



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"EVALUACION DE LA MOTILIDAD Y ANOR-
MALIDADES EN LOS ESPERMATOZOIDES
OVINOS ANTES Y DESPUES DE LA CONGE-
LACION DE SEMEN EN PELLETS"**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
SATURNINO RAMIREZ RUIZ

Asesor:

M. V. Z. ARTURO A. TREJO GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1982



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 esta 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.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	5
MATERIAL Y METODOS	6
RESULTADOS Y DISCUSION	9
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	13
BIBLIOGRAFIA	14
ANEXOS	17

INTRODUCCION

El principal objetivo de la inseminación artificial 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 sus capacidades para transmitir rasgos o caracteres de importancia económica. (Mc.Donald, 1975).

La inseminación artificial es una herramienta que puede resultar de mucha utilidad en todos aquellos casos en que interese hacer un uso más intensivo de los reproductores machos. Esto puede ser utilizando cuando se tiene por objetivo la absorción de una raza por otra y de ser reducido el número de ejemplares de la raza absorvente. En este sentido ha sido utilizada con éxito, absorbiendo razas nativas con razas mejoradas. (Ponzoni, 1973).

La inseminación artificial ha logrado un notable avance y 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 del material genético a partir de sementales seleccionados, la inseminación artificial ha estimulado la investigación básica y aplicada en la producción, crianza y economía animal. (Mc. Donald, 1975).

ASPECTO GENERAL DE LA INSEMINACION ARTIFICIAL EN
OVINOS

Desde el punto de vista del mejoramiento genético dentro de una raza, la ventaja de la inseminación artificial radica en las posibilidades que ofrece de aumentar la intensidad de selección al permitir un 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 consanguinidad son más notorios en rebaños de tamaño reducido. -(Ponzoni, 1973).

La inseminación artificial en otras especies de animales no ha avanzado en el mismo grado que en bovinos, debido primariamente a razones técnicas y económicas. Es esencial una restricción racional en la aplicación de la inseminación artificial a grandes poblaciones, si no se esta seguro que los sementales han sido seleccionados por los metodos genéticos adecuados ya que con la inseminación artificial se puede distribuir ampliamente material genético inferior, así como se puede lograr mejoramiento genético.(Mc.Donald, 1975).

En especies de reproducción estacional como los ovinos, una ventaja en la conservación del semen, es que pueden almacenarse en la estación reproductiva cuando éste se produce de mejor calidad, y puede ser aplicado en cualquier época a las ovejas. (Rao y Pandey, 1977).

Una de las principales causas del poco uso de la técnica en los ovinos es la dificultad para conservar el semen. (Durán de Campo, 1980).

La congelación del semen en forma de pastillas o pellets puede ser una solución a futuro por su fácil manejo aunque actualmente no podemos esperar resultados del todo satisfactorios. (Visser-1974a, b y c).

Rao y Pandey, (1977) reportan que probando cinco diluentes durante diferentes estaciones del año: El semen producido durante la estación más fría presentaba mejores características que el producido durante 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 espermiática a una temperatura de más 5°C hasta por 144 horas.

Cuando se ha utilizado un diluyente a base de yema de huevo, glicerina y azúcares, 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. (Aamdal y Andersen, 1968; Visser, 1974; Miller, 1980).

se ha visto que cuando el semen es almacenado en pajillas, la fertilidad de éste mejora un poco más que cuando se conserva en pellets. (Aamdal y Andersen, 1968; Graham et al, 1977).

La fertilidad del semen puede verse afectada por varias causas, entre las que tenemos: La concentración de espermatozoides - por dosis, Aamdal y Andersen (1968) encontraron una mayor fertilidad en semen diluido 1:4, que en aquel diluido 1:6.

El período de adaptación que consiste en bajar lentamente la temperatura del semen diluido de un rango de 30-37°C a uno de 5-10°C, parece ser mejor, mientras más corto sea, sin que sea menor de dos horas, (Visser, 1974a) afectando principalmente el porcentaje de motilidad espermática.

La morfología no parece afectarse por el período de adaptación o congelación excepto en aquellos espermatozoides con alteraciones del acrosoma. (Visser, 1974c).

También puede afectar, el volumen del semen aplicado a la oveja, el sitio de inseminación y las técnicas de descongelado. - (RoyChoudhury y Bhambhani, 1974).

El número de inseminaciones que se dan a cada oveja está directamente relacionado con el porcentaje de preñez. Frazer(1968) incrementó respectivamente el porcentaje de preñez, ésto lo logró inseminando una, dos o tres veces a cada oveja en el mismo estro.

OBJETIVOS

1.- Determinar el grado de anormalidades morfológicas de los espermatozoides, antes y después de la congelación con diluyente - para pellets.

2.- Determinar el grado de motilidad espermática después de 8 días de congelación a -196°C .

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se realizó en el "CENTRO DE FOMENTO OVINO" de la Secretaría de Recursos Hidráulicos ubicado en Chapa de Mota Estado de México, que tiene los siguientes datos:

19° 46' Latitud

99° 29' Longitud.

2400 Metros de altura sobre el nivel del mar.

Cuarenta y nueve muestras de semen ovino de buena calidad, - (Considerando la concentración espermática de más de 2000×10^6 espermatozoides/ml. y más de 60% de motilidad progresiva) procedentes de varios carneros entre dos y cuatro años de edad pertenecientes a cinco diferentes razas, se obtuvieron mediante el método de la vagina artificial, durante los meses de mayo a julio.

Se utilizaron vaginas artificiales de 15cm. de largo y 5cm. de diámetro con fundas y conos desechables de polietileno, la temperatura del agua se mantuvo entre 42 y 44°C. La presión se suministró por un llenado completo de la vagina con agua.

Las muestras del semen se obtuvieron en tubos de vidrio para centrífuga, graduados de 1 a 10 ml., que se conservaron a 37°C y protegidos de la luz directa. En éstos tubos se midió el volumen directamente.

Cada muestra se conservó en baño maría entre 30-35°C mientras se realizaba su evaluación antes de efectuar la dilución.

La concentración espermática por ml. se realizó mediante el método del espectrofotómetro previamente calibrado con una longitud de onda de 600 nanómetros.

La motilidad se calculó en el momento de la obtención de la muestra y en el momento de descongelar cada pellet. Esta motilidad progresiva se evaluó en porcentaje observando tres campos del microscópio, de acuerdo con Zemjanis (1973). Para calcular la motilidad de la muestra descongelado se sacó el promedio de la motilidad para tres pellets en cada caso.

Cada muestra de semen con motilidad superior a 40% fue diluida en proporción 1:5 con diluyente para semen a base de lactosa-yema de huevo-glicerina. (Anexo 1).

Para identificar las anomalías primarias y secundarias se realizaron frotis de semen teñidos por el método de eosina-nigrosina (Sahni y Roy, 1972). (Anexo 2).

Los frotis se hicieron con semen al momento de la dilución y después de descongelar cada muestra. De cada muestra se contaron 200 espermatozoides (Sorensen, 1978), se expresó el resultado en porcentaje, considerando cada una de las anomalías descritas por Zemjanis (1973).

Cada muestra, una vez diluida a 31-35°C, se sometió a un período de adaptación conservándose en refrigeración entre más 5 y más 10°C durante dos horas. Después de este proceso se congelaron pellets de 0.1 ml. sobre una placa perforada de Dióxido de Carbono sólido (hielo seco) a una temperatura aproximada de -79°C, durante 5 minutos.

Una vez congelados los pellets, se almacenaron en nitrógeno líquido a -196°C durante 8 días, cada grupo de pellets correspondiente a cada muestra, fue identificado con el número progresivo y colocado en recipientes plásticos, de los utilizados para almacenar las pajillas de semen congelado de toros.

De cada muestra se descongelaron tres pellets utilizando 0.9 ml. de citrato de sodio al 2.9% a 37°C. La evaluación de motilidad y el frotis para identificar anomalías se realizaron inmediatamente después de haber descongelado.

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente mediante la prueba de hipótesis utilizando los valores de "Z" para diferencia entre dos proporciones a grados de significación ($P < 0.01$ y $P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSION

El volumen promedio de las 49 muestras fue de 0.53ml., lo que coincide con otros trabajos, Sahni y Roy (1972), considerando que las muestras se tomaron al final de la primavera y principios del verano cuando la cantidad de semen es menor en lo referente a su producción .

La concentración promedio obtenida fue de 398×10^6 espermatozoides por mililitro, lo cual coincide con las concentraciones -- promedio señaladas como normales para esta especie. (Mc. Donald, 1975; Sorensen, 1978; Durán del Campo, 1980).

Al realizar la dilución de 1:5 y asignar un volumen a cada pellet de 0.1 ml., la cantidad promedio de espermatozoides contenidos en cada pellet fue mayor al obtener la muestra.

La motilidad progresiva fue mayor al obtener la muestra que después de la congelación, 73.8% contra 19.4% respectivamente y estos valores fueron estadísticamente significativos ($P < 0.01$). (Tabla 1). Este resultado coincide con lo encontrado por Visser (1974b), aunque éste autor encuentra valores promedio de 43% de motilidad después de la congelación. RoyChoudhury y Bhambhani (1977) quienes también encontraron diferencias significativas antes y después de descongelar, pero el promedio de motilidad de semen en pellets después de descongelar fue de 46%. Estas variaciones en la motilidad progresiva postcongelación en relación con --

otros trabajos , podrían ser atribuidas a la dificultad de mantener una temperatura adecuadamente constante durante el período de adaptación, ya que fue necesario abrir y cerrar el refrigerador - cada vez que se introducía una muestra.

Las anomalías primarias fueron ligeramente mayores antes de la congelación 2% contra 1% después, sin embargo este valor no fue estadísticamente significativo. Ningún autor reporta diferencias significativas en estos valores, lo que sugiere que estas -- anomalías son de tipo genético y de frecuencia constante en cada individuo. (Tabla 1).

Las anomalías secundarias que en general son atribuidas a causas ambientales, (infecciones, efectos de la temperatura y - fotoperíodo o bien el manejo de la muestra) mostraron una ligera tendencia a ser más frecuentes después de la congelación que antes que ella, 29.3% contra 26.1% respectivamente. Estos valores coinciden con los obtenidos por Sahni y Roy (1972) para el mes de mayo quienes reportan del 15 al 27% de formas espermáticas anormales. (Tabla 1).

Por otro lado, Visser (1974a) solo encontró variación antes y después de la congelación en las anomalías del acrosoma, pero éstas no fueron estudiadas en el presente trabajo.

LOS RESULTADOS SE OBTUVIERON DE ACUERDO A LA FORMULA
SIGUIENTE:

$$Z = \frac{(P_1^* - P_2^*) - (P_1 - P_2)}{\sqrt{p^* \cdot q^* \cdot (1/n_1 + 1/n_2)}} \dots \dots \dots 1$$

$$p^* = \frac{X_1 + X_2}{n_1 + n_2} \dots \dots \dots 2$$

$$q^* = 1 - p^* \dots \dots \dots 3$$

Donde:

Z= Valor calculado para leer en las tablas.

P_1^* , P_2^* = Valores muestrales.

P_1 , P_2 = Valores poblacionales.

X_1 , X_2 = Número de éxitos observados en cada muestra respectiva.

n_1 , n_2 = Tamaños muestrales.

TABLA 1

Características del semen de carnero antes y después de la -
congelación en pellets durante 8 días.

Características	(n)	Antes de la congelación	Después de la congelación
Motilidad %	49	73.8 (a)	19.4 (b)
Anormalidades primarias	49	2.0 (a)	1.0 (a)
Anormalidades secundarias	49	26.1 (a)	29.3 (a)

Nota: Letras diferentes en los renglones representan diferencias
significativas ($P < 0.01$).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.- El principal factor que limita el uso del semen congelado en la especie ovina es su baja fertilidad.

2.- Se encontró una baja vitalidad espermática que se traduce generalmente en una menor motilidad después de la congelación.

3.- Esta baja motilidad no parece estar asociada a un incremento en las formas anormales de espermatozoides, por lo que se puede sospechar de alteraciones en el metabolismo espermático o muerte espermática ya que no existieron diferencias significativas estadísticamente con respecto a estas anomalías.

4.- Una forma de anomalía que pudiera estar relacionada con el metabolismo del espermatozoide es la modificación del acrosoma, por lo que se sugiere realizar trabajos, identificando estas alteraciones antes y después de la congelación.

5.- Se sugiere realizar en nuestro medio más trabajos relacionados con la conservación del semen congelado de los ovinos.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Durán del Campo ; (1980); Anatomía y Fisiología de la Reproducción e Inseminación de los ovinos. Editorial Hemisferio Sur Uruguay.
- 2.- Graham E.F., Crabo B.C., Pace M.M.:(1975); Current of semen preservation in the ram, boar and stallion. Journal Animal Science; 37:80-18.
- 3.- Mc. Donald L.E.: (1978); Reproducción y Endocrinología Veterinarias. Segunda Edición. Editorial Interamericana, México; 288-289.
- 4.- Miller S.J. : (1980); Artificial Breeding Techniques in sheep. Current Therapy in Theriogenology; diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. 947-950. W.B. - Saunders Company: Philadelphia London and Toronto.

- 5.- Ponzoni R.: (1973); Aspectos Modernos de la Producción ovina. Segunda contribución: 104-120. Universidad de la República, Uruguay.
- 6.- Rao B.R. and Pandey J.N.:(1977); Preservation of semen of Corriedale and Mali rams in different diluents. Indian Journal Animal Sciences. 47(4); 193-196.
- 7.- RoyChoudhury P.N. and Bhambhani:(1977); Pellet freezing of Ram Spermatozoa. Zbl. Vet. Med. A.- 24: 696-700.
- 8.- Sahni K.I. and Roy A. : (1972); A note on seasonal variation in the occurrence of abnormal spermatozoa in different breeds of semen and goat under tropical conditions. Indian Journal Animal Sciences 42(7):; 501-504.
- 9.- Sorensen A.M. Jr.: (1979); Animal Reproduction; principles and practices. Ed. Mc. Graw Hill Publications in the Agricultural Sciences. U.S.A.

- 10.- Visser D.: (1974a); The effect of pellet volume, dilution rates prefreezing and at thawing, and of thawing temperature on the survival and acrosome-morfology of frazen ram spermatozoa. S. Afr. Journal Animal Science. 4: 147-155.
- 11.- Visser D.: (1974); The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. S.Afr. Journal Animal Sci. 4: 157-155.
- 12.- Visser D.: (1974c); Recent advences in the deep-freeze preservation of ram semen. S.-Afr. Journal Animal Sci.4: 275-288
- 14.- Zemjanis R.: (1973); Reproducción Animal, diagnóstico y técnicas terapéuticas. 197-206. Ed. LIMUSA, México.

ANEXO 1

PREPARACION DEL SEMEN DE CARNERO EN PELLETS

1.- Obtención del semen.

Prepare el carnero y tome la muestra de semen bajo condiciones higiénicas.

2.- Evaluación del semen.

a) Examen macroscópico: (Volumen, Color y Concentración).

b) Examen microscópico: (Motilidad y Anormalidades).

3.- Diluyente.

Dilución de lactosa al 11%	75.3%	75.3	37.65	18.823
Yema de huevo	20 %	20.0	10.00	5.000
Glicerina	4.7%	4.7	2.5	1.175
Total	100 %	100 ml	50.1 ml	24.99 ml
Penicilina -----	1000 UI/ml.			
Estreptomicina -----	i mg/ml.			

4.- Adaptación.

Coloque el semen diluido de 2 a 5 horas en un refrigerador o cuarto cuarto frío a 5°C para permitir la adaptación.

5.- Congelamiento.

Para congelar coloque con una pipeta de 0.1 ml. de semen diluido en pequeños orificios hechos en hielo seco (CO_2 sólido a -79°C).

Después de 5 minutos retire los pellets del hielo seco y colóquelos en nitrógeno líquido.

6.- Descongelamiento.

Tome un pellet y colóquelo en 0.9 ml. de medio descongelante.

a) Leche esteril.

b) Citrato de sodio (NaOH_3) al 2.9%.

ANEXO 2

TECNICA DE TINCION DE EOSINA-NIGROSINA PARA CONSERVACION
DE LA MORFOLOGIA EN LOS ESPERMATOZOIDES DE CARNERO.

La tinción es una mezcla isotónica que contiene:

10% de nigrosina.

4% de eosina.

Se coloca una gota de eosina sobre un portaobjetos cóncavo, -
mientras tanto el colorante como el material de cristalería se man-
tiene a 37°C.

El semen se diluye en proporción 1:100 en citrato de sodio al
2.9% mantenido en baño maría a 37°C.

Se agregan dos gotas de semen con una pipeta de Pasteur.

Posteriormente se agregan dos gotas de nigrosina a 37°C, se
mezcla suavemente y se espera cinco minutos para realizar un fro-
tis.