarme cuando lo necesite.

PMVZ. José Luis Anaya García.

DEDICATORIA

A mi padre Victoriano Hernández por su inquebrantable fuerza de voluntad y por su anhelo en mostrarme siempre la forma más adecuada para sobrellevar los malos y buenos momentos de la vida, y quien ha sabido estimularme para realizar mi meta profesional con todo mi amor y respeto.

A mi madre Teresa Guzmán quien me ha dado su amor y cariño y que con su trabajo y empeño me ha guiado por el camino de la superación sin claudicar nunca, para que lograra una profesión, la cual me fue dada a base de sacrificios y privaciones, con todo mi amor y agradecimiento.

A mis hermanos José Antonio, Juana y Victoriano por su cariño y apoyo y que de alguna u otra manera contribuyeron para lograr uno de mis grandes anhelos.

A la memoria de mis abuelitos Severo Guzmán y Julia Diaz, de quienes su recuerdo fue un motivo más para alcanzar esta meta.

A mi tío José Luis (q.e.p.d.) que por su recuerdo y ejemplo que me impulso a seguir una carrera profesional.

A mis familiares y amigos que creyeron en mí, a todos gracias por sus palabras y estímulos.

Q.M.V.Z. Martín Hernández Guzmán,

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor M.V.Z M.C. Arturo Trejo González por su incondicional ayuda y por todas las facilidades para la realización de esta tesis.

Al M.V.Z. M.C. José Alfredo Medrano Hernández por su desinteresada ayuda y amistad.

A mi gran amigo José Luis Anaya García por su amistad y ayuda durante toda la carrera y especialmente durante la última parte de esta gracias.

A todos los profesores que durante toda la carrera me fueron formando como profesional.

A todos mis amigos que durante toda la carrera compartimos sueños y risas así como momentos difíciles.

Gracias. P.M.V.Z. Martín Hernández Guzmán.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	4
Objetivos.....	19
Material y métodos.....	20
Resultados.....	26
Discusión.....	34
Conclusiones y recomendaciones.....	40
Bibliografía.....	41
Anexo.....	45

RESUMEN.

Se trabajó en los meses de julio agosto de 1994, utilizando tres machos caprinos de la raza Alpina Francesa, mantenidos en clima templado. De los cuales se recolectaron 30 muestras de semen por medio de vagina artificial, para determinar el efecto del enfriamiento durante dos horas utilizando dos velocidades de enfriamiento antes de la congelación. Así como evaluar tres concentraciones de yema de huevo (5%, 10% y 20%) utilizando como base diluyente Tris-ácido cítrico-fructuosa, sobre la motilidad progresiva y el daño acrosomal de semen caprino antes y después de congelación. También se utilizó la recuperación de la motilidad progresiva de los espermatozoides como parámetro para la evaluación del semen descongelado.

Los eyaculados se dividieron en 6 alícuotas y se diluyeron en relación 1:5 (v/v). Los tubos con semen se distribuyeron en recipientes de plástico con capacidad de 500 ml y de 250 ml, se llenaron los recipientes de plástico con agua a 37°C y se introdujeron en un refrigerador a temperatura de 5°C, distribuyéndose las 6 alícuotas de cada muestra en un solo nivel.

Se anotó la hora de entrada de los recipientes al refrigerador, así como la temperatura que marcaron los termómetros que estaban en los tubos; después cada 15 minutos se registro la temperatura que marcaban los termómetros por un período de 2 horas.

Una vez transcurridas las 2 horas, se procedió a empacar las muestras en pajillas francesas de 0.5 ml, las cuales se colocaron en vapor de nitrógeno por un período de 15 minutos, para después

introducirlas en el nitrógeno líquido.

Las muestras se conservaron en congelación por un tiempo mínimo de 15 días.

Una vez congeladas las 30 muestras, se procedió a descongelarlas.

Para descongelar las muestras se colocaron tubos con solución de citrato de sodio al 2.9% a 37°C, en donde se metieron las pajillas por un lapso de 1 minuto una vez que fueron sacadas del nitrógeno líquido; pasado el minuto se cortó la pajilla para depositar el contenido en un tubo que contenía 1 ml de citrato de sodio al 2.9% a 37°C, se esperó un tiempo de 10 minutos, para posteriormente observar la motilidad progresiva de cada alícuota.

Se realizaron tinciones con el colorante de Wells-awa antes y después de la congelación; con los frotis obtenidos tanto del semen fresco como del semen congelado se evaluó la integridad del acrosoma, utilizando un microscopio óptico con un aumento de 1000x.

En los cuadrados medios del análisis de varianza fueron significativos los efectos de: porcentaje de yema de huevo ($P < 0.0001$) y la concentración espermática utilizada como covariable ($P < 0.05$).

La recuperación de la motilidad progresiva en el análisis de varianza fue significativo en el nivel de yema ($P < 0.0001$).

La proporción de yema de huevo en relación con la motilidad progresiva fue mejor al 20% y 10%, (36.84% y 33.17%) respectivamente y fue peor para la proporción de 5% (21.92%) ($P < 0.05$).

El ritmo de enfriamiento no afectó la motilidad progresiva.

Tampoco existió interacción entre la proporción de yema y el

ritmo de refrigeración.

Las correlaciones para la motilidad progresiva del semen fresco fueron significativas con concentración espermática y con las anomalías acrosómicas en fresco. Para el descongelado fueron significativas acrosoma normal fresco ($P < 0.0003$), acrosoma hinchado fresco ($P < 0.0001$), acrosoma roto fresco ($P < 0.008$) y acrosoma normal descongelado ($P < 0.01$), acrosoma roto descongelado ($P < 0.0001$), acrosoma ausente descongelado ($P < 0.02$).

INTRODUCCION.

La cabra es un género 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 pude lograr esto último bajo condiciones que son difíciles o parcialmente imposibles para otras especies (Corteel 1975 citado por Castro y Peralta 1986; Roca et al., 1993).

Es por esto que en últimas fechas, al darse cuenta de la gran adaptabilidad y rusticidad que tiene este género al medio ambiente, se ha buscado diferentes procesos para aumentar su productividad (Corteel 1975 citado por Castro y Peralta 1986).

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 este objetivo es la aplicación de la inseminación artificial. Aunque su avance ha sido rápido, no se sabe precisar el origen de la inseminación artificial en los ovinos y caprinos. De acuerdo con las leyendas, parece que desde la época pastoril se practicó la inseminación artificial en ovejas y cabras, trasladando el semen del donante a la hembra receptora (Rodríguez, 1978, citado por Castro y Peralta, 1986).

El informe más antiguo acerca del uso de la Inseminación Artificial fue en 1780, cuando Spallanzani, fisiólogo Italiano obtuvo perritos con este método. Aparecieron otros informes aislados a final del siglo XIX pero solo hasta el año de 1900 se

iniciaron estudios extensos con animales de granja en Rusia y poco después en Japón (Hafez, 1987).

Así como en los ovinos se considera a la Comunidad de Estados Independientes (Ex URSS) pionera de dicho método de reproducción animal, Francia lo es en las cabras (Rodríguez, 1978, citado por Castro y Peralta, 1986).

La inseminación artificial consiste en depositar el semen, por vía instrumental y en el momento más oportuno, en la zona más idónea de las vías genitales femeninas (Derivaux, 1976).

La inseminación artificial es una técnica útil para lograr avances genéticos especialmente de las cabras productoras de leche, ya que se puede realizar pruebas de progenie cuando un semental tiene la facultad de fertilizar a un gran número de hembras incluso en explotaciones diferentes. También facilita la cruce heterocigótica entre razas aumentando el vigor híbrido ya que el semen congelado puede transportarse fácilmente y no hay que llevar sementales a zonas ecológicas desfavorables y permite la absorción de cabras criollas con razas mejoradas (Trejo 1991).

Las principales ventajas de la Inseminación Artificial son:

- 1) Mejoramiento Genético.
- 2) Control de enfermedades venéreas.
- 3) Disponibilidad de registros precisos de reproducción para un buen manejo del Hato.
- 4) Servicio económico.
- 5) Seguridad al eliminar machos peligrosos en la granja (Hafez, 1987).

La Inseminación Artificial juega un papel importante, cuantitativamente y cualitativamente en el incremento de la población

animal y el aprovechamiento de los productos obtenidos requeridos por la población (Azawi et al., 1993).

Tal vez la mayor limitante de la Inseminación Artificial de los caprinos en México es que aún falta la ultraestructura y la organización necesaria para que se pueda realizar en gran escala, pero esto no quiere decir que deban ser descuidados estos aspectos que contribuyen al mejoramiento de la producción (De Lucas, 1982). Además de que México tiene un alto potencial de producción caprina, sin embargo se está importando semen de dudosa calidad genética, por lo que el desarrollo de programas nacionales de mejoramiento genético e inseminación artificial deben ser considerados (Trejo y Grajales, 1991).

La Inseminación Artificial requiere de una serie de procedimientos para que pueda ser realizada y estos son:

- a) Colección, evaluación y conservación del semen.
- b) Detección del estro.
- c) Técnica de Inseminación.

(Noriega, 1984).

La colección del semen puede hacerse en las cabras, por medio de dos técnicas que son:

La vagina artificial.

La electroeyaculación.

La vagina artificial consiste en un tubo rígido de material aislante, dentro del cual se coloca una funda de hule, entre las dos se agrega agua a una temperatura de 42 a 44°C. Una vez cerrados los extremos del tubo, se puede introducir aire por medio de una válvula para darle presión a la cavidad de la vagina artificial, después se coloca un cono de hule con el tubo colector de

semen.

Los machos pueden aprender a realizar la monta primero con hembras en celo natural o inducido, haciéndolo después que se acostumbra con cualquier hembra o maniquí. Una vez que el macho realiza la monta, se desvía el pene y se introduce en la vagina artificial. Cuando se realiza antes de la colección una monta falsa (Se desvía el pene sin introducirlo a la vagina artificial), aumenta la concentración y motilidad de los espermatozoides obtenidos en el eyaculado (González, 1975).

El método de electroeyaculación, se utiliza en animales que rehusan realizar la monta y consiste en la introducción de dos electrodos por el recto, de tal manera que se producen estímulos eléctricos (0-12 volts), sobre las glándulas accesorias, los músculos y nervios responsables de la eyaculación. El semen obtenido de esta manera tiene un mayor volumen de secreciones de glándulas accesorias, por lo que la concentración de espermatozoides en el eyaculado es menor a la obtenida por el método de la vagina artificial (Corteel, 1981; Trejo, 1991).

El volumen de semen normalmente eyaculado es alrededor de 1 ml aunque existen variaciones entre y dentro de razas. Además de las influencias de tipo ambiental, así como de la edad, número de eyaculaciones o forma de recolección. Se han reportado volúmenes que van de 0.5 hasta 5 ml.

El color normal del semen es blanco lechoso hasta un amarillo pajizo con aspecto cremoso; la densidad o relación entre la parte celular y la plasmática, está estrechamente relacionada con el color. De esta forma los colores lechosos y la baja viscosidad están relacionados con bajas concentraciones espermáticas, siendo

lo contrario en aquellos cremosos. A través del color también pueden ser detectadas anomalías como son la presencia de sangre, orina o pus.

El pH normal del semen es ligeramente ácido siendo este de alrededor de 6.8 con fluctuaciones de 6.2-6.5. Los valores más altos están generalmente relacionados con secreciones de las glándulas secretoras, presencia de orina en el eyaculado aunque también ha sido señalado que esta asociado a alta mortalidad espermática.

La motilidad es el primer parámetro a medir de las características microscópicas. La llamada motilidad masal que consiste en colocar una gota de semen fresco sobre un porta objetos que ha sido previamente calentado a 37-38°C, y se observa en un microscopio con una platina a una temperatura similar a la del portaobjeto, para así evitar alteraciones en el comportamiento de los espermatozoides. De acuerdo al tipo y fuerza de movimiento se da una escala de 0 a 5, en el cual, el valor de 0 de la muestra no presenta motilidad y 5 es una motilidad excelente (80%).

La motilidad progresiva se examina al diluir el semen en un preparado de citrato de sodio al 2.9% para obtener una dilución 1:100, se observa con el objetivo de 10X y se evalúa el paso de 10 espermatozoides a través del campo y al igual que en el caso anterior se da una calificación en la cual se asigna un 10% por espermatozoide que avance en forma recta. El semen para ser utilizado en la inseminación debe tener una motilidad progresiva mínima de 70% (Zemjanis, 1981; Agraz, 1984; Trejo, 1984; De Lucas, 1986; Salamon, 1990).

Para conocer la concentración existen dos formas de hacer la

evaluación, una directa a través del conteo de espermatozoides o bien indirecta por medio de un espectrofotómetro. Para realizar el conteo en forma directa se requiere de un hematocitómetro (De Lucas, 1986).

El semen de la mayoría de los machos contiene algunos espermatozoides con defectos de conformación. Esto por lo general, no se asocia con fertilidades más bajas, hasta que la proporción de anormales exceda el 20%. Frecuentemente cuando el semen de un macho muestra un elevado porcentaje de células anormales presenta a la vez baja concentración de espermatozoides y escasa motilidad (Esquivel, 1986). Por lo general, las anomalías se dividen en dos clases: Primarias y Secundarias.

Anormalidades Primarias.- Estas son de origen testicular. Se deben a alguna falla durante el proceso espermatogénico y esta no se corrigió mientras el espermatozoide pasaba por el sistema de conductos.

En cabeza:

- 1.- En forma de pera
- 2.- Redondos
- 3.- Alargados
- 4.- Microcefálicos
- 5.- Macrocefálicos
- 6.- Dobles
- 7.- De acrosoma anormal

Segmento intermedio:

- 1.- Doblado
- 2.- Doble
- 3.- Abaxial

Cola:

- 1.- Enrollada sobre la cabeza
- 2.- Enrollada en forma de ocho
- 3.- Enrollada en situación proximal
- 4.- Enrollada en situación distal
- 5.- Cola rudimentaria
- 6.- Presencia de gota citoplasmática

Anormalidades secundarias.- Estas anomalías aparecen durante el paso de los espermatozoides por el sistema de conductos, después de salir de los tubos seminíferos y del testículo (Sorensen, 1982; Holy, 1983; Pérez, 1984).

- 1.- Cabeza desprendida
- 2.- Gota citoplasmática en el cuello o cola
- 3.- Cola en gancho
(Holy, 1983; Pérez, 1984).

En el cuadro No.1 se observan las características del semen caprino en condiciones normales.

CUADRO 1.
CARACTERISTICAS DE UN SEMEN NORMAL Y ESPECIFICACIONES DE INSEMINACION ARTIFICIAL PARA CABRAS.

	RANGO	MEDIA
Volumen (ml)	0.1-1.5	0.8
Concentración (miles de millones)	2-6	4.5
Motilidad Progresiva (%)	60-80	70
Espermatozoides Anormales (-%)	5-20	11
Concentración a la inseminación	100-150	--
Sitio de inseminación	Cervix-Utero	--

Fuente: Adaptado de Hulet y Shelton, 1980, citado por De Lucas, 1986.

Los machos caprinos pueden eyacular varias veces al día durante varias semanas, sin que disminuyan las reservas de espermatozoides en el epidídimo (Foote, 1979). Pero existen variaciones en el volumen del semen eyaculado durante las estaciones del año. Se ha observado que el volumen máximo se obtiene en otoño y el mínimo durante el invierno (Patil y Raja, 1978).

En algunas razas la concentración espermática no varía en eyaculados fuera de la estación de cría. El aumento del plasma seminal en la estación de cría es por que el epidídimo y glándulas accesorias son andrógeno dependientes y los andrógenos fuera de la estación de cría están disminuidos.

La capacidad espermática se va modificando de acuerdo a la estación y al fotoperíodo; las mejores características seminales en cuanto a motilidad, porcentaje de espermatozoides vivos y de anormales, volumen y color tienen lugar en las razas europeas hacia el otoño, durante la estación de cría, algunas informaciones sobre razas de la India señalan al verano como la época más favorable. Es conveniente recordar que todo el aparato reproductivo se encuentra bajo influencia de complejos hormonales, entre los que destaca la testosterona, la que es fundamental no solo en la espermatogénesis sino en el crecimiento y actividad de las glándulas accesorias, así tenemos que el mayor volumen de eyaculado y su mejor calidad, mostrada por su contenido de fructuosa, ácido cítrico y proteína, influyen sobre otros aspectos como el de la motilidad espermática que se ve aumentada (Barba, 1990; Delgadillo et al., 1992).

Roca et al., (1993), observaron que durante verano y otoño se incrementaba la concentración de fructuosa y ácido cítrico.

Esta diferencia estacional se la atribuyeron a los cambios de la cantidad de luz en días largos. Sin embargo consideran que estos cambios no afectan la calidad del semen debido a que no encontraron diferencias significativas entre los parámetros estudiados (motilidad, morfología y daño acrosomal).

Este efecto se ha observado incluso en espermatozoides recolectados en otra estación y a los que se les añadió plasma seminal de esta época, el efecto inverso se ve cuando se agrega plasma recolectado en estaciones fuera de la cría; esto parece tener su origen en un factor inhibidor de la motilidad (Barba, 1990).

Los cambios que experimenta la calidad espermática según la estación están en íntima relación con su capacidad fertilizadora (De Lucas, 1986).

La cantidad de semen y espermatozoides decrece por la hipertermia por las altas temperaturas ambientales, por la humedad relativa, por las lluvias y por los bajos niveles de energía (Corteel, 1981).

El semen recolectado por los procedimientos antes descritos, sufre una previa dilución apropiada y conveniente de tal forma que el producto de un solo eyaculado puede servir para la inseminación de un número adecuado de hembras (Derivaux, 1976).

La inseminación artificial se inició con la utilización del semen fresco y posteriormente con semen congelado, lo que ha permitido un avance genético en diversas especies particularmente en los bovinos. Sin embargo en la especie caprina, no ha dado resultados tan satisfactorios como en los bovinos, ya que la fertilidad alcanzada ha sido relativamente baja. Pero si compara-

mos el uso de semen congelado entre cabras y borregos, tendremos que en las primeras los resultados son más exitosos (Salamon y Visser, 1974 citado por Esquivel, 1986).

En la inseminación artificial se han empleado diferentes tipos de diluentes como gelatina, yema de huevo, leche descremada y otros; con el propósito de aumentar el volumen del eyaculado y de proveer al espermatozoide de un medio que llene sus requerimientos fisiológicos y le permita sobrevivir y conservar su capacidad fecundante. Pese a la congelación los resultados obtenidos con los diferentes diluentes son similares en cuanto a la recuperación de la motilidad y fertilidad, por lo que es posible emplearlos indistintamente (Blackshaw, 1960).

El semen fresco sin diluir puede utilizarse cuando se aplica en periodos cortos después de haberse obtenido. Se puede conservar el semen diluido a 5°C, declinando la fertilidad pocos días después, por lo que se recomienda utilizar como máximo un día después de la recolección (Noriega, 1984).

Otra forma de conservar el semen es la congelación en nitrógeno líquido (-196°C) con la ventaja de que se obtiene un estado más estable así como un tiempo más prolongado de almacenamiento.

Para la congelación del semen deberá diluirse con un diluyente que lleve un agente crioprotector (Salamon et al., 1990). Muchas células tienen alta recuperación sólo si un crioprotector está presente en el medio que la suspende durante el enfriamiento. Estos compuestos se han clasificado en: a) Penetrantes como el glicerol y el dimetil sulfoxido (DMSO) y b) No penetrantes como la polivinilpirrolidona (PVP) y Polímer Hidroxiethyl starch (HES).

La protección de estos compuestos se basa en la restricción de la congelación intracelular y reducción al mínimo del daño celular debido a los solutos concentrados en el medio durante el enfriamiento (Fraser, 1962; Locksley, 1978).

Diversos autores coinciden en el uso del glicerol como agente crioprotector, los porcentajes recomendados por los autores se encuentran dentro del rango del 4-8% para el uso de este en el diluyente (Fraser, 1962; Fiser y Fairfull, 1984; Salamon et al., 1990; Gurpaul, 1992).

Los diluyentes más comúnmente utilizados para diluir semen, para inseminación artificial, vaginal o cervical, contiene como amortiguador el tris o el citrato, glucosa o fructuosa como fuente de energía y yema de huevo para proteger a la membrana del espermatozoide contra el choque por frío (Salamon et al., 1990; Vishwanath et al., 1992).

En cuanto a los medios que contienen yema de huevo se han obtenido resultados contradictorios para la fertilidad, esto se debe a una característica del plasma seminal del macho cabrío, ya que contiene una enzima (Fosfolipasa A) que se origina en la glándula bulbo-uretral, cuando se utiliza un diluyente conteniendo yema de huevo esa enzima puede degradar la lecitina de la yema, formandose productos tóxicos para los espermatozoides a la vez que se produce la coagulación del medio. A está enzima se le conoce con el nombre de "Enzima que coagula la yema de huevo" (Salamon et al., 1990; Corteel, 1981).

La concentración de la enzima varía entre los diferentes machos cabríos y es más alta cuando se obtiene semen mediante el

electroeyaculador (Salamon et al., 1990).

Corteel (1981), menciona que los diluentes con yema de huevo han sido utilizados con resultados de fertilidad muy irregulares, los diluentes con base de leche descremada han obtenido mejores índices de fertilidad.

Los mejores resultados con semen congelado caprino se han obtenido cuando antes de congelarse se centrifuga y se diluye para concentrar el paquete espermático y así eliminar la mayor cantidad de plasma seminal, con este procedimiento se han aumentado las tasas de fertilidad del semen congelado (Corteel, 1981).

Por otro lado Moreno en 1987, concluyó que el diluyente TRIS se puede utilizar con éxito en la congelación de semen caprino, al utilizarlo después del lavado seminal, ya que los espermatozoides tienen una mejor motilidad progresiva post-descongelación. También menciona que el semen diluido en leche tuvo valores bajísimos de motilidad tanto lavando como sin lavar el plasma seminal (4.9% y 6% respectivamente), lo cual cree que se debió a la concentración de leche utilizada (15%).

Trejo en 1991, comenta que algunos investigadores recomiendan lo que se ha denominado el "lavado del semen", que consiste en extraer el plasma seminal; para ello se adiciona una solución salina fisiológica al semen y se somete a centrifugación, de tal forma de lograr la separación del paquete celular espermático del plasma seminal. De ésta manera se conserva la acción benéfica de las lipoproteínas y lecitinas de la yema que protegen al espermatozoide del choque térmico, sin embargo, se pueden presentar pérdidas de espermatozoides hasta de 70% con doble lavado que deben ser cuantificadas.

En el trabajo realizado por Grajales y Trejo (1991), mencionan que la recuperación de la motilidad progresiva, fue mejor para las muestras de semen sin centrifugar que para las centrifugadas. La variación encontrada, sugiere que las variaciones individuales entre los machos, puede ser más importante el tipo de diluyente empleado o la centrifugación.

El lavado del eyaculado se realiza en solución Krebs-Ringer-Fosfato-Glucosa centrifugando a 700 gravedades/15 minutos. Sin embargo bajo las condiciones de México el semen sin centrifugar ha dado mejores resultados (Trejo, 1991).

Salamon et al., (1990), mencionan la utilización del diluyente yema de huevo-tris-fructuosa, para la congelación de semen caprino.

El semen preparado para congelar se enfría primeramente a 5°C y aquí se le da un tiempo de reposo conocido como período de equilibrio que comprende de 2 a 3 horas (Fraser, 1962; Westhuyssen, 1978; Fiser, 1984; De Lucas, 1986; Moreno, 1987; Grajales y Trejo, 1991), para luego ser colocado en pajillas o preparado en forma de pellets. Se coloca en vapor de nitrógeno por un período de 8 a 10 minutos, lo cual permite que descienda la temperatura de -70 a -80°C y de aquí se sumergen en el nitrógeno líquido para bajar a -196°C, la cual es la temperatura de conservación hasta ser utilizado (De Lucas, 1986).

Lo anterior se debe a que el congelamiento demasiado rápido puede causar un choque térmico y la formación de hielo interno. El congelamiento lento hace que aumente la concentración de sal a medida que el agua se congela éste aumento en la presión osmótica

en un periodo prolongado de congelamiento lento puede dañar las proteínas y lipoproteínas de los espermatozoides y su acrosoma (Goffaux y Corteal, 1967; Hafez, 1987).

Mann en 1964, comparó el consumo espermático de fructuosa en el medio de dilución en semen de toro bajo las siguientes condiciones: fresco, enfriado lentamente y enfriado rápidamente, observando que a los treinta minutos la fructuosa utilizada fue de 2.8, 2.1 y 0.3 mg/ml de semen por cada uno de los tratamientos respectivamente, a los 60 minutos la fructuosa utilizada fue 5, 4.2 y 0.4 mg/ml de semen en el mismo orden y finalmente a los 90 minutos los espermatozoide utilizaron 6.8, 5.9 y 0.5 mg de fructuosa por ml de semen para cada tratamiento respectivamente, el enfriamiento lento en éste trabajo consistió en bajar 5°C por hora, los resultados sugieren que el bajo consumo de fructuosa señalado para el semen con enfriamiento rápido a más de 5°C por hora correspondió a espermatozoides muertos, pero el autor no menciona con que porcentaje se correlacionó.

También hay autores que han bajado la temperatura de 35°C a 5°C en tiempos que varían de 75 minutos a 1.5 horas sin que se afecten o interfieran sus resultados al final de sus pruebas (Robbins et al., 1976; Almquist et al., 1982).

Ennen et al., en 1976, mencionan que en los resultados de su estudio, observó que la motilidad de los espermatozoides enfriados por dos a cuatro horas no varió y que los espermatozoides enfriados por más de cuatro horas mostraron una motilidad superior a aquellos espermatozoides enfriados en 30 minutos.

McDonald, en 1978 menciona que a el semen parcialmente diluido, se le disminuye la temperatura de 35°C hasta 5°C con un

promedio de descenso de 6°C por hora durante un tiempo que va de 5 a 5.5 horas.

En general, dentro del proceso global de congelación de semen se han utilizado y se están utilizando los más diversos tiempos de enfriamiento del semen, que van de 75 minutos hasta 5.5 horas, pero no se tiene ninguna correlación entre los diferentes tiempos y sus efectos en la recuperación espermática post-descongelación (Pinzón, 1993).

Otro elemento importante es el daño acrosomal que se produce durante la dilución y equilibramiento, así como, en menor cantidad, durante el congelado (Furnusek et al., 1981 citados por Castro y Peralta, 1986).

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 (Hafez, 1987).

En células con daño acrosomal, no necesariamente se encuentra afectada la motilidad, pero sí su fertilidad. El 68% del daño acrosomal está distribuido al azar entre la población de células móviles e inmóviles. Debido a esto, la evaluación de motilidad no da un margen confiable de la fertilidad del semen descongelado, sin embargo, la motilidad progresiva ha sido empleada comúnmente para evaluar el resultado de la congelación del semen (Healey, 1969).

OBJETIVOS.

Los objetivos del presente trabajo son:

-Evaluar tres concentraciones de yema de huevo (5%, 10% y 20%) utilizando como base diluyente Tris-ácido cítrico-fructuosa, sobre la motilidad progresiva y el daño acrosomal de semen caprino.

-Evaluar dos velocidades de enfriamiento para la congelación de semen caprino

-Comparar la motilidad progresiva de los espermatozoides antes y después de congelación

-Evaluar la recuperación de la motilidad progresiva de los espermatozoides

-Evaluar el daño acrosomal después de congelación

MATERIAL Y METODOS.

Para la realización del presente trabajo, se utilizaron las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán localizadas en el Municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México a 2450 msnm, a 19° 43' de latitud norte y a 99° 14' de longitud poniente (García, 1973).

Se trabajó en los meses de julio y agosto de 1994, utilizando tres machos caprinos de la raza Alpina Francesa con las siguientes edades, dos con 1 año y uno con 2 años, entrenados para trabajar en la vagina artificial.

Se revisó la condición general de los animales, posteriormente se recolectaron 30 muestras de semen (10 muestras por cada macho).

La vagina artificial en la que se recolectó el semen es un tubo rígido de 12 cm. de largo y de 5 cm. de diámetro, al cual se le colocó una funda de polietileno sujeta en ambos extremos; así mismo, en uno de los extremos se colocó un cono de polietileno el cual contenía su vez un tubo colector graduado cubierto con un protector contra la radiación solar, los cambios de temperatura y los golpes.

A la vagina artificial se le dio presión y temperatura, mediante la utilización de agua caliente de 45 a 55°C y una válvula.

Se preparó una solución madre colocando 81.79 gr. de Tris (Hidroximetil amino-metano), 45.77 gr. de ácido cítrico, 33.76 gr. de fructuosa, 2 500 000 UI de penicilina y 2.5 gr. de estreptomomicina, en 2 500 ml de agua desmineralizada. Una vez homogeneizada la solución se distribuyó en matraces de plástico con una

capacidad de 150 ml cada uno. El diluyente se conservó en congelación, conforme se requirió se fue descongelando un matraz por día de trabajo.

Se preparó el diluyente agregando a la solución madre tres diferentes concentraciones de yema de huevo (5, 10 y 20%) de la siguiente manera: en tres probetas de 50 ml se agregaron 2 ml de glicerol (para una concentración final de 4%) en cada una, en la primera probeta se adicionaron 10 ml de yema más 0.1 ml de colorante vegetal rojo y se aforó a 50 ml con la Solución madre (20%).

En la segunda probeta se adicionaron 5 ml de yema más 0.1 ml de colorante vegetal verde y se aforo a 50 ml con la Solución madre (10%).

En la tercera probeta se adicionaron 2.5 ml de yema más 0.1 ml de colorante vegetal amarillo y se aforó a 50 ml con la Solución madre (5%).

Estando preparados los diluyentes con cada una de las tres concentraciones de Yema se colocaron en un baño María a 37°C y se midió el pH (anexo 1).

Se preparó una solución de citrato de sodio al 2.9%, de la cual se tomaron 9.9 ml y se colocaron en tubos de ensaye de 20 ml que se conservaron a 37°C.

Se preparó la vagina con el método anteriormente mencionado. Se colocó una hembra en estro inducido, en el potro de contención, se sacó a los machos uno por uno realizandoseles una limpieza previa del prepucio con un paño húmedo para disminuir la contaminación del semen.

Una vez que se obtuvo la muestra se determinó por observa-

ción directa la cantidad eyaculada (la muestra para ser procesada debió contener mínimo 0.7 ml de semen) y se colocó en baño maría a 37°C.

De la muestra se tomó 0.1 ml y se diluyó en los tubos con citrato de sodio al 2.9% de manera que se obtuvo una dilución del semen (1:100) (Semen:volumen). Se tomó una gota de esta dilución semen:citrato de sodio y se colocó en un portaobjetos mantenido a temperatura de 37°C para que se evaluara la motilidad progresiva.

Observando al microscopio con el objetivo 10x y expresando el resultado en porcentaje. La evaluación fue realizada por el método de ciego simple.

Para procesar la muestra debió tener el 60% o más de motilidad progresiva, se prepararon 6 alícuotas en parte proporcional al volumen y se agregó diluyente en relación 1:5 (v/v).

Quedando dos alícuotas con la misma concentración de yema en tubos de diferente tamaño de la siguiente manera:

- A) Un tubo con capacidad de 10 ml con dilución semen:diluyente 20%
- B) Un tubo con capacidad de 10 ml con dilución semen:diluyente 10%
- C) Un tubo con capacidad de 10 ml con dilución semen:diluyente 5%
- D) Un tubo con capacidad de 5 ml con dilución semen:diluyente 20%
- E) Un tubo con capacidad de 5 ml con dilución semen:diluyente 10%
- F) Un tubo con capacidad de 5 ml con dilución semen:diluyente 5%

Los tubos con capacidad de 10 ml fueron colocados en recipientes de plástico con capacidad de 500 ml; los tubos con capacidad de 5 ml fueron colocados en recipientes de plástico con capacidad de 250 ml.

Estos tubos se mantuvieron en posición vertical dentro de los recipientes al ser introducidos por un orificio que se hizo

exprofeso en la tapa de los mismos.

Para evitar la contaminación de las muestras los tubos fueron tapados con una película de cera.

Para facilitar el manejo de las muestras, el procedimiento se realizó en dos áreas físicas. En el laboratorio de campo localizado en el área de corrales se obtuvo el semen, se evaluó la motilidad progresiva del semen fresco y se realizó la dilución.

Después las muestras fueron transportadas al laboratorio de reproducción donde se encontraba un baño María con agua a 37°C, con la cual se llenaron los recipientes de plástico y se cerraron.

También se preparó un tubo de 10 ml y otro de 5 ml con 1 ml de diluyente, en cada uno de estos tubos se colocó un termómetro de laboratorio y se introdujo en recipientes de plástico de 500 ml como en recipientes de 250 ml respectivamente, a los cuales también se les colocó agua a 37°C y sirvieron para establecer el ritmo de refrigeración.

Una vez que todos los recipientes se llenaron con agua se introdujeron en un refrigerador a temperatura de 5°C, distribuyéndose las 6 alícuotas de cada muestra en un solo nivel.

Se anotó la hora de entrada de los recipientes al refrigerador, así como la temperatura que marcaron los termómetros que estaban en los tubos, después cada 15 minutos se registró la temperatura que marcaban los termómetros por un periodo de 2 horas.

Una vez transcurridas las 2 horas, se procedió bajo refrigeración a empacar las muestras en pajillas francesas de 0.5 ml, las cuales se colocaron en vapor de nitrógeno por un periodo de

15 minutos, para después introducir las en el nitrógeno líquido.

Las muestras se conservaron en congelación por un tiempo mínimo de 15 días.

Con la dilución de semen:citrato de sodio se hicieron tinciones con el colorante de Wells-awa, permaneciendo por 15 minutos en la estufa a 37°C, para después realizar un frotis .

De la dilución 1:100 semen:citrato de sodio, se tomó un mililitro y se diluyó en un mililitro de solución de Hancock para tener una dilución (1:200) (semen:volumen) con lo cual se evaluó la concentración espermática en una cámara de hematocitómetro.

Una vez congeladas las 30 muestras, se procedió a descongelarlas.

Para descongelar las muestras se preparo un baño maría a 37°C, en el cual se colocaron tubos con capacidad de 10 ml con solución de citrato de sodio al 2.9%, en donde se metieron las pajillas por un lapso de 1 minuto una vez que fueron sacadas del nitrógeno líquido; pasado el minuto se corto la pajilla para depositar el contenido en un tubo de 5 ml que contenía 1 ml de citrato de sodio al 2.9%, se esperó un tiempo de 10 minutos, para posteriormente observar la motilidad progresiva de cada alícuota.

Una vez observada la alícuota, se realizó una tinción con el colorante de Wells-awa, se mantuvo en una platina térmica a 37°C por 15 minutos y se procedió a realizar el frotis del mismo.

Con los frotis obtenidos tanto del semen fresco como del semen congelado se evaluó la integridad del acrosoma, utilizando un microscopio óptico con un aumento de 1000x.

Se consideró como recuperación de la motilidad progresiva a

la proporción existente entre la motilidad del semen descongelado y la motilidad del semen fresco, asignando a este último un valor del 100%.

Los datos, fueron evaluados estadísticamente por análisis de varianza con efectos fijos, utilizando al semental como bloque y los valores de semen fresco como covariable mediante el método de cuadrados medios, utilizando el programa SAS en su rutina GLM. Las variables representadas en porcentaje, fueron transformadas al arcoseno raíz cuadrada de la proporción, para cumplir con el supuesto de normalidad del análisis de varianza, comparando las medias en la misma rutina SAS por diferencia mínima significativa (Steel y Torrie, 1980) utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + R_j + T_i * R_j + A_k + S_1(Fn-F\bar{n}) + S_2(Vn-V\bar{n}) + S_3(Cn-C\bar{n}) + E_{ijk}$$

Donde:

- Y es la variable de respuesta.
- μ es la media poblacional constante.
- T_i es el efecto del i-ésimo nivel de yema (i = 1,2,3).
- R_j es el efecto del j-ésimo ritmo de refrigeración (j = 1,2,).
- $T_i * R_j$ es la interacción entre el nivel de yema y el ritmo de refrigeración.
- A_k es el efecto del k-ésimo semental utilizado como bloque.
- $S_1(Fn-F\bar{n})$ es la variable de respuesta medida en el semen fresco, utilizada como covariable.
- $S_2(Vn-V\bar{n})$ es el volumen del semen destinado como alícuota, utilizado como covariable.
- $S_3(Cn-C\bar{n})$ es la concentración espermática del eyaculado evaluada en el semen fresco y utilizada como covariable.
- E_{ijk} es el error aleatorio \sim NID (0, σ^2).

RESULTADOS.

En el cuadro 1 aparecen los cuadrados medios del análisis de varianza y se aprecia que fueron significativos los efectos de: porcentaje de yema de huevo ($P < 0.0001$) y la concentración espermática utilizada como covariable ($P < 0.05$).

La recuperación de la motilidad progresiva en el análisis de varianza se distingue que fue significativo en el nivel de yema ($P < 0.0001$) (Cuadro 2).

La proporción de yema de huevo en relación con la motilidad progresiva fue mejor al 20% y 10%, (36.84% y 33.17%) respectivamente y fue peor para la proporción de 5% (21.92%) ($P < 0.05$) (Cuadro 3).

El ritmo de enfriamiento no afectó la motilidad progresiva (Cuadro 4).

Tampoco existió interacción entre la proporción de yema y el ritmo de refrigeración (Cuadro 5) (Grafica 1).

En el cuadro 6 se publican las conclusiones para la motilidad progresiva tanto del semen fresco y del descongelado y se puede apreciar que para el fresco fueron significativas con concentración espermática y con las anomalías acrosómicas en fresco. Para el descongelado fueron significativas acrosoma normal fresco ($P < 0.0003$), acrosoma hinchado fresco ($P < 0.0001$), acrosoma roto fresco ($P < 0.008$) y acrosoma normal descongelado ($P < 0.01$), acrosoma roto descongelado ($P < 0.0001$), acrosoma ausente descongelado ($P < 0.02$).

CUADRO 1.
ANALISIS DE VARIANZA PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA Y LA INTEGRIDAD DEL ACROSOMA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS CONGELADOS CON TRES PROPORCIONES DE YEMA DE HUEVO Y DOS RITMOS DE REFRIGERACION.

FUENTES DE	gl	CUADRADOS				MEDIOS
		MOTILIDAD PROGRESIVA	ACROSOMA NORMAL	ACROSOMA HINCHADO	ACROSOMA ROTO	ACROSOMA AUSENTE
Chivo	2	522.80	142.89	148.02	51.85**	1.61
Nivel de yema	2	3586.41****	110.27	39.66	16.91	0.12
Ritmo de refrigeración	1	116.60	1.25	2.68	2.81	0.08
Yema X Refrigeración	2	41.61	140.78	130.24	5.48	0.95
Motilidad progresiva semen fresco (covarianza)	1	75.24	0.62	0.08	3.43	1.13
Volumen útil eyaculado (covarianza)	1	0.44	113.41	339.66*	13.17	9.01***
Volumen por alicuota (covarianza)	1	392.16	132.60	234.38	0.42	4.31**
Concentración	1	970.87*	779.27**	294.50	125.23***	1.03
Error	168	206.85	112.59	89.89	8.95	0.65

* P<0.05
 ** P<0.01
 *** P<0.001
 **** P<0.0001

CUADRO 2.
ANALISIS DE VARIANZA PARA RECUPERACION DE MOTILIDAD
PROGRESIVA DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS.

FUENTES DE VARIACION	gl	RECUPERACION MOTILIDAD PROGRESIVA
Chivo	2	1198.50
Nivel de yema	2	7201.52****
Ritmo de refrigeración	1	167.83
Yema X Refrigeración	2	49.27
Error	172	471.99

* P<0.05
 ** P<0.01
 *** P<0.001
 **** P<0.0001

CUADRO 3.

PORCENTAJES AJUSTADOS POR LA COVARIANZA DE LOS VALORES DEL SEMEN FRESCO PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA, RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA E INTEGRIDAD ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS POST-DESCONGELACION, CON TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE YEMA DE HUEVO.

TRATAMIENTO	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROG. (medias \pm Error Estándar)	A C R O S O M A			
			NORMAL	HINCHADO	ROTO	AUSENTE
Yema 20%	36.84 \pm 1.85 (a)	52.99 \pm 2.80 (a)	65.33 \pm 1.84	30.73 \pm 1.79	3.51 \pm 0.33	0.31 \pm 0.07
Yema 10%	33.17 \pm 1.85 (a)	47.76 \pm 2.80 (a)	66.05 \pm 1.84	30.71 \pm 1.79	2.90 \pm 0.33	0.28 \pm 0.07
Yema 5%	21.92 \pm 1.87 (b)	31.95 \pm 2.80 (b)	67.08 \pm 1.84	30.21 \pm 1.79	2.30 \pm 0.33	0.23 \pm 0.07

Literales diferentes en las columnas representan diferencia significativa ($P < 0.05$)

CUADRO 4.
 PORCENTAJES AJUSTADOS POR LA COVARIANZA DE LOS VALORES DEL SEMEN FRESCO PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA, RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA E INTEGRIDAD ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS POST-DESCONGELACION, CON DOS DIFERENTES RITMOS DE REFRIGERACION ANTES DE CONGELAR.

TRATAMIENTO	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROG. (medias \pm Error Estándar)	A C R O S O M A			
			NORMAL	HINCHADO	ROTO	AUSENTE
3 Recipiente de 500 ml	31.45 \pm 1.51	45.20 \pm 2.29	67.36 \pm 1.50	29.41 \pm 1.46	2.96 \pm 0.27	0.30 \pm 0.06
Recipiente de 250 ml	29.84 \pm 1.52	43.27 \pm 2.29	64.94 \pm 1.50	31.70 \pm 1.46	2.84 \pm 0.27	0.25 \pm 0.06

No se encontro diferencia significativa.

CUADRO 5.
 PORCENTAJES AJUSTADOS POR LA COVARIANZA DE LOS VALORES DEL SEMEN FRESCO PARA LA MOTILIDAD PROGRESIVA, RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA E INTEGRIDAD ACROSOMAL DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS POST-DESCONGELACION Y SUS INTERACCIONES ENTRE TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE YEMA DE HUEVO Y DOS DIFERENTES RITMOS DE REFRIGERACION ANTES DE CONGELAR.

YEMA X REFRIGERACION	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROG. (medias \pm Error Estándar)	A C R O S O M A			
			NORMAL	HINCHADO	ROTO	AUSENTE
Yema 20% X recipiente 500 ml	37.01 \pm 2.62	53.13 \pm 3.96	65.00 \pm 2.60	31.13 \pm 2.53	3.66 \pm 0.47	0.33 \pm 0.11
Yema 20% X recipiente 250 ml	36.67 \pm 2.62	52.85 \pm 3.96	65.66 \pm 2.60	30.33 \pm 2.53	3.36 \pm 0.47	0.30 \pm 0.11
Yema 10% X recipiente 500 ml	33.67 \pm 2.62	48.59 \pm 3.96	69.60 \pm 2.60	27.46 \pm 2.53	2.63 \pm 0.47	0.30 \pm 0.11
Yema 10% X recipiente 250 ml	32.67 \pm 2.62	46.94 \pm 3.96	62.50 \pm 2.60	33.96 \pm 2.53	3.16 \pm 0.47	0.26 \pm 0.11
Yema 5% X recipiente 500 ml	23.67 \pm 2.62	33.88 \pm 3.96	67.50 \pm 2.60	29.63 \pm 2.53	2.60 \pm 0.47	0.26 \pm 0.11
Yema 5% X recipiente 250 ml	20.16 \pm 2.67	30.01 \pm 3.96	66.66 \pm 2.60	30.80 \pm 2.53	2.00 \pm 0.47	0.20 \pm 0.11

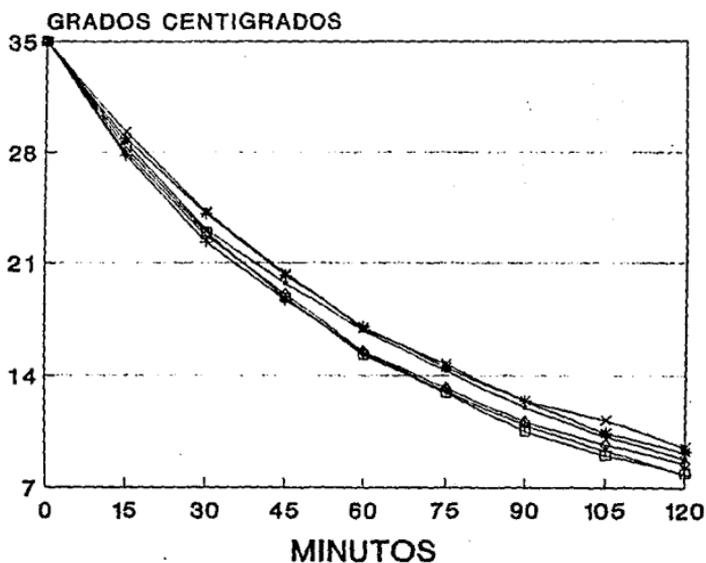
No existio interacción significativa entre la proporción de yema utilizada y el ritmo de enfriamiento.

CUADRO 6.
 CORRELACIONES ENTRE LA INTEGRIDAD ACROSOMAL, LA MOTILIDAD PROGRESIVA (DEL SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO), CONCENTRACION ESPERMATICA, VOLUMEN POR ALICUOTA Y VOLUMEN UTIL EYACULADO, DE ESPERMATOZOIDES CAPRINOS.

	MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN FRESCO	MOTILIDAD PROGRESIVA SEMEN DESCONGELADO	VOLUMEN UTIL POR EYACULADO	VOLUMEN POR ALICUOTA
Concentración espermática	0.35 P<0.0001	NS	0.36 P<0.0001	0.39 P<0.001
Motilidad progresiva semen descongelado	0.11 P<0.13	NS	NS	-0.13 P<0.07
Acrosoma Normal Fresco	-0.28 P<0.0001	0.26 P<0.0003	NS	NS
Acrosoma Hinchado Fresco	0.23 P<0.001	-0.29 P<0.0001	NS	NS
Acrosoma Roto Fresco	0.19 P<0.01	-0.19 P<0.008	NS	NS
Acrosoma Ausente Fresco	0.19 P<0.009	NS	-0.21 P<0.003	-0.22 P<0.002
Acrosoma Normal Descongelado	NS	0.17 P<0.01	NS	NS
Acrosoma Hinchado Descongelado	NS	NS	NS	NS
Acrosoma Roto Descongelado	NS	-0.34 P<0.0001	NS	NS
Acrosoma Ausente Descongelado	NS	-0.16 P<0.02	NS	NS

NS = no significativo.

GRAFICA 1. RITMO DE ENFRIAMIENTO PARA SEMEN CAPRINO DILUIDO CON DIFERENTES NIVELES DE YEMA DE HUEVO.



YEMA 20, 10 Y 5%

- | | | |
|----------------|---------------|---------------|
| —●— 20%-500 ML | —+— 20%-250ml | —*— 10%-500ml |
| —□— 10%-250ml | —x— 5%-500ml | —○— 5%-250ml |

DISCUSION.

Para la concentración de yema al 20%, los resultados obtenidos en este trabajo respecto al porcentaje de motilidad progresiva son inferiores a lo reportado por los siguientes autores que trabajaron con la misma concentración.

Deka et al., (1987) utilizando diluyente de Tris-Yema de huevo obtuvieron 67.52% de motilidad progresiva.

En 1988 Özsar et al., reportan una motilidad progresiva de 60-65% al utilizar como diluyente base Leche descremada, glucosa y glicerol al 7%. Los resultados obtenidos por los autores antes mencionados también fueron superiores a los reportados por Tuli et al., (1992) y Pintado et al., (1992) los cuales obtuvieron 44.5% y 45.6% de motilidad progresiva post-descongelación respectivamente, con la diferencia de que Tuli et al., (1992) utilizaron 6.8% de glicerol y Pintado et al., (1992) utilizo glucosa en vez de fructuosa en el diluyente. Sin embargo Valencia et al., (1993) obtuvieron que la motilidad progresiva post-descongelación tuvo un rango de 58.7 a 62.7%, y al igual que Pintado et al., (1992) quienes agregaron glucosa al diluyente a diferencia de este trabajo en el cual se utilizó fructuosa.

Cabe mencionar que en las dos horas en que el semen se refrigeró la temperatura llegó a 7-9°C, a diferencia de lo reportado por la mayoría de los autores que refrigeraron las muestras hasta alcanzar los 5°C de temperatura, sin mencionar cuanto tiempo tardaron las muestras en llegar a esa temperatura.

Para la recuperación de la motilidad progresiva obtenida en este trabajo fue similar a la reportada por Grajales y Trejo

(1991) y Medrano (1993) (el cual trabajo con ovinos y una concentración de 24% de yema de huevo) los cuales reportan 50.7 y 50% respectivamente, pero es inferior a lo reportado por Valencia et al., (1993) que obtuvieron un rango de 73.6 a 78.5%.

En lo que respecta a la integridad del acrosoma Deka y Rao (1985) reportaron que para el diluyente Tris-Yema el daño acrosomal fue de 12.37%. El mismo autor pero en 1987 reporta 12.35% de daño acrosomal para el mismo diluyente. Sin embargo estos resultados son superiores a los reportados por Valencia et al., (1993) los cuales obtuvieron 9.27% de daño acrosomal. Los resultados antes mencionados fueron inferiores a los obtenidos en este trabajo (33.8%).

Pintado et al., (1992) utilizando el diluyente Tris-Yema en las mismas proporciones obtuvieron 37.8% de acrosomas normales el cual resultado inferior que el porcentaje obtenido en este trabajo (67.3%), este resultado, los autores lo adjudican a un efecto del plasma seminal, el cual fue evidente que actuó después de descongelar.

Los resultados para la concentración de yema al 10% obtenidos en este trabajo resultaron ser superiores para la motilidad progresiva a los resultados reportados por Ritar y Salamon (1991) y Azawi et al., (1993) los cuales fueron 16.6 y 21.7% respectivamente. Cabe mencionar que la concentración de yema utilizada por Ritar y Salamon (1991) fue de 12%.

Con respecto al daño acrosomal Azawi et al., (1993) obtuvieron un 33.4% de anomalías acrosómicas el cual es similar al resultado obtenido en este trabajo (33.8%). Las diferencias encontradas entre los autores mencionados y este trabajo pueden

ser debidas al tiempo de almacenamiento de las muestras, debido a que algunos autores lo realizaron por periodos de tiempo menores al realizado en este trabajo.

Salamon et al., (1990) publica y recomienda la utilización de la yema de huevo a una concentración de 5%, mencionando que no habrá peligro siempre que no se diluya a proporciones superiores de 1:3 (semen:diluyente) y ademas añade "si se precisa de una mayor concentración se debe reducir la cantidad de yema de huevo, para evitar la coagulación del medio". El mismo autor en colaboración con Ritar pero en 1991 reportan una motilidad progresiva de 21.3% utilizando como diluyente base Tris y una concentración de yema al 6%. Este resultado es similar al obtenido en este trabajo de acuerdo al porcentaje, pero no de acuerdo a que sea la mejor concentración para la congelación de semen caprino.

Aunque Ritar y Salamon (1991) encontraron diferencias entre las concentraciones de yema de huevo y la época del año en su trabajo, Roca et al., (1993) mencionan que aunque existen variaciones en el plasma seminal, no consideran que estos cambios afecten la calidad del semen, debido a que no encontraron diferencias significativas entre los parámetros que estudiaron (motilidad, morfología e integridad acrosomal). Ademas de que no se puede establecer una concentración de yema determinada para la dilución del semen caprino, debido a las variaciones que suelen presentar los machos entre si.

Para el ritmo de refrigeración Gilbert y Almqvist (1978) reportaron que al enfriar el semen de bovino en 3.5 horas de 28 a 5°C se obtenía mayor porcentaje de acrosomas intactos (61%) y motilidad progresiva (35%), que enfriando en 0.5 horas. Estos

autores utilizaron una concentración de yema de 20% y 6% de glicerol.

Dhami et al., (1992), al trabajar con semen de bovino observaron que enfriando de 10 a 5°C en diferentes periodos de tiempo (15, 30, 60 y 120 minutos), obtuvieron un 68.6% de motilidad progresiva al enfriar durante 120 minutos de 10 a 5°C, el semen ya se encontraba en pajillas y los autores no mencionan la concentración de yema utilizada.

Dhami y Shani (1993), utilizando el diluyente Tris como base y una concentración de yema del 10% obtuvieron un porcentaje de 40.8 de motilidad progresiva post-descongelación, al utilizar un enfriamiento de 30 a 5°C durante un periodo de 2 horas.

Pinzón, (1993) al enfriar semen de bovino de 35 a 5°C durante un periodo de 90 minutos obtuvo un porcentaje de recuperación de la motilidad progresiva de 45.3, a diferencia de este trabajo el autor utilizo como diluyente base Citrato de sodio y yema a una concentración de 20%. Todos estos autores concluyeron que es mejor utilizar un enfriamiento lento que uno rápido.

En este trabajo no se encontraron diferencias significativas entre el ritmo de refrigeración, motilidad progresiva, integridad del acrosoma y proporciones de yema de huevo (5,10 y 20%), con relación al manejo del enfriamiento antes de congelar el semen solo se encontraron referencias en bovinos, sin embargo, la diferencia entre la capacidad de los recipientes, utilizada en este trabajo, pudo ser un factor que contribuyo a que no existiera diferencia entre los ritmos de refrigeración empleados, ya que otros autores evaluaron recipientes de mayor capacidad contra recipientes de mucho menor capacidad (1200 ml vs. 250 ml).

La correlación entre motilidad progresiva del semen fresco y la concentración espermática nos indica que a mayor concentración el porcentaje de motilidad progresiva es mayor, esto creemos que se debe a un efecto óptico al evaluar la motilidad progresiva de un eyaculado.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la correlación entre la motilidad progresiva y las anomalías acrosómicas, no existe una influencia de la conformación del acrosoma (normal, hinchado, roto o ausente) sobre la motilidad progresiva que presenten los espermatozoides.

Healey (1969) menciona que en células con daño acrosomal, no necesariamente se encuentra afectada la motilidad, pero si su fertilidad. El 68% de daño acrosomal esta distribuido al azar entre la población de células móviles. Debido a esto la evaluación de la motilidad no da un margen confiable de la fertilidad del semen.

Tasserón et al., (1977) mencionan que si bien el daño acrosomal es causante de infertilidad, mucho más importante es la motilidad progresiva de los espermatozoides.

Bernabé y Tello (1985) observaron que si existe una correlación entre las anomalías acrosómicas y la motilidad progresiva, pero estos autores se lo atribuyeron al tipo de diluyente utilizado. A diferencia de otros autores y a la luz de los estudios sobre la integridad de las membranas pareciera que son importantes tanto la motilidad progresiva como la integridad del acrosoma, para lograr un alto índice de concepción al utilizar la inseminación artificial.

EL utilizar diferentes ingredientes en el diluyente hace suponer que fue uno de los factores que influyeron en los resultados obtenidos, otro factor que pudo haber sido determinante, fue el tiempo empleado en el procesamiento de las muestras, es decir el tiempo transcurrido entre la recolección de la muestra hasta antes del proceso de refrigeración, el cual vario de 15 a 25 minutos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Una vez analizados los resultados se concluye lo siguiente:

-La concentración de yema de huevo al 20% y 10% fue mejor protector que la concentración de yema al 5%, en relación a la motilidad progresiva, bajo las condiciones en que se realizó este trabajo.

-El ritmo de refrigeración durante el periodo de dos horas no afectó la motilidad progresiva de las muestras trabajadas.

-Las proporciones de daño acrosomal no se vieron afectadas ni por la concentración de yema de huevo, ni por el ritmo de enfriamiento utilizados en este trabajo.

-Se recomienda la utilización del valor de la recuperación de la motilidad progresiva como parámetro para la evaluación del semen descongelado.

-De acuerdo a los resultados obtenidos y a la controversia existente en la bibliografía consultada, se sugiere se busque la concentración de yema de huevo ideal en el diluyente Tris de acuerdo a cada macho cabrío que se haya seleccionado para trabajar.

BIBLIOGRAFIA.

Almqvist J.O., Grube K.E. y Rosenberger J.L., 1982. Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in french straws. *J. Dairy Sci.* 65:824.

Arbiza S., 1978. Estado actual de la producción animal en México. *Boletín de ruminantes*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. 2(2):91-122.

Azawi O.I., Al-Dahash S.Y.A. y Juma F.T., 1993. Effect of diferent diluents on Shami goat semen. *Small ruminant research.* (9):347-352.

Barba C.G.J., 1990. Efecto de la yema de huevo de gallinas Rhode Island o Leghorn y del centrifugado sobre algunas características del semen caprino. Tesis licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Blackshaw A.W., 1960. The effect of milk diluents on the viability of ram spermatozoa and their revival after freezing. *Aust. Vet. J.* 36: 432-435.

Carrillo A.Ma.L. y Orozco C.S.E., 1983. 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 licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Castro M.P. y Peralta L.M., 1986. Efecto del glicerolado lento y rápido sobre la motilidad progresiva y el daño acrosomal en espermatozoides congelados de carnero y macho caprino. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Corteel J.M., 1967. Survival of He-goat spermatozoa in whole or fractionated egg-yolk associated with a sodium citrate buffer solution and antibiotics. *Ann. Zootech.* 16(I): 11-15.

Corteel J.M., 1981. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. In: Gall (ed) *Goat Prod.* Academic Press Inc. London.

De Lucas T.J., 1982. Inseminación artificial en ovinos. *Memorias 3er curso teórico-práctico de inseminación artificial*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

De Lucas T.J., 1986. Inseminación artificial en caprinos. En: Arbiza A.S. *Producción en caprinos*. AGT Editor S.A., México D.F.

Delgadillo J.A., Leboeuf B. y Chemineau D., 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat buck. *Small ruminant research.* 9:47-59.

Derivaux J., 1976. *Reproducción de los animales domésticos*. Editorial Acribia, Zaragoza España.

Dhami A.J., Sahni K.L. y Mohan G., 1992. Effect of varios cooling rates (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on the deep freezing of *Bos taurus* and *Bos bubalis* semen. *Theriogenology* 38:565-574.

Dhami A.J. y Sahni K.L., 1993. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep-freezing, enzyme Leakage and fertility of Taurine bull spermatozoa. *Theriogenology*. 40:1269-1280.

Ennen B.D., Berndtson W.E., Mortimer R.G. y Pickett B.W., 1976. Effect of processing procedures on motility of bovine spermatozoa freezing in 0.25 ml straws. *J. Anim. Sci.* 43 (3): 651

Esquivel C.H., 1987. Comparación de cuatro tinciones para evaluar la morfología espermática en semen caprino fresco y congelado. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Fiser P.S. y Fairfull R.W., 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on criosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*. 21: 542-551.

Fraser A.F., 1962. A technique for freezing goat semen and results of small breeding trial. *The Canadian Veterinary Journal*. Vol. 3 No. 5.

Foot W.C., 1979. Breeding without checking estrus: Artificial insemination on a fixed time schedule. *The quarterly magazine of dairy goat artificial insemination*.

Furnusek L., Větvická V. y Petelíková J., 1981. The effect of long term storage diluents on the acrosome of ram spermatozoa. *Vet. Med.* 26(4):213-221.

Gilbert G.R. y Almquist J.O., 1978. Effects of processing procedures on post-thaw acrosomal retention and motility of ovine spermatozoa packaged in .3ml straws at room temperature. *J. Anim. Sci.* 46;No. 1:225-231.

Goffaux M. y Corteel J.M., 1967. A trial of different freezing processes for goat semen. *Ann. Zootech.* 16(2):213-216.

González S.C., 1975. Inseminación artificial en cabras con semen congelado. *Ciencias Veterinarias*. Maracaibo. 5(12):85-103.

Grajales L.H., Trejo G.A., 1991. Efecto de la centrifugación simple o doble sobre la motilidad progresiva y la morfología de espermatozoides caprinos congelados en tres diluentes diferentes. *VII Reunión nacional sobre caprinocultura*. Monterrey N.L. México.

Gurpaul S., Pangawkar G.R. y Jagir S., 1992. Influence of some sugars on buffalo bull spermatozoa at different stages of cryopreservation. *Indian Vet. J.* 69: 808-810.

Hafez E.S.E., 1987. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. Nueva editorial Interamericana, México D.F.

Healey P., 1969. Effect of freezing on the ultrastructure of spermatozoa of some domestic animals. *J. Reprod. Fert.* 18: 21-27.

Herrepa O.D., Siman G.C. y Trejo G.A., 1987. Evaluación de tres métodos para estimar la motilidad de semen caprino fresco y refrigerado en dos diluentes. *Memorias de la II Reunión nacional sobre caprinocultura*. Facultad Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Holy L., 1983. *Bases biológicas de la reproducción bovina*. Editorial Diana.

Mann T., 1964. Influence of ion concentration dilution, temperature and other extraneous factors, on semen *in vitro*. En *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. 2nd Ed. Methuen and Co. LTD, U.K.: 339-364.

McDonald L.E., 1978. *Reproducción y endocrinología veterinarias*. Segunda edición, Nueva Editorial Interamericana, México D.F.

Medrano H.J.A., 1993. Congelación de semen de carnero diluido en Tris y en leche, filtrado a través de borosilicato. Tesis maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Moreno M.V., 1987. Comparación de las características seminales *in vitro* y la fertilidad del semen caprino utilizando dos diluyentes y el lavado seminal. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Moreno V.C., 1984. Inseminación artificial en ganado caprino (revisión bibliográfica). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Neria V.J.B. y Sotar P.A.J., 1984. Comparación entre la motilidad y morfología de los espermatozoides de carnero antes y después de la congelación de muestras obtenidas con vagina artificial y electroeyaculador. Tesis licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Noriega N.L., 1984. La inseminación artificial en caprinos. En *Revista Ganadero*. 9(5):70.

Patil R.V. y Raja, 1978. Effect of season on the semen characteristics of Malabari bucks. *Mannuty J. Vet.* 55:761-763.

Pérez E.D.A., 1984. Elaboración de un cuadro básico de anomalías espermáticas en ovinos. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Pinzón H.S., 1993. Evaluación de tres diferentes tiempos de enfriamiento para la congelación de semen bovino por medio de la recuperación espermática post-descongelación. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Ramírez R.S., 1982. Evaluación de la motilidad y anomalías en los espermatozoides ovinos antes y después de la congelación de semen en pellets. Tesis licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México.

Reyes C.P., 1978. *Diseño de experimentos agrícolas*. Editorial Trillas, México D.F.

Ritar A.J. y Salamon S., 1991. Effects of month of collection, method of processing, concentration of egg yolk and duration of frozen storage on viability of Angora goat spermatozoa. *Small ruminant research*. 4:29-37.

Robbins R.K., Saacke R.G. y Chandler P.T., 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws. *J. Anim. Sci.* 42(1):145.

Roca J., Martínez E. y Vázquez, 1993. Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciano-Granadina goats. *Small ruminant research*. 10:219-226.

Rodríguez P.V., 1978. *Inseminación artificial*. Editorial Pueblo y educación.

Salamon S., Evans G. y Maxwell W.M.C., 1990. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. Editorial Acribla, Zaragoza España.

Sorensen A.M., 1982. *Reproducción animal, principios y prácticas*. Editorial Mac Graw-Hill. México.

Tasseron F., Amir D. y Schindler H., 1977. Acrosoma damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J. Reprod. Fert.* 51(2):461-462.

Trejo G.A., 1984. Características del semen caprino. *I Reunión nacional sobre caprinocultura*. 20-22 de Septiembre, Saltillo Coahuila, México.

Trejo G.A., 1991. Inseminación artificial y control del ciclo estral en caprinos. *Memorias del simposium de reproducción y genética en caprinos productores de leche*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Asociación Mexicana de Producción Caprina A.C.

Valencia M.J., González G.G., González G.M. y Trejo G.A., 1993. Motilidad y daño acrosomal del semen caprino congelado en pajillas de 0.24 y 0.5ml y descongelado a dos diferentes ritmos de temperatura. *XVIII Congreso nacional de bujería*. 11-13 de Noviembre, México D.F.

Vishwanath R., Shannon P. y Curson B., 1992. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 29:185-194.

Wayne W.D., 1982. *Bioestadística*. Ed. Limusa, México D.F.

Westhuysen J.M.vander, 1978. Observations on the deep-freezing of Angora goat semen. *Afr. J. Anim. Sci.* 8:111-113.

ANEXO 1.

pH DE LOS DILUENTES UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO

SUSTANCIA	pH
Solución madre	6.26
Yema de huevo	6.31
Solución madre + glicerol	6.35
Solución madre + glicerol + yema 5%	6.36
Solución madre + glicerol + yema 10%	6.35
Solución madre + glicerol + yema 20%	6.42
Solución madre + glicerol + yema 5% + colorante	6.36
Solución madre + glicerol + yema 10% + colorante	6.35
Solución madre + glicerol + yema 20% + colorante	6.44