

11663
2e)
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLAN

EVALUACION DE DIFERENTES TECNICAS PARA LA CONGELACION
DE SEMEN OVINO

T E S I S

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

area REPRODUCCION ANIMAL.

A u t o r

GERMAN ALVARO LOPEZ PEREZ

A s e s o r e s

MUZ MSc PhD Everardo Gonzalez Padilla

MUZ MSc Carlos Sosa Ferreira

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1987

TESIS CON
FALLA FE CRONOL



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Con el objeto de determinar una metodología que permitiera mejorar la técnica de congelación del semen ovino, se estudió el efecto que sobre la sobrevivencia espermática ejercen algunas variables del proceso de congelación: el porcentaje de glicerol en el diluyente (3, 6 y 9%); la temperatura a la que se agrega la fracción glicerolada del diluyente (5 y 35C); el tiempo de equilibrio (0, 2 y 4 horas) y la temperatura de descongelación (5C/3min., 35C/30seg. y 75C/8seg.). Asimismo se estudiaron las interacciones entre las referidas variables. La evaluación se hizo en base a la estimación de la motilidad progresiva (MPD) y del porcentaje de acrosomas intactos (PAI) del semen descongelado.

Los mejores resultados (P<.05) de MPD y PAI se obtuvieron con 3% de glicerol (28.3 y 35.2% respectivamente) y estos valores decayeron a medida que se incrementó el porcentaje de glicerol (26.3 y 33.5 para 6% / 17.6 y 19.9 para 9% para MPD y PAI respectivamente).

La temperatura a la que se agregó la fracción glicerolada del diluyente, influyó significativamente (P<.05) sobre la MPD pero no sobre el PAI (P>.05).

El tiempo de equilibrio tuvo un efecto significativo (P<.05) sobre las dos variables de respuesta estudiadas. Los mejores resultados se obtuvieron con 4 horas de equilibrio (26.1 y 33% MPD y PAI respectivamente). decayeron con 2 horas (25.1 y 30.9%) y con 0 horas cayeron aún más (19.6 y 23.8%).

La temperatura de descongelación también tuvo un efecto estadísticamente significativo (P<.05) sobre la MPD y el PAI. Con 75C/8 seg. se obtuvieron 31.4 y 39.3% de MPD y PAI respectivamente. Para 35C/30 seg: 24.1 y 32.7% y para 5C/3 min.: 19.6 y 23.8% de MPD y PAI.

Para la MPI se encontraron significativas ($P < .05$) las interacciones entre el porcentaje de glicerol y la temperatura a la que se agregó el mismo; la temperatura de agregado del glicerol y la temperatura de descongelación; y el porcentaje de glicerol y la temperatura de descongelación. Para el PAI las interacciones significativas ($P < .05$) fueron entre el porcentaje de glicerol y el tiempo de equilibrio; el porcentaje de glicerol y la temperatura de descongelación; la temperatura de agregado del glicerol y el tiempo de equilibrio; y el tiempo de equilibrio y la temperatura de descongelación.

En un segundo experimento se inseminaron 105 ovejas Rambouillet que fueron asignadas al azar a uno de los siguientes tratamientos: inseminación artificial con semen fresco sin diluir ($n = 52$), e inseminación artificial con semen congelado ($n = 53$) bajo las condiciones que resultaron superiores en el primer experimento. De las ovejas inseminadas con semen fresco, parieron 54% y de las inseminadas con semen congelado 32%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($P < .05$).

INDICE

	Página
I) INTRODUCCION	1
II) OBJETIVOS	3
III) REVISION DE LITERATURA	4
3.1. Colección de semen	4
3.1.1. Obtención de semen de la vagina de una hembra recién copulada	4
3.1.2. Vagina artificial	4
3.1.3. Electroeyaculación	6
3.1.4. Diferencias entre el semen obtenido por vagina artifi- cial y electroeyaculación .	7
3.2. Evaluación de semen	9
3.2.1. Volumen	9
3.2.2. Concentración	10
3.2.3. Habilidad	12
3.2.3.1. Técnicas de evalua- ción de movilidad .	13
3.2.4. Morfología	15
3.2.5. Porcentaje de acrosomas intactos	16
3.2.6. Porcentaje de espermatozoi- des vivos	18
3.2.7. Otras técnicas	18

3.3. Diluyentes	21
3.3.1. Fuentes de energía	21
3.3.2. Protectores contra el choque frío	22
3.3.3. Amortiguadores	24
3.3.4. Antibióticos	26
3.3.5. Agentes crioprotectores ..	27
3.3.5.1. Temperatura de agre- gado de glicerol ..	29
3.3.6. Otras sustancias utilizadas en los diluyentes para semen ovino	31
3.3.6.1. Prostaglandinas .	31
3.3.6.2. Cafeína	32
3.3.7. Diluyentes hipertónicos .	32
3.4. Velocidad de refrigeración	33
3.5. Tiempo de equilibrio	33
3.6. Forma de envasado	34
3.7. Temperatura de descongelación	35
3.8. Tiempo de almacenamiento del semen congelado	37
3.9. Cantidad de espermatozoides por do- sis y dilución	37

3.10. Inseminación artificial	38
3.10.1. Forma de conservación del semen	38
3.10.2. Técnica de inseminación ar- tificial	41
IV) MATERIALES Y METODOS	45
4.1. Experimentos previos	45
4.1.1. Efecto de dilución	45
4.1.2. Efecto del observador	46
4.2. Primer experimento	46
4.3. Segundo experimento	51
V) RESULTADOS	54
VI) DISCUSION	59
VII) CONCLUSIONES	65
VIII) BIBLIOGRAFIA	67
IX) CUADROS Y GRAFICAS	84

I) INTRODUCCION

La inseminación artificial (IA) es una técnica que se utiliza con éxito en varias especies, pero ha logrado su máximo desarrollo en bovinos. Las ventajas de esta técnica en la industria bovina podrían ser extrapolables a la ovinocultura siempre y cuando se contara con sementales de alto mérito genético, semen congelado de buena calidad y una técnica sencilla, rápida y efectiva de inseminación (Langford et al, 1979).

A pesar de que hace muchos años que se practica la IA en ganado ovino en diversos países (Durán del Campo, 1980), la difusión de programas de IA se ha visto restringida por los bajos porcentajes de fertilidad que se obtienen con semen congelado, lo que limita la IA en esta especie casi exclusivamente al uso de semen líquido (Hackett et al. 1979). El semen así conservado solo puede almacenarse durante 24 horas como máximo sin pérdida considerable del poder fecundante (Colas y Courot, 1977). Este hecho limita el uso de material genético superior.

La IA con semen congelado tiene la enorme ventaja de que el productor podría beneficiarse con el uso de semen de carneros de alta calidad genética, sin que ello significara la coveza, el cuidado, la alimentación y el riesgo de mantener al semental en su establecimiento (Pérez y López, 1984).

Desde 1950, en que Emmens y Blackshaw (citadas por Sahai y Roy, 1972) publicaron los primeros resultados de la congelación de semen ovino, se han realizado numerosas investigaciones en diversas partes del mundo. Algunos autores (Colas, 1975) publican resultados de fertilidad similares con semen fresco y congelado, pero la mayoría de los investigadores que trabajan en esta

área obtienen resultados inferiores con semen congelado que con semen líquido (Visser, 1974b).

Las causas de estos pobres resultados se pueden resumir en tres puntos: 1) falta de una técnica de congelación y descongelación, y de diluyentes adecuados para el semen ovino (Visser, 1974b); 2) la dificultad que presenta el cérvix de la oveja al transporte espermático (Lightfoot y Salamon, 1970; Fukui y Roberts, 1977a,b), y 3) a la dificultad de efectuar la IA intrauterina (Fukui y Roberts, 1978).

En el presente trabajo se estudian algunas variables de la técnica de congelación que más influyen sobre la recuperación espermática y por consiguiente sobre la fertilidad obtenida con semen ovino congelado, con el objeto de encontrar una metodología que permita mejorar la técnica de congelación de semen ovino.

II) OBJETIVOS

I) Estudiar el efecto que sobre la motilidad progresiva y el porcentaje de acrosomas intactos del semen ovino descongelado ejercen las siguientes variables del diluyente y de la técnica de congelación:

a) porcentaje de glicerol en el diluyente (3, 6 y 9%)

b) temperatura a la que se agrega al semen la fracción glicerolada del diluyente (5 y 35C)

c) tiempo de equilibrio (0, 2 y 4 horas)

d) temperatura de descongelación (5C/3min., 35C/30seg. y 75C/8seg.)

II) Comparar los resultados obtenidos con inseminación artificial utilizando la metodología para semen ovino fresco y para semen congelado, utilizando en este último caso la técnica de congelación-descongelación que resulte superior en el experimento in vitro.

III) REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. COLECCIÓN

Para la obtención del semen que se va a utilizar en programas de IA, o para evaluar a un semental, se pueden emplear varios métodos:

3.1.1. Obtención del semen de la vagina de una hembra recién copulada. El semen obtenido por este método se contamina con moco y restos celulares que se encuentran en la vagina de la hembra, por lo que ha caído prácticamente en desuso desde que se desarrollaron otros métodos más adecuados.

3.1.2. Vagino artificial (VA). Es el método de elección para la colección de semen, tanto en ovinos como en muchas otras especies (Ott y Hemon, 1980). La VA proporciona al semental un medio similar a la vagina de la hembra, por lo que se estimula y eyacula. Además este método brinda condiciones más higiénicas para la obtención de semen.

Se han descrito gran cantidad de modelos de VA, pero lo importante es que cumplen con los requisitos de temperatura y presión. En general las VA constan de un tubo rígido de 12 a 20 cm de largo y 4 a 8 cm de diámetro, provisto de una válvula que permite colocar agua y dar presión a la VA. Por dentro de este tubo se coloca una camisa de latex o de plástico y en el espacio que queda entre ambos se agrega agua caliente, que dependiendo de la temperatura ambiente debe estar aproximadamente 10C por encima de la temperatura deseada en el interior. En uno de los extremos se coloca una copa de vidrio graduado o un cono de latex con un tubo graduado en décimas de ml. Este tubo de recolección debe tener un protector que permita

mantenerlo a 35-37°C para evitar el choque frío del semen y protegerlo de la luz solar. Debe considerarse que el recorrido del semen desde el lugar de la eyaculación hasta el tubo de recolección sea lo más corto posible para evitar pérdidas de semen en las paredes del cono.

El fundamento de la técnica de la VA se basa en la aplicación de los estímulos fisiológicos de la eyaculación: temperatura y presión. La temperatura adecuada de la VA para carnero es de 40 a 42°C (Barrán del Campo, 1980; Ott y Memon, 1980). Esta temperatura se logra utilizando agua caliente en el armado de la VA. Debe considerarse que existe variación de la temperatura óptima de la VA entre sementales, y de acuerdo a la temperatura ambiente del lugar en que se realice la colección. Cuando la temperatura en el interior de la VA es muy caliente, se puede lesionar el pene del semental y provocar además una inhibición temporal o permanente del deseo sexual del carnero (Barrán del Campo, 1980).

La presión está dada por el agua y por el aire que se insufla por la válvula de la VA. La presión óptima de acuerdo a Ott y Memon (1980) es de 40 a 60 mm de mercurio. La VA debe tener suficiente presión como para estimular al semental, pero no es conveniente que sea excesiva porque el semental puede eyacular en la parte anterior de la VA y el semen no llega entonces al tubo colector perdiéndose el eyaculado. Puede suceder también, que debido a una fuerte presión, el semen queda detenido en la uretra y que salga al exterior después de retirada la VA (Barrán del Campo, 1980).

Para estimular a los sementales en el momento de la colección, es necesario tener una oveja o un maniquí. El lugar de colección debe ser sombreado y tranquilo, los ruidos y movimientos bruscos del personal distraen a los carneros. El macho debe poder

moverse libremente alrededor de la hembra, ya que como parte del estímulo previo a la monta, algunos animales oifitean a la oveja por los dos lados y por detrás.

3.1.3. Electroeyacuación (EE). El fundamento de este método consiste en el estímulo eléctrico de los centros lumbares de la erección y la eyacuación. Las ventajas del mismo, consisten en que no es necesario entrenar a los sementales y que casi la totalidad de los carneros responden favorablemente al estímulo. En más de 300 electroeyacuaciones realizadas en el Programa Ovíno de la Dirección de Normatividad Pecuaria (SARH) solo un semental no respondió satisfactoriamente (López y Pérez, datos no publicados). Este método es el de elección para la evaluación de los sementales en el campo y para confirmar el resultado de las vasectomías antes de utilizar a los machos mercederos (Salomon, 1976). Debido a la cercanía de otras estructuras nerviosas, el estímulo puede provocar efectos indeseados. Durante la EE, los carneros contraen fuertemente sus miembros posteriores por ser estimulados los nervios obturador y ciático.

Se han realizado experimentos con el objeto de estudiar el voltaje y la energía, así como el número y duración de los estímulos que permitan la obtención de semen sin riesgos para el semental. El voltaje de los distintos electroeyacuadores fluctúa entre 10 y 15 voltios (Salomon, 1976). Existen distintos tipos de electroeyacuadores, algunos permiten regular el voltaje mientras que otros trabajan con voltajes fijos. En los primeros se ha encontrado que lo más adecuado es utilizar estímulos crecientes. Comerón (1977) publicó que los mejores resultados los obtuvo cuando aumentaba un voltio por cada estímulo, y estos eran aplicados con intervalos de 7 a 10 segundos. En algunos animales el semen se obtiene luego del primer estímulo del electroeyacuador, pero la mayoría responden

después del segundo o tercero, y son pocos los carneros que no eyaculan después de 7 u 8 estímulos.

La fuente de energía para los electroyaculadores puede ser la línea de corriente eléctrica. Teniendo en cuenta, que no siempre se cuenta con electricidad en las zonas rurales o en los corrales, se han desarrollado electroyaculadores con baterías recargables, o que pueden funcionar con una batería de automóvil o con dinamo de bicicleta (Gurda del Campo, 1980).

El método de la EE presenta algunos riesgos para el semental que aunque generalmente son de poca importancia deben conocerse y evitarse. Los riesgos más frecuentes son la irritación y pequeños hemorragios del pene, lesiones más o menos graves de la mucosa del recto y excepcionalmente la muerte del semental (Gurda del Campo, 1980).

Los desventajas del uso de la EE en los programas de IA se derivan de la frecuencia con que puede ser utilizado, el costo del equipo, la necesidad de personal entrenado para su manejo y los riesgos que puede implicar su utilización imprudente. Su principal ventaja es la posibilidad de coleccionar semen sin que el macho responda sexualmente, por tal motivo, se puede utilizar en aquellos sementales que tienen una imposibilidad física de realizar la monta (Sorensen, 1979).

3.1.4. Diferencias entre el semen obtenido con VA y con EE. Aunque se ha publicado que la calidad del semen de toros obtenido por EE es similar al obtenido por VA y que su procesamiento, almacenamiento y posterior uso son comparables (Austin, Hupp y Murphree, 1961), se han observado diferencias en el semen colectado por ambos métodos. Las diferencias más notables en carneros son el aumento del volúmen y la disminución de la concentración espermática en los

muestras obtenidas por EE. Sin embargo, Hernández, Rodríguez y González (1976) no encontraron diferencias en el volumen así como en el porcentaje de espermatozoides anormales cuando compararon el método de la VA y la EE, pero observaron una mayor concentración espermática en los eyaculados obtenidos con VA. El semen con mejor motilidad y mayor cantidad total de espermatozoides se obtuvo colectando semen con VA y utilizando un manguito.

También se han observado otras diferencias. Durán del Campo (1980) publica que el semen obtenido con EE tiene un pH más elevado y una concentración de fructosa mayor que el obtenido con VA. Harley, Morris y White (1977), por su parte, encontraron que las concentraciones de glicerofosforilcolina (GFC) son menores en el semen colectado por EE que con VA. Como la GFC se puede considerar una buena medida de la secreción epididimal, los autores concluyeron que el estímulo de la EE sobre el vaxido de epididimo es mayor que el provocado por la VA. En ese mismo trabajo las concentraciones de prostaglandinas y de fructosa fueron similares en el semen obtenido con EE y por VA, por lo que se sugirió que el estímulo sobre las glándulas vesiculares es similar.

3.2. EVALUACIÓN

La evaluación de semen permite que solo se procesen y almacenen aquellos eyaculados con alta probabilidad de fecundar (Elliot, 1978). Para que esto sea posible, es necesario estudiar los parámetros espermáticos que tienen alta correlación con la fertilidad y establecer técnicas para la evaluación de los mismos.

La evaluación, permite además calcular cuántas dosis se pueden obtener con cada eyaculado, de acuerdo al total de espermatozoides móviles presentes en el mismo, así como cuantificar los resultados durante la investigación de la metodología de procesamiento del semen.

Los parámetros más frecuentemente utilizados para la evaluación del semen son:

- VOLUMEN
- CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA
- MOTILIDAD
- MORFOLOGÍA
- PORCENTAJE DE ACROSPERMAS INACTIVOS
- PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS
- OTROS

3.2.1. Volumen. Este se mide directamente del tubo de colección que debe estar graduado en décimas de ml. Es una medición sencilla, rápida, solo requiere el tubo de colección para realizarla y es objetiva. Además tiene una alta correlación positiva con número de dosis. Vázquez (1985) encontró una correlación de .68 entre el volumen del eyaculado y el número de dosis procesables, en carneros Berino Australiano.

El promedio del volumen normal del eyaculado de carnero oscila entre 0.8 y 1.0 ml (Burón del Campo, 1980). López et al (1986), publicaron una media de 1.2 para 534 eyaculados de carneros Merino Australiano. El volumen puede variar de acuerdo a distintos factores como: la raza (Galal et al, 1978; Trajo, González y Márquez, 1984; Cochran et al, 1987); edad (García et al, 1983); nivel nutricional (Parker et al, 1972), volumen testicular, método y frecuencia de colección y excitación previa (Burón del Campo, 1980). También se han observado variaciones estacionales del volumen (Dupps et al, 1960; Galal et al, 1978; López et al, 1984). Sin embargo, algunos trabajos realizados en México no encontraron efecto de la época de colección sobre este parámetro (Valencia, Serrón y Fernández-Baco, 1977; Trajo, 1984; Contró, 1986), es posible que esta discrepancia se deba a las interacciones que existen entre los factores mencionados. Este parámetro varía además, entre individuos de una misma raza, edad y sometidos a el mismo manejo (Márquez, 1985; Contró, 1986).

Uno de los factores que influye fuertemente en el volumen del eyaculado es el volumen testicular. Ortavant (citado por Burón del Campo, 1980), estimó que un gramo de tejido testicular de carnero es capaz de producir aproximadamente 12 millones de espermatozoides por día. Además de esto relación- Burón del Campo (1980), observó que existe una relación directa entre el volumen testicular y el volumen del eyaculado. Por este motivo, el volumen testicular, que se puede estimar fácilmente midiendo la circunferencia escrotal, es de gran utilidad para la evaluación y selección de sementales.

3.2.2. Concentración espermática. La concentración espermática expresada como número de espermatozoides/ml, es el factor que más influye sobre el número total de espermatozoides móviles en el

eyaculado y la correlación con el número de dosis es alto (.75) (Vázquez, 1985).

La estimación de la concentración puede realizarse directamente con un hemocitómetro. Con este método se cuenta el total de espermatozoides presentes en un volumen y una dilución conocidas (Sorensen, 1979). Es conveniente utilizar diluciones entre 1/400 y 1/200 debido a la gran concentración que presenta el semen ovino (López y Valencia, 1982). Este método es muy preciso, pero deben realizarse cuidadosamente las diluciones y homogeneizar muy bien las muestras antes de cargar la cámara para evitar errores. Esta técnica solo requiere de tubos, pipetas, hemocitómetro y microscopio.

Para facilitar la evaluación sobre todo cuando se procesan numerosos eyaculados por día, se han desarrollado métodos indirectos para medir la concentración espermática. Un método es el basado en la observación de la densidad óptica del semen con un espectrofotómetro calibrado previamente. Este método es preciso y rápido, pero requiere de un equipo más sofisticado que el anterior. Para usar el espectrofotómetro, primero se debe establecer una regresión entre la transmitancia o la absorbancia registrada en el espectrofotómetro y la concentración espermática medida directamente con el hemocitómetro utilizando registros paralelos de cada muestra (Barton, Foote y Shipman, 1956). Una vez establecida la ecuación de la concentración en función de la transmitancia, es posible calcular fácilmente cualquier concentración. Para poder utilizar este método debe obtenerse una alta correlación entre ambos métodos de evaluación.

La concentración espermática también puede estimarse con mucha precisión utilizando un contador de partículas, pero este método es muy costoso y no

ofrece mayores ventajas que los métodos anteriores (Bearden y Fungoy, 1980).

Sorensen (1979), indica que la media de la concentración espermática del semen ovino oscila entre 2000 y 4000 millones de espermatozoides/ml; sin embargo, otros autores obtuvieron valores más elevados. López y Valencia (1982), trabajando con corneros de la raza Pelibuey obtuvieron una concentración espermática promedio de 5570 +/- 1620 millones de espermatozoides/ml. Mientras que López et al (1984), utilizando sementales adultos de la raza Marino Australiano, publicaron una media de 4598 +/- 1615 millones de espermatozoides/ml. Sin embargo, otros investigadores han encontrado concentraciones más bajas (Cunps et al, 1980; Tomkins et al, 1976; Trejo, 1984). Estas diferencias podrían deberse, al menos en parte, al número, condición y raza de los sementales utilizados así como al manejo general al cual estén sometidos.

Esta variable es afectada por los mismos factores que influyen el volumen del eyaculado (Parker et al, 1972; Tomkins et al, 1976; Valencia, Borrón y Fernández-Saca, 1979; Trejo, Vázquez y González, 1984; Vázquez, 1985; Contró, 1984).

3.2.3. Motilidad. La evaluación de la motilidad espermática es la técnica más frecuentemente utilizada para estimar la "calidad" del semen. Sin embargo la correlación entre la motilidad del semen fresco y la fertilidad no es muy alta (Elliot, 1978). Sin embargo, la motilidad del semen descongelado, (sobre todo cuando se emplean técnicas subjetivas de evaluación), sí tiene una correlación alta con la fertilidad. La correlación publicada por Vázquez (1985) entre motilidad y número de dosis es baja (0.23) comparada con la que obtuvo con volumen y concentración espermática.

El movimiento normal del espermatozoide es recto y progresivo, al mismo tiempo que rota sobre su eje longitudinal (Elliot, 1978). La rotación es producida por un movimiento tridimensional (helicoidal) de la cola (Rikmenspoel, citado por Sullivan, 1978). Cuando el movimiento de la cola es bidimensional (pendular) no es normal. Los movimientos en círculo y hacia atrás también son anormales y generalmente indican que el semen sufrió un choque frío o químico (Ott y Memon, 1980). Todos estos movimientos normales y anormales, se suman para constituir la 'motilidad de masa' del semen, por lo que este técnico no siempre está indicando la fertilidad potencial del semen.

3.2.3.1. Técnicas de evaluación de la motilidad. La técnica más rápida para evaluar la motilidad del semen ovino, consiste en observar directamente el oleaje producido por los espermatozoides en el tubo colector (Durán del Campo, 1980). Esta técnica macroscópica, si bien no es muy precisa, permite hacer una estimación primaria al momento de la colección y no requiere ningún equipo. En especies con semen más diluido no es posible apreciar este movimiento. La olas que se observan en el semen están determinadas por los movimientos de los espermatozoides y por la concentración espermática, por lo que también puede utilizarse como un indicador de la concentración del eyaculado.

Otras técnicas de evaluación de la motilidad requieren de microscopio. La más sencilla de todas es la observación microscópica del movimiento en masa de los espermatozoides. Consiste en colocar una gota de semen sin diluir en un portobjeto y observarla al microscopio con bajo aumento y sin cubreobjetos. Se cuantifica el oleaje dando un puntaje de 0 a 5 (Durán del Campo, 1980), aunque algunos investigadores prefieren utilizar una escala de 0 a 10. Esta técnica si bien es muy sencilla, no aporta más información que la anterior. También se ha utilizado el método de

la gota aplastada, para ello se procede de forma similar a la técnica anterior, pero se coloca un cubreobjeto (Salaman, 1976)

Las variaciones de temperatura afectan la motilidad de los espermatozoides, por lo que es conveniente utilizar una platina termoregulable a 35-37°C, así como laminillas a la misma temperatura para evitar alteraciones en la lectura de la motilidad. Cuando se requiera diluir el semen para estimar la motilidad, el diluyente también debe estar a la misma temperatura que el semen, para evitar que el choque térmico afecte la evaluación. También es importante que las laminillas y los cubreobjetos utilizados estén limpios y completamente secos (Elliot, 1978).

La motilidad progresiva se observa colocando una gota de semen diluido entre porta y cubreobjeto. La función de la dilución es permitir la observación de los espermatozoides en forma individual. Para realizar esta técnica es conveniente utilizar microscopio de contraste de fase y un aumento de 320 a 700 x (Elliot, 1978), aunque este tipo de microscopio no es imprescindible. La técnica consiste en estimar el porcentaje de espermatozoides que se mueven progresivamente en la muestra; para ello se observan distintos campos de la preparación. Si bien este método no es objetivo, tiene un alto índice de constancia dentro y entre observadores entrenados (Elliot, 1978; López y Pérez 1984, datos no publicados).

Un método más objetivo pero menos práctico de evaluar la motilidad progresiva del semen es el hemocitómetro. Este consiste en llenar una cámara de Spencer con semen diluido 1/100 en solución salina fisiológica y otra con semen diluido en la misma proporción pero en alcohol para inmovilizar a todos los espermatozoides. En los dos cámaras se cuentan los espermatozoides inmóviles y por diferencia se estima

el porcentaje de células espermáticas móviles (Elliot, 1978).

Otra alternativa para evaluar la motilidad progresiva de una muestra es el método fotográfico (Elliot et al, 1973). Esta técnica consiste en tomar fotografías con una exposición larga, de una laminilla de semen diluido. Los espermatozoides móviles se observan en la fotografía como un trayecto ('la huella que deja un patinador en el hielo nuevo'), mientras que los espermatozoides inmóviles se aprecian nitidamente. Haciendo un conteo se puede obtener una estimación objetiva de la motilidad progresiva.

Más recientemente se han desarrollado métodos computerizados para evaluar a la motilidad y a la velocidad espermáticos (Amano y Hammarstedt, 1980). Considerando que por ahora no se obtiene mayor precisión con estos métodos y el costo de los mismos, no se justificaría utilizar esta metodología.

La motilidad progresiva normal promedio en carneros está comprendida entre 70 al 90% (Sorensen, 1979). Esta variable es afectada por la frecuencia de colección (Tomkins et al, 1976); nivel nutricional (Parker et al, 1973); época de colección (Schanbacher, 1979; López et al, 1986), entre otros.

3.2.4. Morfología. La estimación de la morfología espermática es de gran interés, ya que el porcentaje de espermatozoides normales tiene una correlación relativamente alta con la fertilidad (Elliot, 1978). Un aumento del porcentaje de células espermáticas anormales puede significar ya sea una lesión en testículos o epididimo o bien una alteración en el tracto urogenital posterior o después de la eyaculación; esta última debida fundamentalmente a un mal manejo del semen. En el primer caso está comprometida la salud reproductiva del semental, y se manifiesta con un aumento de espermatozoides con

morfología de la cabeza y de la pieza media alterada. Las anomalías secundarias, características del segundo caso, se localizan principalmente en la cola (Sullivan, 1978).

Se han sugerido distintas técnicas para la evaluación de la morfología espermática. Pero todas ellas se basan en la observación individual de los espermatozoides inmovilizados previamente y teñidos o no. La observación de la morfología de la cola y pieza media es conveniente realizarla sin colorante y con microscopio de contraste de fase para evitar artificios de técnica. Comeron (1977) observó que soluciones salinas formuladas con mas adecuadas que los colorantes para la evaluación de abas citoplasmática en semen de carnero. Para la evaluación de la cabeza espermática se pueden utilizar colorantes de contraste, de los cuales el más utilizado es la eosina-nigrosina.

Se considera que un eyaculado normal de carnero no debe tener más de 15% de anomalías totales (Garduño del Campo, 1980). Son varios los factores no patológicos que pueden influir en el porcentaje de espermatozoides normales de un eyaculado, tal vez uno de los más importantes sea la estación ya que existen numerosos trabajos que han indicado que la época de colección afecta significativamente este parámetro (Cupps et al, 1960; Tomkins et al, 1976; Colas y Courat, 1977; Galal et al, 1978; Mickelson, Paisley y Bohmen, 1981; Trajic, Vázquez y González, 1984. Contró, 1988).

3.2.5. Porcentaje de acrosomas intactos (PAI). El proceso de dilución, refrigeración, congelación y descongelación produce un elevado daño acrosómico en el espermatozoide ovino. Tasseron, Amir y Schindler (1977); Watson y Martin, (1972) y Bustamante y Valencia (1981), observaron que el daño acrosómico sufrido por el esperma de carnero es mucho mayor que el que sufre

el espermatozoide de bovino durante el mismo proceso. Estos resultados coinciden con los de Healey (1969), quién estudió el daño acrosómico pos descongelación en semen de varias especies utilizando el microscopio electrónico. Encontró que un elevado porcentaje de espermatozoides de carneros tenían daño acrosómico en diferente grado.

El choque frío afecta la permeabilidad de la membrana. Robertson y Watson (1966), publicaron que el cambio brusco de temperatura altera la permeabilidad de la membrana plasmática, fundamentalmente para el ión calcio y a su vez la acumulación de calcio agrava el daño de la misma. Estos autores sugieren que el calcio puede interferir con la reacción acrosómica y aumentar el daño acrosómico. Quinn, Waite y Cleland (1969) observaron que el choque frío y especialmente la congelación producían graves alteraciones en la mayoría de los acrosomas de espermatozoides de carnero.

El porcentaje de acrosomas intactos está correlacionado positivamente con el porcentaje de no retorno al estró, en un grado mayor que la motilidad (Elliot, 1978); por ese motivo es una técnica de gran validez en la evaluación espermática. Sobre todo del semen congelado-descongelado. Lo Zhao-qi et al (1982), encontraron una correlación significativa ($P < 0.05$) entre el porcentaje de acrosomas intactos y la fertilidad.

La técnica consiste en la evaluación de una laminita de semen diluido y fijada en la cual se observa la ausencia o daño del borde apical con ayuda de un microscopio con gran aumento (1000 x). De preferencia, se utiliza una solución salina formulada como fijador y microscopio de contraste de fase o mejor aún de interferencia. Se han intentado distintas coloraciones para facilitar la observación de los acrosomas con un microscopio común (Wells y Awa,

1970), pero en general los artificios de la técnica alteran los resultados.

Tasseron, Amir y Shindler (1977), observaron que el porcentaje de daño acrosómico detectado en el semen ovino aumenta cuando se utiliza microscopio electrónico, debido a las pequeñas alteraciones no visibles con el microscopio óptico. Sin embargo, Ramos y Trejo (1986), no encontraron diferencias en el porcentaje de daño acrosómico cuando éste fue medido con microscopio electrónico, microscopio de contraste de fase y con la técnica de Wells y Aua.

3.2.6. Porcentaje de espermatozoides vivos. No necesariamente un espermatozoide inmóvil es un espermatozoide muerto y por medio de esta técnica se puede diferenciar los células vivas y muertas al momento de la evaluación. La técnica se basa en que algunos colorantes solo penetran a la célula espermática cuando ésta se encuentra dañada. Existen distintas tinciones pero la mayoría de ellas son mercurios de eosina con un colorante de contraste como la nigrosina o el verde rápido. Tal vez la tinción más utilizada es la eosina-nigrosina. Pero la evaluación, el semen es previamente diluido y coloreado con la eosina-nigrosina, posteriormente se hace un froto y se observan al microscopio. Las células que antes de la tinción estaban dañadas se colorean con la eosina, mientras que los espermatozoides vivos se observan sin colorear (Sorensen, 1979).

El quimerol interfiere con los resultados de esta técnica, por lo que no es utilizada para evaluar semen congelado-descongelado (Elliott, 1978).

3.2.7. Otros. Existen otras características espermáticas que pueden ser medidas, tales como características metabólicas y biológicas.

Las pruebas metabólicas propuestas son varias incluyendo la medición del pH. Este puede ser fácilmente medido utilizando tiras reactivas o un potenciómetro. A nivel de campo el primer método es fácil, rápido y aporta información sobre la calidad del semen, por lo que muchas veces es recomendado en trabajos de IA con semen fresco (Gardán del Campo, 1980). El pH del semen ovino oscila entre 5.9 y 7.3 (Sorenson, 1979) y disminuye después de la extracción, debido fundamentalmente a la acumulación de ácido láctico, producto de la fructólisis. Este aumento de la acidez del medio provoca una disminución de la motilidad espermática.

También se puede usar la prueba del azul de metileno como una medida de la utilización de oxígeno por la célula espermática. Se considera que el tiempo requerido para reducir el azul de metileno por una muestra de semen es un reflejo de la concentración y de la actividad espermática de la misma.

Se han sugerido otras pruebas metabólicas como la oxidación del piruvato, el índice de fructólisis y la reducción de resazurina, pero estas pruebas requieren tiempo y no aportan mayor información, como para ser adoptadas en la evaluación espermática de rutina.

Las únicas pruebas que permiten evaluar con certeza el poder fecundante del semen son las pruebas biológicas. Se pueden utilizar distintos variables como el porcentaje de no retorno al estro, el porcentaje de preñez o el porcentaje de parición (Gardán del Campo, 1980). Los dos últimos son más precisos que el primero, sin embargo son lentos y no permiten tomar decisiones sobre una muestra de semen que se quiera evaluar, además necesitan el efecto de hembra. Es posible utilizar el porcentaje de fertilización ya sea in vivo, recolectando embriones, o utilizando la técnica de fertilización in vitro. Pero

estas técnicas son costosas, requieren equipo y personal entrenado, por lo que no están siendo utilizadas en las evaluaciones de rutina.

3.3. DILUYENTES

Un buen diluyente para semen congelado debe cumplir con los siguientes requisitos:

- a) Proporcionar nutrientes que sirvan como fuente de energía para el espermatozoide.
- b) Proteger a la célula espermática contra los efectos de la refrigeración y la congelación.
- c) Tener la capacidad de amortiguar los cambios del pH.
- d) Mantener la presión osmótica y el equilibrio electrolítico.
- e) Inhibir el crecimiento bacteriano.
- f) Incrementar el volumen del semen.
- g) Suministrar un ambiente compatible con la continuación de los actividades metabólicas del espermatozoide (Foote, 1974).

3.3.1. Fuentes de energía. Las fuentes de energía más frecuentemente utilizadas en diluyente para semen ovino son algunos azúcares como la glucosa, fructosa, lactosa, sacarosa, entre otros. Estos azúcares también intervienen en el mantenimiento de la presión osmótica del medio y constituyen el principal ingrediente de algunos diluyentes cuando se congela semen en forma de pellets. En los diluyentes a base de yema de huevo, el azúcar más utilizado es la fructosa que es además el carbohidrato que se encuentra en mayor concentración en el plasma seminal. Se han utilizado diluyentes para congelar semen ovino constituidos por: monosacáridos (glucosa y fructosa), disacáridos (lactosa) y trisacáridos (sacarosa) combinados con citrato de sodio o con Tris Hidroxi-amino Metano (TRIS) (Visser, 1974b). Colas (1975) diluyó semen ovino en lactosa-yema a 39C y luego de refrigerarlo hasta 4C le agregó un diluyente a base de leche-glicerol y obtuvo 73 % de parición.

3.3.2. Protectores contra el choque frío. De acuerdo con la fuente de sustancias protectoras contra el choque frío, se pueden considerar dos grandes grupos de diluyentes, los que contienen yema de huevo y los que contienen leche. Además se podrían considerar otros dos grupos: los que no contienen ni yema ni leche y los que contienen ambos ingredientes.

El efecto protector de la yema de huevo sobre el semen refrigerado, fue comunicado por Phillips en 1939 (citado por Graham, Crabo y Pace, 1978). Se ha observado que esta protección es ejercida por algunas sustancias presentes en la yema de huevo como son la lecitina, proteínas y lipoproteínas (Fonte, 1978). White, Chow y Quinn (1980) observaron que el efecto protector de los fosfolípidos (fosfatidilcolina) se debe a interacciones libres de estructuras lipídicas con la membrana plasmática de los espermatozoides.

Pace y Graham (1974), observaron que el efecto protector de la yema de huevo no solo se ejerce durante la refrigeración sino también sobre la congelación. En ese trabajo observaron que el efecto crioprotector de la yema era sinérgico con el del glicerol y estaba determinado por la fracción lipoproteica. Además, Jones y Mann (1977), encontraron que la yema de huevo reducía la tasa de peroxidación que sufren los espermatozoides ovinos al congelarse.

Watson y Martin (1979a,b), estudiaron el efecto protector de la yema de huevo en diluyentes para semen de carnero. Cuando compararon el índice de no retorno al estró (NRE) de ovejoes inseminados con semen diluido con un medio con yema contra semen fresco sin diluir, obtuvieron mejores resultados con este último. Además, observaron que porcentajes crecientes de yema disminuyeron el NRE, aunque no afectaron la motilidad ni la morfología espermática. De estos experimentos se puede concluir que si se va a utilizar semen fresco

inmediatamente después de la colección, no es recomendable diluirlo, al menos con el diluyente utilizado por los autores anteriores. Sin embargo, la mayoría de los diluyentes para semen refrigerado o congelado requieren yema de huevo u otra fuente de protección similar.

Estwistle y Martin (1972A), obtuvieron mejores porcentajes de motilidad al descongelado utilizando 6.5 o 13 % de yema que cuando no incluyeron yema de huevo en el diluyente, además en otro experimento, obtuvieron mejor recuperación espermática con 6 que con 3 % de yema.

Graham, Crabb y Pace en su revisión de 1978, concluyeron que con porcentajes de 1 a 20 % de yema de huevo se obtienen resultados superiores que con 0 a 25 % y que el porcentaje óptimo de la misma en un diluyente sería alrededor de 6 %, dependiendo de los demás componentes utilizados en el diluyente. Watson y Martin (1973), encontraron que la yema de huevo en porcentaje muy elevado tenía un efecto dañino sobre el acrosoma del espermatozoide de ovino.

En los bovinos se han hecho varios experimentos para definir el porcentaje óptimo de yema en el diluyente, los resultados son variados dependiendo del diluyente empleado y de la temperatura de conservación del semen. Para el semen diluido en TRIS a 5°C, el porcentaje óptimo de yema sería 20 % (Faote, 1979).

La leche de vaca o en algunos casos de otras especies (Jones, 1969a; Sobhi y Tivers, 1974) se utiliza frecuentemente como diluyente para semen ovino. Tiene la ventaja de ser de fácil obtención y de costo reducido. Las proteínas y lipoproteínas de la leche protegen al semen del choque frío en forma similar a la yema de huevo (Faote, 1979). La leche tiene el inconveniente de que la grasa que contiene, dificulta la evaluación del semen cuando éste es diluido en

ella, por lo que es conveniente utilizar leche descremada (Bearden y Fuquay, 1980).

La leche también contiene una sustancia espermotóxica llamada loctenina. Esta sustancia es termolábil y puede inactivarse fácilmente si se calienta la leche durante 10 minutos a una temperatura de 90 a 95°C (Bearden y Fuquay, 1980). Debe evitarse que la leche alcance los 100°C para que no se coagulen las proteínas. Una forma sencilla y práctica de inactivar la loctenina a la temperatura indicada consiste en colocar la leche en un baño María con agua a ebullición durante 10 minutos.

En Francia están ampliamente difundidos los diluyentes a base de leche descremada para conservar el semen a 150 durante 10 a 12 horas (Colas y Courat, 1977). Los investigadores franceses publican resultados superiores en cuanto a recuperación espermática y a fertilidad con diluyentes a base de leche comparados con los de yema de huevo (Colas, 1975).

First et al (1961), evaluaron un diluyente a base de leche al cual se le agregaba yema de huevo y no encontraron diferencias de recuperación espermática con el semen congelado en diluyentes que contenían leche y yema o solo leche. De acuerdo a los resultados obtenidos, los autores concluyeron que la leche confería suficiente protección al semen tanto durante la refrigeración como durante la congelación.

3.3.3. Amortiguadores. El citrato de sodio se utilizó frecuentemente en diluyentes para bovinos, tiene una función amortiguadora e interviene en el equilibrio osmótico, debido a esto la solución amortiguadora de citrato de sodio junto con yema y glicerol, se ha utilizado como diluyente para semen ovino. Sin embargo, Acuña (1982), obtuvo porcentajes de motilidad pos descongelado significativamente menores cuando congeló

semen ovino en pastillas en un diluyente a base de citrato de sodio que cuando lo hizo con TRIS o TEST.

Se han utilizado varios amortiguadores de tipo zwitterión: TRIS, TES, TEST (TRIS más TES), NEM, entre otros (Foote, 1978) como diluyentes para semen de toros. En ovinos el más utilizado es el TRIS, aunque Araña (1982) no encontró diferencias en la recuperación espermática de semen congelado en TRIS o TEST.

Varios autores han publicado resultados que indican que el TRIS es un buen amortiguador para diluyentes de semen ovino congelado en pellets (Oziuk et al. 1972; Visser y Salomon, 1973). Fukui (1979), congeló semen ovino en pellets y obtuvo mayor recuperación espermática con un diluyente a base de TRIS-glucosa-yema-glicerol que con lactosa-yema-glicerol o con refinosa-citrato-yema-glicerol. El TRIS también se ha utilizado cuando se congela semen en pastillas con resultados similares a los obtenidos con pellets (Visser, 1974a). Salomon y Visser (1972), utilizaron diluyentes con diferentes azúcares (glucosa, fructosa, lactosa o refinosa) y los compararon con un diluyente a base de TRIS para congelar semen ovino en pellets. Estos autores encontraron mejores resultados de recuperación espermática en las muestras diluidas en TRIS. Además observaron que la elección del diluyente para la descongelación de los pellets era muy importante cuando se utilizaban los diluyentes a base de azúcares.

También se han publicado buenos resultados con TRIS en semen refrigerado. Abdelhakeem et al (1978), observaron que el semen ovino diluido en TRIS-yema-glicerol conservaba mejor la motilidad a 5°C que el diluido en glucosa-yema-glicerol.

Con el TRIS no solo se han publicado buenos resultados de recuperación espermática sino también

de fertilidad. Andersen, Amdal y Fougner (1973), congelaron semen en poquillos utilizando un diluyente a base de TRIS-yema de huevo e inseminaron a las ovejas intrauterinamente, y obtuvieron 88% de preñez al primer servicio. Estos resultados son los mejores publicados hasta ahora con semen ovino congelado. Los autores adjudican su éxito fundamentalmente a la técnica de IA. Esto fue intrauterino no quirúrgico, pero a pesar de los buenos resultados, los investigadores consideraron a este técnico como muy trabajosa y poco práctica para ser empleada en rebaños comerciales.

Se han estudiado los efectos que tienen la osmolaridad y las concentraciones de glicerol en los diluyentes a base de TRIS. Johnson (1974), evaluó las variaciones de la motilidad y el porcentaje de acrosomas intactos en semen ovino diluido en TRIS con distintas osmolaridades y concentraciones de glicerol. Los resultados de motilidad fueron superiores para las muestras tratadas con 9.7 % de glicerol y .23 M de TRIS, mientras que para la segunda variable los mejores resultados se obtuvieron con 3.8 % de glicerol y con .13 M de TRIS. Estos resultados indicarían que para conservar la integridad acrosómica se requerirían menores porcentajes de glicerol y mayores osmolaridades de TRIS que para mantener la motilidad del semen.

3.3.4. Antibióticos. Todos los diluyentes deben contener agentes antimicrobianos para controlar el crecimiento de organismos patógenos y también a aquellos que sin ser autógenos compiten con el espermatozoide por fuentes de energía y producen catabolitos tóxicos para la célula espermática. Forte (1978), publicó una extensa revisión sobre los diferentes agentes antimicrobianos que han sido utilizados en diluyentes para semen. Los antibióticos más frecuentemente utilizados son la penicilina combinada con la estreptomicina en dosis de 1000 UI y 1 mg por ml, respectivamente.

3.3.5. Agentes crioprotectores. Las investigaciones tendientes a explicar el daño que sufren los espermatozoides durante el proceso de congelación y descongelación han permitido establecer dos causas estrechamente relacionadas.

a) Durante la congelación se produce un "recuestro" de una parte del agua del diluyente para formar hielo. Esto determina un aumento de la presión osmótica del medio extracelular y la consiguiente deshidratación de los espermatozoides.

b) La formación de cristales intracelulares altera la ultraestructura de la célula espermática (Nazur, 1980).

Se ha buscado disminuir estos daños con técnicas adecuadas de congelación y descongelación y fundamentalmente utilizando agente crioprotectores en el diluyente. El glicerol, descubierto como crioprotector por Folds, es el más frecuentemente utilizado y actúa sobre las propiedades coligativas del semen diluido, provocando un descenso osmótico y por lo tanto minimizando el daño osmótico (Nazur, 1980).

Bustamante y Valencia (1981), compararon el glicerol con sulfoxido de dimetilo (DMSO) como agentes crioprotectores del semen ovino diluido en TRIS-yema y congelado en pajillos. El glicerol fue superior al DMSO o a la mezcla de ambos tanto en lo que se refiere a la motilidad post descongelación, como a porcentajes de acrosomas intactos.

La concentración de glicerol ha sido motivo de numerosos trabajos, sin embargo el porcentaje óptimo del mismo parece variar de acuerdo al tipo de diluyente utilizado. First et al (1981) utilizaron concentraciones de glicerol de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 15 % en diluyentes a base de leche y yema de huevo, y obtuvieron la mejor recuperación espermática con 6 y 8 %. Además, encontraron una fuerte interacción entre

el porcentaje de glicerol y el de yema de huevo; a medida que el porcentaje de yema se incrementó la sobrevivencia espermática decayó más rápido. Por su parte, Colos (1975), con un diluyente a base de leche obtuvo sus mejores resultados de fertilidad con 4 % comparado con 2 % de glicerol. Sin embargo, en la evaluación de la motilidad espermática no encontró diferencias significativas entre ambos tratamientos.

Becker et al (1977), trabajando con semen de toro y un diluyente a base de TRIS, obtuvieron sus mejores resultados con 7 a 9 % de glicerol, mientras que con diluyentes a base de citrato de sodio no encontraron diferencias significativas ni de motilidad progresiva ni de integridad acrosómica entre 7, 9 y 11 % de glicerol.

Neison et al (1985), congelaron semen ovino diluido en TEST-yema y obtuvieron una motilidad progresiva superior y una menor liberación de TG con 4 o 6 que con 2 % de glicerol. Mientras que Wasser (1974a), con semen ovino congelado en pellets obtuvo mejores resultados con 2 y 4 % de glicerol que con 8 %. Por otra parte, Bahai y Kay (1972) investigaron el efecto del porcentaje de glicerol y de otras variables sobre la recuperación del semen ovino y corvino descongelado. No encontraron diferencias significativas entre los tres niveles de glicerol utilizados (3, 6 y 9 %), ni tampoco efecto de las velocidades de congelación.

Fiser y Fairfull (1982), trabajando diluyentes hipertónicos para semen ovino a base de leche descremada obtuvieron sus mejores resultados con 4 y 6 % de glicerol y una velocidad de congelación de 10 a 160C/min. Además, encontraron una interacción entre los porcentajes de glicerol y las velocidades de congelación, y que por lo tanto podían obtener resultados similares con 8 % de glicerol y una velocidad de congelación de 5 a 30C/min. Las concentraciones de

glicerol mayores a 9 % fueron tóxicos para los espermatozoides.

Robbins, Soacke y Chandler (1976), trabajando con semen bovino, no encontraron interacción entre el porcentaje de glicerol y la velocidad de congelación, pero Fiser y Fairfull (1983), consideran que estos resultados se debieron a la estrecha variación de las velocidades de congelación utilizadas por estos investigadores. En el trabajo de Robbins, Soacke y Chandler (1976), se considera que 8.5 % es el porcentaje óptimo de glicerol (con una temperatura de descongelación de 45°C), aunque debido a que encontraron una interacción entre los niveles de glicerol y la temperatura de descongelación, consideran conveniente aumentar a esta última cuando se incrementan los porcentajes de glicerol.

Rodriguez et al (1975), trabajaron con semen de toro diluido en citrato de sodio-yema de huevo, y obtuvieron un porcentaje de glicerol óptimo coincidente con los otros trabajos citados (7 a 9 %). Además, encontraron una interacción significativa entre el porcentaje de glicerol y la velocidad de congelación similar a la obtenida por Fiser y Fairfull (1983) con semen ovino.

Netter, Gunzel y Fever (1985), evaluaron la influencia del nivel de glicerol en el diluyente sobre la fertilidad del semen ovino congelado. Utilizaron un diluyente a base de TRIS-yema de huevo y obtuvieron 27 y 20 % de parición cuando el diluyente tenía 8 o 4 % de glicerol respectivamente.

2.3.5.1. Temperatura de agregado del glicerol. Algunos autores han observado que si se agrega el glicerol a 30°C los resultados obtenidos son inferiores a cuando se lo agrega a 40°C. Sin embargo existe cierta discrepancia en la literatura sobre el tema.

Colas (1975), obtuvo motilidades al descongelado de 36 vs 47 % y porcentajes de preñez de 35 vs 48 % cuando agregó el glicerol a 30 o a 40, respectivamente. Igualmente Ferredan y Progaru (1963) obtuvieron mejores resultados agregando el glicerol a 2-50 que a 18-30C.

Sin embargo, Natto, Gunzel y Neves (1985), no encontraron diferencias en los porcentajes de parición (20.79 y 22.89 %) obtenidos con semen ovino congelado al que se le había agregado el glicerol a 23 y a 50. Maxwell (1986a,b), publicó resultados de fertilidad con semen ovino congelado en TRIS y con la fracción glicerolada del diluyente agregada a 30C. El semen se congeló en acetato y la IA se realizó por vía intrauterina mediante laparoscopia. En este trabajo se obtuvieron resultados de 73 % de parición, lo que indica que la utilización de glicerol a 30C permite obtener altos resultados de fertilidad, por lo menos en las condiciones del experimento referido. Solomon y Lightfoot en 1969, no encontraron diferencias al agregar el glicerol a 35 o a 50. Los diferentes resultados de parición podrían explicarse por la variedad de los diluyentes utilizados (Colas, 1975).

Otro aspecto importante en lo que se refiere al glicerol, es el método utilizado para agregarlo. Diversos autores han expresado la necesidad de agregar gradualmente el diluyente glicerolado, sea en varias fracciones separadas por 15 o 20 minutos o por goteo continuo, para lograr un incremento gradual de la concentración de glicerol en el medio y así reducir el efecto espermotóxico del mismo (Pickett y Perndtson, 1978). Sin embargo, Foote (1970a,b), trabajando con semen de toros, no encontró diferencias de motilidad ni de fertilidad cuando añadió la fracción glicerolada del diluyente en una o cuatro etapas con intervalos de 15 minutos. Resultados similares obtuvieron Entwistle y Martin (1972b), trabajando con semen de carnero y agregando el glicerol en una o tres fracciones con intervalos de 20 minutos.

Urea (datos no publicados) tampoco encontró diferencias de motilidad ni de integridad acrosómica al agregar el glicerol en una o tres etapas separadas por 15 minutos, con semen ovino congelado en pañillos y utilizando un diluyente a base de TRIS-yema de huevo-glicerol.

3.3.4. Otras sustancias utilizadas en los diluyentes para semen ovino, se han utilizado una gran cantidad de sustancias para intentar mejorar los resultados obtenidos con semen ovino congelado. En esta revisión se hará una breve referencia a algunas de las más importantes.

3.3.6.1. Prostaglandinas. El uso de prostaglandinas (PGF₂ alfa) en los diluyentes para semen ovino congelado, se ha postulado como una forma de mejorar el transporte espermático en el tracto genital de la oveja (Gustafsson, 1973; Memon et al, 1980).

Pimov y Georgiev (1977), observaron que el semen de carnero presenta concentraciones de PGF₂ alfa mayores que el de otras especies. Cuando al semen de carnero fresco se le agregaron estas prostaglandinas antes de la IA, estos autores obtuvieron un incremento en la fertilidad del 15 %.

Se han realizado algunos trabajos para estudiar el efecto de las distintas dosis de PGF₂ alfa aplicadas al semen ovino sobre la recuperación espermática y la fertilidad. Gauder y Jaha (1984), compararon los resultados obtenidos cuando agregaban 0, 12.5, 25, 50 y 100 µg/ml y encontraron que 12.5 µg/ml de PGF₂ alfa incrementaron la motilidad del semen de carnero incubado a 37°C durante 235 minutos en una magnitud significativamente superior a los otros tratamientos. Cuando se conservó el semen a 5°C no se observaron ventajas en el uso de la prostaglandina.

Memon et al (1984), observaron que dosis de hasta 300 ug de PGF₂ alfa/ml de semen diluido en TEST-yema-glicerol, no afectaron la recuperación de la motilidad espermática al descongelado. Estos autores concluyeron que los efectos positivos de las prostaglandinas integradas al diluyente sobre la fertilidad se deben a un incremento en el transporte espermático en el tracto genital femenino.

3.3.4.2. Cafeína. Se ha utilizado la cafeína en el diluyente para descongelación de semen ovino congelado en pellets como una vía para mejorar la motilidad espermática. Anel et al. (1984) estudiaron el efecto de la dosis de cafeína en el diluyente para descongelación de pellets de semen de carnero diluido en TEST-glucosa-yema-glicerol, y observaron que el uso de 2mM de cafeína produjo un incremento de la motilidad progresiva en comparación con la obtenida con 0, 5 y 10 mM.

3.3.7. Diluyentes hipertónicos. Fiser, Angusworth y Fairfull (1982), publicaron haber obtenido sus mejores resultados de motilidad pos descongelado en semen ovino, cuando utilizaron diluyentes hipertónicos comparado con diluyentes isotónicos. Sin embargo, Lightfoot y Salamon (1969), obtuvieron sus mejores resultados con 375 a 465 mOsm en un diluyente a base de refinosa-yema-citrato, lo que sugiere que la osmolaridad óptima depende del diluyente utilizado.

Más recientemente, Fiser, Angusworth y FairFull (1982), trabajando con un diluyente a base de leche descremada, obtuvieron motilidades pos descongelación de 53, 49 y 24 % con osmolaridades de 750, 600 y 320 mOsm/K, respectivamente. Esto indicaría que el uso de diluyentes de leche hipertónicos puede ser de gran interés. Los mismos autores (Fiser y FairFull, 1986) hicieron otro experimento para estudiar los porcentajes de glicerol y la velocidad de congelación óptima para

diluyentes hipertónicos (450 y 600 mOsm/K) a base de leche descremada. Los mejores resultados los obtuvieron con porcentajes de 4 a 5 % de glicerol y velocidades de congelación de 10 a 100C/min. Al incrementar el glicerol a 8 %, la velocidad de congelación debió disminuirse a 5-30C/min. para obtener resultados óptimos. En lo que se refiere a la osmolaridad no hubo diferencia entre los resultados obtenidos con los dos tratamientos.

3.4. VELOCIDAD DE REFRIGERACION

El tiempo empleado en bajar la temperatura de 35 a 5C no presenta muchas diferencias entre los distintos autores. Smith et al (1972) utilizaron una hora, Colas (1975) 2 horas y Wiser (1974a) de 2 a 2.5 horas. Jones (1969b) estudió el efecto del tiempo de refrigeración (entre 30 y 5C) y observó que con 3 horas el semen se recuperó mejor al descongelado que con 2 o 1 hora. Sin embargo en ese experimento se encontró una interacción significativa ($P < 0.05$) entre el tiempo de refrigeración y el de equilibrio, de manera que el semen refrigerado hasta 5C en 1 hora se recuperó mejor después de 15 horas de equilibrio, y el semen refrigerado en 3 horas se recuperó mejor con un tiempo de equilibrio menor.

3.5. TIEMPO DE EQUILIBRIO (T_{EQ})

El tiempo de equilibrio es el que transcurre desde que se agrega el glicerol hasta que se congela. Inicialmente se le dio mucha importancia, pero luego se observó que lo realmente importante no es el tiempo que el glicerol está en contacto con los espermatozoides, sino el tiempo que estos están a 5C (Fickett y Berndson, 1978).

Colas (1975) no encontró diferencias entre tiempos de equilibrio de 20 y 150 minutos, con semen ovino diluido en lactosa-yema-glicerol y en leche

descremada-glicerol. Sahni y Roy (1972), tampoco encontraron diferencias de motilidad pos descongelado con tiempos de equilibrio de 1 a 6 horas. Salomon (1970), congelando semen en pellets, tampoco encontró diferencias en la sobrevivencia espermática del semen sometido a 1 o 4 horas de tiempo de equilibrio. Pett y Nath (1969), publicaron que el semen de carnero podía protegerse de los daños de la congelación más eficientemente con 1 hora que con 6 o 12 horas de tiempo de equilibrio. Estos resultados coinciden con los de Dziuk et al (1972), quienes también obtuvieron buenos resultados con semen ovino congelado después de una hora de tiempo de equilibrio.

Ficer y Petro (1984), congelaron semen ovino en pajillas de 0.5 ml y utilizaron tiempos de equilibrio de 0 o 18 horas. Obtuvieron una motilidad progresiva pos descongelado mayor con 2 que con 6 horas de tiempo de equilibrio, no encontrando diferencias entre 2 y 6 horas y observaron un descenso significativo de la variable con 18 horas de tiempo de equilibrio.

3.3. FORMA DE ENVASADO

Salomon (1967), comparó semen congelado en pajillas, ampolletas y pellets que previamente había diluido en citrato de sodio-glucosa-yema. Si bien no hubo diferencias significativas entre las fertilidades obtenidas con los distintos tratamientos, el promedio general de parición (5.9%) fue muy bajo. En trabajos más recientes se han obtenido resultados muy superiores, especialmente con pellets y pajillas, ya que la literatura sobre semen ovino congelado en ampolletas es muy escasa.

Visser (1974a), obtuvo mejores resultados con pellets congelados en hielo seco que con pellets congelados directamente en nitrógeno líquido o con pajillas. La diferencia entre pellets y pajillas, según el autor podría estar dada por la diferencia en la

velocidad de congelación y/o el efecto benéfico que la solución de descongelación ejerce sobre los espermatozoides congelados en pellets.

Aomdal y Andersen (1968), obtuvieron 66.5 % de parición con semen diluido en lactosa-yema-glicerol y envasado en pajillas.

Maxwell et al (1960), obtuvieron 52 y 29 % de parición con semen congelado en pellets y en pajillas, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

3.7. TEMPERATURA DE DESCONGELACION (70).

La relación entre temperatura y tiempo de descongelación determina una velocidad de descongelación y una temperatura final pos descongelación. La tasa de descongelación tiene un gran efecto sobre los resultados de recuperación espermática. La geometría de las pajillas determina que la relación superficie/volumen sea elevada y por lo tanto el semen dentro de la pajilla responde rápidamente a los cambios térmicos del medio (Nobbins, Snacke y Chendler, 1974). Por estos motivos el semen envasado en pajillas se congela y descongela en forma uniforme y sufre menos daños que con otros tipos de envase.

De Abreu et al (1978), trabajando con semen de toro, obtuvieron mayor motilidad progresiva con temperaturas de descongelación de 35 que con 50. Sin embargo, no encontraron diferencias entre 35 y 75C. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Almqvist (1974), quien encontró mayores porcentajes de motilidad progresiva e integridad acrosómica cuando descongeló semen congelado en pajillas a 35C durante 10, 20 u 30 segundos que cuando lo hizo a 50 durante 50 segundos. Forde y Gravis (1974), obtuvieron mayor fertilidad con semen descongelado a 35C que a 10C.

mientras que Senger, Secker y Hillers (1974), también con semen bovino obtuvieron mayores porcentajes de motilidad progresiva pos descongelado e integridad acrosómica con temperaturas de descongelación de 35 que con 50. Rodríguez, Beraditsos y Pirkatt (1975), observaron que el incremento de la temperatura de descongelación de 5 a 55C permitió tener motilidades pos descongelado crecientes, pero cuando continuaron hasta 90C no obtuvieron mayores ventajas. Robbins, Saccke y Chandler (1976), también obtuvieron mayor motilidad progresiva e integridad acrosómica con temperaturas de descongelación crecientes y además encontraron una interacción entre tasa de descongelación y porcentaje de glicerol en el diluyente.

La mayoría de la literatura publicada sobre temperatura de descongelación de semen ovino, coincide con los resultados obtenidos con semen bovino. Amdal y Anderson (1943), obtuvieron menor porcentaje de espermatozoides coloreados (muertos) con 75 que con 35C de temperatura de descongelación. Linde (1972), observó mejores porcentajes de patición con semen descongelado a 75C que con semen descongelado a 35C. Anderson, Amdal y Fougner (1973), obtuvieron muy buena fertilidad con semen descongelado a 75C. Mientras que Lille (1984), también publicó buenos resultados de fertilidad con semen descongelado 70C/90segundos. Algunos trabajos (Mottos, Gunzel y Reyes, 1985) sugieren que no se obtienen diferencias significativas de fertilidad descongelando a 40C durante 10 segundos o a 70C durante 3 segundos. Fukui (1979), publicó resultados contrarios a todos los anteriores, ya que obtuvo mejor recuperación espermática con una temperatura de descongelación de 35C que con 75C. Sin embargo, debe considerarse que estos resultados se obtuvieron con semen congelado en pellets, mientras que los otros investigadores trabajaron con semen envasado en pajillas, y que por lo tanto no pueden compararse.

3.8. TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DEL SEMEN DESCONGELADO

La conservación térmica del semen durante largos periodos de tiempo facilita el uso extensivo de carneros superiores y permite la conservación del material genético para una futura utilización.

First et al (1961), observaron que la motilidad al descongelado se reduce durante los dos primeros meses posteriores a la congelación, pero después se mantiene durante 15 meses o más.

Salamon y Visser (1974) no encontraron diferencias de fertilidad inseminando con semen congelado y almacenado durante 2 semanas o 5 años. Salamon, Evans y Maxwell (1966), inseminaron ovejas con semen congelado y almacenado durante 2 semanas, 3, 5, 7, 11 y 16 años y no encontraron diferencias significativas en la fertilidad. Estos datos sugieren que al menos durante un periodo de 16 años de almacenamiento, el semen ovino no pierde capacidad fecundante.

3.9. CAMBIO DE ESPERMATOZOIDES POR DOSIS Y DILUCION

El grado de dilución del semen parece no afectar la recuperación espermática. First et al (1961) publicaron que el porcentaje de motilidad no se vio afectado cuando trabajaron con grandes diluciones (1:100) lo mismo encontraron Entwistle y Martin (1972a) con diluciones de 1:40. Dado que se requieren gran cantidad de espermatozoides por dosis de semen congelado, estos resultados solo tienen interés en el desarrollo de investigaciones in vitro.

Es muy importante determinar la dosis mínima fecundante, de tal manera de aprovechar al máximo un eyaculado sin disminuir la fertilidad. En lo que se refiere al semen ovino fresco la literatura ubica a la dosis mínima fecundante entre 50 y 100 millones de espermatozoides móviles (Salamon, 1976; Durán del

Campo, 1980). Sin embargo, la mínima dosis para serón ovino congelado varía según los autores. Coles (1980), sugiere que para obtener buenos resultados en la IA con semen congelado se requeriría un mínimo de 360 millones de espermatozoides móviles al momento de la congelación.

El número óptimo de espermatozoides por dosis en los ovinos está influido por varios factores de los cuales la técnica de inseminación es uno de los más importantes. Cuando la IA se hace intraúterinamente se requieren menos espermatozoides para obtener los mismos resultados (Salazar, Evans y Maxwell, 1986). También influye el tipo de estro: los mejores resultados se obtienen inseminando ovejás en estro natural (Fukui y Roberts 1977b).

3.10. INSEMINACION ARTIFICIAL (IA).

El uso de la IA en ovinos con semen fresco está ampliamente difundido en algunos países. Sin embargo con semen congelado, se han obtenido bajos resultados de fertilidad en la mayoría de las investigaciones publicadas hasta la fecha. Dentro de los factores que influyen en los resultados negativos obtenidos con la IA en este especie se pueden mencionar: la forma de conservación del semen y la técnica de IA fundamentalmente.

3.10.1. Forma de conservación del semen. Se pueden considerar dos formas de conservación del semen: líquido o congelado. La primera incluye al semen fresco y al refrigerado. El semen fresco es el que se utiliza dentro de la primer hora desde la recolección y que por lo tanto no se refrigera. Este tipo de semen puede o no diluirse de acuerdo con los requerimientos del volumen que se va a utilizar para la

IA. Watson y Martin (1976a), observaron que no es conveniente diluir el semen fresco con diluyentes a base de yema porque la fertilidad se ve afectada.

La enorme mayoría de las inseminaciones realizadas en ovejas en el mundo son con semen fresco. En la Unión Soviética se inseminan artificialmente más de 40 millones de ovejas con este método cada año, y en América del Sur y Oceanía también tiene gran difusión esta técnica (Herrán del Campo, 1980). Cuando se inseminan rebaños grandes con el semental en el establecimiento este método es muy práctico. Sin embargo, es muy difícil realizar programas regionales o nacionales con esta metodología debido a que los sementales deben estar en el el sitio donde se realiza la IA. Esto reduce el aprovechamiento de los carneros y disminuye el diferencial de selección. Por otro lado, no le evita al productor el comprar y mantener los sementales de buena calidad.

La refrigeración del semen permite conservarlo durante 24 horas y por lo tanto transportarlo a rebaños más o menos distantes del lugar de colección. Esto es de gran utilidad cuando se trata de inseminar a rebaños pequeños ya que con este método se pueden organizar programas regionales de IA utilizando a un semental para varios establecimientos (Zibatov, 1964). Para la refrigeración del semen se pueden utilizar diluyentes a base de yema o de leche. Existe una interacción entre diluyentes y temperatura de conservación del semen por lo cual la temperatura óptima para conservar el semen diluido es de 15C para los diluyentes a base de leche, y de 5C para los diluyentes a base de yema (Colas et al, 1968).

Los resultados obtenidos con semen refrigerado, en muchas investigaciones resultan inferiores a los obtenidos con semen fresco, pero algunos investigadores como Colas y sus colaboradores (1968) publican muy buenos resultados utilizando semen diluido en leche y

conservado a 15C hasta por 18 horas. El semen diluido con leche descremada y refrigerado a 15C se utiliza en gran escala en programas de IA en Francia.

Solomon, Maxwell y Firth (1977) estudiaron el efecto del tiempo de conservación del semen diluido en TRIS y refrigerado a 5C, sobre la fertilidad. En el experimento incluyeron además el efecto de la técnica de IA. Los resultados obtenidos con IA con semen fresco aplicado en forma pericervical al día de la recolección, fueron de 62.5% de fertilización, mientras que para IA intrauterina quirúrgica se obtuvo 75.5%. A los dos días con IA pericervical se obtuvo 40% y de ahí en adelante no se obtuvieron fertilizaciones con esta técnica. Sin embargo aplicando el semen por vía intrauterina a los 2 días se obtuvo 75% de fertilización y aun a los 8 días 52.9%. Estos resultados indicarían que la refrigeración del semen ovino altera el transporte y/o la sobrevivencia espermáticas en el tracto reproductivo de la oveja.

La utilización de semen congelado en ovinos, se ha realizado con resultados muy variados desde hace algunos años. Los porcentajes de fertilización y de parición obtenidos por esta técnica en general son muy bajos (Hiser, 1974b, Graham, Irwin y Pace, 1978). Si se analizan los resultados de las numerosas investigaciones realizadas en los dos trabajos antes citados, puede concluirse que con la técnica pericervical, la mayoría de los resultados de fertilización o parición obtenidos con semen ovino congelado, se encuentran entre 20 y 40%. La utilización de semen congelado determina además resultados de prolificidad algo inferiores a los obtenidos con semen fresco (Lille, 1974). Langford et al (1979) compararon el porcentaje de concepción, el porcentaje de parición y el número de corderos nacidos por parto, en dos grupos de ovejas: unas inseminadas con semen fresco y las otras con congelado. Para las tres variables estudiadas se obtuvieron

resultados superiores con semen fresco, destacándose que con semen congelado se advirtió una sensible diferencia entre el porcentaje de concepción y el de parición (65% y 43%) que los autores atribuyen a mortalidad embrionaria debida al semen congelado.

Los resultados superiores, casi siempre están asociados con la utilización de una técnica de IA que permite depositar el semen más profundamente en el tracto reproductivo de la ovaia.

A pesar de estos resultados, el interés en la utilización del semen congelado no ha disminuido. En gran medida porque su utilización traería enormes ventajas a la ovicultura como son: el aumento en el diferencial de selección de los machos y la utilización de semen de currares superiores sin la necesidad de que ellos se encuentren en el establecimiento, en la región o en el país y aún en el continente. También es importante tener en cuenta que la reproducción en los machos ovinos está reducida por la estación del año (Coles, 1975; Coles y Lourat, 1974). La utilización de semen de currares congelado en la época de máxima fertilidad permitiría evitar el efecto de macho en los embriões fuera de época reproductiva.

3.10.2. Técnica de Inseminación Artificial.- El cérvix de la ovaia externamente tiene forma cilíndrica de aproximadamente 3 cm de longitud y un cm de ancho (Barrón del Campo, 1968). Sin embargo la luz cervical presenta la particularidad de ser muy sinuosa debido a la presencia de 5 a 8 anillos que no están alineados entre sí (Riera, 1984). Por otra parte existe una gran variación individual entre ovaia en lo que a anatomía de cérvix y apertura cervical en vagina se refiere (Barrón del Campo, 1968). Todo ello dificulta y en muchos casos hace imposible el paso de una pipeta de IA (Riera, 1984). Por este motivo la mayoría de las IA en ovinos se realizan depositando el

semen en la vagina, en el orificio externo del cérvix (técnica pericervical).

Para realizar esta técnica se requiere de un equipo mínimo, un vaginoscopio o espéculo con una fuente de luz y una pipeta para depositar el semen. La técnica consiste en introducir el vaginoscopio lubricado a la vagina y localizar el fómix vaginal. Una vez encontrado ésta, se introduce la pipeta con el semen en el orificio externo del cérvix; se retira un poco el vaginoscopio, para que las paredes anteriores de la vagina se plieguen y de esta manera disminuir el reflujó de semen, y se deposita el mismo. Esta técnica tiene la gran ventaja de ser sumamente sencilla, rápida y practicamente todos los parejas pueden ser inseminados con ella. Por estos motivos es muy fácil entrenar rápidamente personal para realizarla (Burda del Campo, 1980) Sin embargo los resultados de fertilización obtenidos son más bajos que con otras técnicas, sobre todo cuando se utiliza semen congelado (Felix, 1977b). Graham et al (1976) concluyeron que los porcentajes de concepción de partición ectópicas depositando el semen en el orificio externo del cérvix son inferiores a los que se obtienen cuando se deposita el semen intracervical. A su vez, observaron que este último método proporciona resultados inferiores a la IA intrauterina.

Para resolver este inconveniente se han desarrollado otras técnicas de IA. Una técnica más o menos sencilla es la que consiste en depositar el semen dentro del cérvix, atravesando dos o más anillos. En esta técnica se le denomina cervical profundo y sus resultados son algo variables, posiblemente debido a que cuanto más profunda sea la IA, mayores pueden ser los porcentajes de concepción. Para realizar esta técnica se requiere también de un vaginoscopio y una fuente de luz y de una pipeta con punta flexible y requiere de un mayor grado de entrenamiento del técnico inseminador.

La posibilidad de penetrar el cérvix de una oveja con la pipeta de IA depende de la forma del orificio externo del cérvix (foraix vaginal). Fukui y Roberts (1978) estudiaron, en base a una clasificación anatómica realizada por Dun en 1935 la dificultad que presentan los distintos tipos de orificios externos del cérvix para la penetración con la pipeta de IA. Estos investigadores observaron que hay formas del foraix que presentan menos dificultad que otras y que las ovejas más viejas tienen mayor cantidad de pliegues.

Se han descrito varias técnicas de IA intrauterina que permiten obtener porcentajes de concepción muy altos incluso utilizando semen congelado (Andersen, Amdal y Fouquier, 1973). Las técnicas de IA intrauterina se pueden clasificar en quirúrgicas y no quirúrgicas. Las primeras, si bien permiten obtener buenos resultados, tienen la desventaja que acarrean el acto quirúrgico y sus consecuencias. Dentro del grupo de las técnicas quirúrgicas se ubica la IA por laparoscopia que si bien implica una pequeña incisión, casi en ocasiones inconvenientes para el futuro reproductivo de la oveja (McKelvey, Robinson y Aitken, 1985; Maxwell 1986 a y b).

Andersen, Amdal y Fouquier (1973) desarrollaron una técnica de IA intrauterina no quirúrgica que les permitió obtener 82% de concepción con semen diluido en TRIS y congelado sin embargo estos resultados no pudieron igualarse en trabajos posteriores. Fukui y Roberts (1978) utilizaron una técnica similar a la de Andersen y su equipo. Los resultados de fertilización con semen congelado que obtuvieron fueron altos (71.4%), pero en un porcentaje elevado de ovejas (alrededor de 50%) no fue posible realizar la IA intrauterina. Esto probablemente debido no solo a la dificultad de penetrar el orificio cervical externo sino, fundamentalmente debido a que los anillos no están alineados y a la presencia de numerosos pliegues

que en gran medida oculta la luz cervical. Estos hallazgos llevaron a Kristinsson y Wildorf (1985) a concluir que los métodos actuales de IA intrauterina en ovinos no son prácticos a nivel masivo. Por otra parte la técnica requiere de un gran entrenamiento del inseminador y en muchos casos de varios minutos para inseminar a una oveja. Por estos motivos debe continuarse investigando para implementar una técnica de IA para las ovejas que sea eficaz pero también de fácil aplicación. La posibilidad de pasar al cervix ovino con una pipeta, traería no solo mejores resultados de IA con semen congelado sino que haría factible la recolección de embriones por métodos no quirúrgicos en la especie, aumentando la posibilidad de difusión de esta técnica en los ovinos.

IV. MATERIALES Y METODOS.

El trabajo se realizó en el Centro Nacional de Genética y Reproducción Animal de la Dirección de Normatividad Pecuario, (SARH), ubicado en Ajuchitlón, Mpio. de Colón, Querétaro. Se encuentra a una altitud de 1900 m.s.n.m., a 20° 50' latitud Norte, y 100° 03' Longitud Oeste; la temperatura promedio anual es de 17.30 y la precipitación promedio anual es de 568.6 mm distribuidos en los meses de julio a octubre (Información de la Estación Climatológica Base del Municipio de Colón, Quer.).

Se utilizaron 4 sementales adultos de la raza merina Australiano importados de Australia en 1982. Estos animales estaban sometidos a un régimen de colección de semen dentro del programa ovino de Instituto Nacional de Inseminación Artificial y Reproducción Animal (INIARA), SARH.

4.1. EXPERIMENTOS PREVIOS.

Se hicieron dos experimentos previos con el objeto de evaluar el efecto de la dilución del semen sobre la motilidad progresiva al descongelado (MPG) y el porcentaje de acrosomas intactos (PAI), y el efecto del técnico sobre la evaluación de dichas variables.

4.1.1. Efecto de la dilución. En este trabajo se utilizaron 3 eyaculados de los 4 toros obtenidos con vagina artificial (VA). Cada eyaculado se subdividió en 3 fracciones que se diluyeron utilizando un diluyente a base de TRIS-yema de huevo (Forte, 1970a) hasta alcanzar concentraciones finales de: 600, 300, 100, 40 y 40 millones de espermatozoides por ml. El semen se envasó en pajillas frías de 0.5 ml. y se congeló siguiendo el procedimiento habitual del

laboratorio (Pérez y Lopez, 1984). Posteriormente se descongelaron 3 pajillos de cada tratamiento en agua a 35°C durante 30 segundos. Se evaluó la MPD y el PAI de cada muestra. Los resultados se analizaron por análisis de varianzas (Steel y Torrie, 1980) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P<0.05). Se concluyó que para las diluciones y el diluyente estudiados no hubo efecto de dilución. Por lo que se pudieron utilizar concentraciones de 39 millones de espermatozoides móviles por dosis en experimentos posteriores, con el objeto de que una fracción de cada eyaculado estuviera representado en cada tratamiento.

4.1.2. Efecto del observador. Las primeras 100 muestras del experimento fueron evaluadas por dos observadores entrenados que realizaron las lecturas bajo las mismas condiciones. Se calculó la correlación entre ambos, resultando ésta altamente significativa (P<0.01). Los índices de correlación obtenidos fueron .94 y .81 para MPD y PAI respectivamente. En base a estos resultados la evaluación de las muestras restantes se realizó por un solo técnico.

Después de estos experimentos se realizó el trabajo principal que consistió de dos experimentos. En el primero, se estudió el efecto de algunas variables de la técnica de congelación sobre la recuperación espermática *in vitro*. Posteriormente el mejor procedimiento se evaluó *in vivo* en un experimento de campo.

4.2. PRIMER EXPERIMENTO.

Se utilizaron 10 eyaculados de 4 sementales, obtenidos por vagina artificial durante el mes de octubre de 1984. Los eyaculados fueron evaluados inmediatamente después de colectados. Se registró el volumen directamente del tubo de colección y se

expresó en ml. Se evaluó la motilidad progresiva utilizando un microscopio de contraste de fase con 400 x. Para esta evaluación, las muestras fueron previamente diluidas en el diluyente sin glicerol que se iba a utilizar. La motilidad se expresó en porcentaje de espermatozoides moviéndose progresivamente. La concentración se evaluó por el método del hemocitómetro de acuerdo a la técnica descrita por López y Valencia (1982). Se expresó en millones de espermatozoides por ml. Con los datos anteriores se procedió a calcular el total de espermatozoides móviles en el eyaculado y la cantidad de diluyente necesaria para obtener dosis de 30 millones de espermatozoides móviles por pajilla. Se fijaron límites mínimos para procesar a cada eyaculado: volumen de 0.5 ml, 70% de motilidad progresiva y 5 mil millones de espermatozoides móviles totales. Por este motivo se desechó un eyaculado que no alcanzó el mínimo exigido para total de espermatozoides móviles en el eyaculado. También se evaluó el porcentaje de acrosomas intactos. Para ello se tomó una gota de semen y se diluyó y fijó en 1 ml de solución de Bouček. Posteriormente se observaron gotas aisladas en el microscopio de contraste de fase utilizando la lente de inmersión (1000x) (Pastorante y Valencia, 1981) y se contaron 100 espermatozoides por muestra. La evaluación se hizo en base a borde apical normal y borde apical ausente o dañado. El resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto (PAI).

El diluyente que se utilizó fue THIS-ácido cítrico-fructosa con 20% de yema de huevo, 1000 UI de penicilina y 1 mg de estreptomizina por ml y glicerol (Fonte, 1976a).

Cada eyaculado se subdividió para obtener una fracción de semen para cada tratamiento y de esa manera anular un posible efecto de eyaculado. Los tratamientos considerados fueron los siguientes :

- Porcentaje de glicerol en el diluyente (GL): 3, 6 y 9%.

Se procedió a elaborar 3 diluyentes conteniendo 6, 12 y 18% de glicerol (diluyente B) de tal manera que al añadirlos a la fracción del semen y diluyente sin glicerol (diluyente A) se obtenían los niveles deseados. Además se elaboraron diluyentes que contenían los niveles de glicerol deseados en una sola fracción: 3, 6 y 9%.

- Temperatura de agregado del glicerol (TA6): 35C y 50C. A la mitad de las muestras, el glicerol (diluyente B) se les añadió luego de que el semen había alcanzado los 50, mientras que a la otra mitad se le añadió a 35C. Para ello el semen se colocó en baño María a dicha temperatura y se le añadió el diluyente en una sola fracción. En todos los casos en el momento de mezclarse, diluyente y semen estaban a la misma temperatura.

-Tiempo de equilibrio (TE0): 0, 2 y 4 horas.

El tiempo de equilibrio se consideró desde que se agregó el glicerol hasta que el semen fue congelado. Por razones obvias el tratamiento de TE0 horas fue imposible de realizarse en la TA6 de 35C.

-Temperatura de descongelación (TD): Los págillos se descongelaron en agua a las temperaturas y tiempos siguientes: 5C durante 3 minutos, 35C durante 30 segundos y 75C durante 5 segundos.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

Una vez recolectado el semen se colocó en un baño María a 35C y se evaluó en un tiempo no mayor de 10 minutos. El empujado se subdividió entonces en 6 alícuotas que fueron colocadas en 6 tubos diferentes. A la mitad de ellos se les añadió el total de diluyente requerido conteniendo 3, 6 y 9% de glicerol. Mientras que los tres restantes fueron diluidos con

diluyente a hasta alcanzar la mitad del volumen final deseado. Cada tubo fue colocado en un vaso de precipitado con agua a 35°C y llevado a un cuarto frío a 5°C. En un tiempo de dos horas el semen alcanzó los 5°C. En este momento se procedió a envasar 3 pajillas de cada una de las tres alícuotas que habían recibido el total del diluyente y se procedió a su congelación. Posteriormente se completó la dilución de las alícuotas restantes con diluyentes que contenían 0, 12 y 1% de glicerol. Inmediatamente después se envasaron 3 pajillas de cada muestra y se congelaron. A las 2 y 4 horas siguientes se envasaron y se congelaron las pajillas correspondientes para TEG 2 y 4 horas.

La congelación se realizó en vapor de nitrógeno a -160°C durante 10 minutos y después las pajillas fueron sumergidas en nitrógeno líquido. Las 3 pajillas de cada tratamiento se almacenaron en un bastón identificado con un número de código que correspondía a cada tratamiento. La utilización del código permitió desconocer que tratamiento se estaba evaluando al momento de la descongelación y de esta manera evitar posibles sesgos en la evaluación.

La descongelación se realizó en agua a las temperaturas y tiempos indicados en los tratamientos. Se procedió a evaluar la motilidad progresiva y la integridad acrosómica de la misma manera que se se evaluaron en el semen fresco. Debido a que la solución de Hancock precipita la yema de huevo del diluyente fue necesario hacer las evaluaciones del Pél inmediatamente después de fijar los muestras.

Las variables evaluadas fueron los porcentajes de motilidad y de acrosomas intactos del semen fresco y del semen descongelado.

El arreglo de los tratamientos fue un factorial $3 \times 2 \times 3 \times 3$ con un diseño experimental totalmente

análisis. El análisis de los resultados se hizo utilizando modelos lineales generales (paquete SAS). Inicialmente se utilizó una transformación de arcoseno para analizar los resultados, pero debido a la alta correlación entre los datos transformados y sin transformar solo se consideraron estos últimos, para facilitar la interpretación de los resultados.

Se analizaron diversos modelos incluyendo las variables de tratamientos y sus interacciones, tomando como definitivos a aquellos que incluyen efectos significativos e importantes en relación a la magnitud del coeficiente de determinación múltiple. Los efectos del seminal y del evacuado no se incluyeron en los modelos debido a que el diseño experimental controló las posibles diferencias que pudieran presentar estas variables, al tomar submuestras de cada envase de cada seminal para cada uno de los tratamientos. Los modelos definitivos fueron los siguientes:

$$MPG_{ijkl} = \mu + \beta_i + \tau_{AGj} + TEQ_k + TDI_l + (\beta\tau)_{AGi,j} + (\beta\tau)_{TDi,l} + e_{ijkl}$$

En donde:

MPG_{ijkl} = motilidad progresiva al descongelado.

μ = media general para todas las observaciones

β_i = efecto fijo del glicerol en el i ésimo nivel

τ_{AGj} = efecto fijo de la temperatura de agregado del glicerol en el j ésimo nivel.

TEQ_k = efecto fijo del tiempo de equilibrio en el k ésimo nivel

TDI_l = efecto fijo de la temperatura de descongelación en el l ésimo nivel

$(\beta\tau)_{AGi,j}$ = efecto de la interacción entre β_i y τ_{AGj} en el i ésimo y j ésimo nivel.

$(\beta\tau)_{TDi,l}$ = efecto de la interacción entre β_i y TDI_l en el i ésimo y l ésimo nivel

5)

(TAG*TD)il = efecto de la interacción entre TAG y TD en el iésimo y lésimo nivel.

e ijkl = error experimental

$$PAI_{ijkl} = \mu + GL_i + TAG_j + TEQ_k + TD_l + (GL*TEQ)_{ik} + (GL*TD)_{il} + (TAG*TEQ)_{jk} + (TEQ*TD)_{kl} + e_{ijkl}$$

En donde:

PAI_{ijkl} = porcentaje de acrosomas intactos al descongelado

μ = media general para todas las observaciones

GL_i = efecto fijo del glicerol en el iésimo tratamiento

TAG_j = efecto fijo de la temperatura de agregado del glicerol en el jésimo nivel

TEQ_k = efecto fijo del tiempo de equilibrio en el késimo nivel

TD_l = efecto fijo de la temperatura de descongelación en el lésimo nivel

(GL*TEQ)_{ik} = efecto de la interacción entre GL y TEQ en el iésimo y késimo nivel

(GL*TD)il = efecto de la interacción entre GL y TD en el iésimo y lésimo nivel

(TAG*TEQ)jk = efecto de la interacción entre TAG y TEQ en el jésimo y késimo nivel

(TEQ*TD)kl = efecto de la interacción entre TEQ y TD en el késimo y lésimo nivel

e ijkl = error experimental

4.3 SEGUNDO EXPERIMENTO.

Se congeló semen obtenido por VA, de 2 carneros . Los evoculados fueron evaluados y diluidos en el mismo diluyente utilizada en el experimento anterior y se

utilizaron los niveles que resultaron superiores en el mismo: 3% de GL, 50 de TAG, 4 horas de TEG y 750/8 seg. de FD. Se empleó la misma tasa de refrigeración (2 horas) y el mismo método de congelación que en el experimento anterior. El semen se envasó en pajillas francesas de 0.5 ml y el número de espermatozoides por dosis fue 300 millones de espermatozoides móviles al momento de la congelación.

Se utilizaron 105 ovejas de la raza Rambouillet, primíparas (57%) y de primer parto (43%) las que se encontraban en un régimen de estabulación completa. Estas ovejas pertenecían al programa Merino de la Dirección de Normatividad Pecuaria, SARN, y estaban ubicados en Ajuchitlán, Gro. Para la detección de culores se utilizaron dos machos adultos vasectomizados, producto de la cruce Corriedale x Pelibuey.

El experimento se llevó a cabo durante los meses de setiembre y octubre de 1983. Se procedió a detectar culores por una persona entrenada, a las 7 de la mañana y a las 5 de la tarde. Los tratamientos empleados se eligieron considerando que son las dos metodologías más frecuentemente utilizadas para la IA con semen fresco y congelado en ovinos. A medida que las ovejas iban saliendo en calor fueron asignadas al grupo a uno de los siguientes tratamientos:

- IA con semen fresco no diluido (n = 52). Estas ovejas eran inseminadas 10 o 12 horas después de detectado el estro con semen recién colectado de los mismos sementales a los cuales se les había congelado semen para utilizarlo en este experimento. La dosis utilizada fue de aproximadamente 100 millones de espermatozoides móviles en un volumen de 0.4 ml. Como pipeta de IA se utilizó una pipeta de vidrio estéril de 1 ml graduada en décimos de ml.

- IA con semen congelado (n = 83). A estas ovejas se les inseminó a los 10-12 y 24 horas después de detectado el calor con una dosis de semen congelado en cada oportunidad.

Para ello se utilizó un aplicador universal de pajillas.

La técnica de IA utilizado en ambos tratamientos fue la pericervical (Durán del Campo, 1980). Se utilizó un vaginoscopio con luz incluida para localizar el orificio externo del cérvix. Las ovejas eran colocadas de tal manera que el tren posterior quedaba levantado con respecto al anterior. Cinco meses después se registraron los partos.

Se evaluó el porcentaje de parición (ovejas paridas/ovejas servidas) a primer servicio. Los datos fueron evaluados por la prueba de Chi cuadrado (Steel y Torrie, 1980).

V. RESULTADOS:

5.1. Experimento 1:

En los cuadros 1, 2, 3 y 4 se resumen los resultados de los análisis generales de varianza para los modelos utilizados y para las dos variables dependientes analizadas. En los cuadros 1 y 3 se observa que los modelos analizados tanto para actividad progresiva al descongelado (MPD) como para el porcentaje de acrosomas intactos (PAI) fueron altamente significativos ($P < 0.0001$). Los coeficientes de determinación fueron de .58 y .59 para los modelos de MPD y PAI, respectivamente.

En el cuadro 5 se resumen las correlaciones más importante entre las variables incluidas en el experimento. Aunque la actividad del semen fresco estuvo correlacionado significativamente con el porcentaje de acrosomas intactos en el semen fresco, con la MPD, y las dos variables transformadas, no se incluyen en el cuadro debido a que todas ellas presentan coeficientes de correlación bajos (menores a .4). Los niveles de glicerol (G) estuvieron correlacionados significativamente y en forma negativa con la actividad (S <0.0001) y la integridad acrosómica (P <0.0001), tanto en el semen fresco como en el descongelado. La temperatura de agregado del glicerol (TAG) estuvo correlacionado significativamente con el tiempo de equilibrio (TES) (P <0.0001), la MPD (P <0.0001) y el PAI (.001). El tiempo de equilibrio (TEQ), se encontró correlacionado positivamente con la MPD (P <0.0001) y el PAI (.0001). La temperatura de descongelación (TD) también estuvo correlacionada significativamente con MPD (P <0.0001) y PAI (.0001).

además, se encontró una alta correlación positiva entre MPD y PAI (.71, $P < 0.001$).

En los cuadros 4 y 7 se observan los resultados de motilidad progresiva del semen descongelado (MPD) y del porcentaje de acrosomas intactos (PAI) del semen descongelado, para el efecto de los tres niveles de glicerol utilizados en el experimento. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre todos los niveles y para las dos variables estudiadas. A medida que el porcentaje de glicerol aumentó (3, 6 y 9%) la MPD y el PAI disminuyeron (26.3, 26.3, 17.6 y 35.2, 33.5, 19.5%).

La temperatura a la que se agregó la fracción glicerolada del diluyente (TAS) influyó significativamente ($P < 0.001$) sobre la MPD pero no afectó el PAI ($P > 0.05$) (cuadros 8 y 9). Los muestras a las que se les agregó el glicerol a 15°C tuvieron mejor ($P < 0.05$) recuperación de motilidad (35.4%) que a las que se les agregó el glicerol a 5°C (22.2%), aunque la diferencia entre las medias fue solo de 2.7%.

El tiempo de equilibrio (TEQ) determinó diferencias estadísticamente significativas entre los tres niveles utilizados, tanto para MPD ($P < 0.001$) como para PAI (.0001) (cuadros 10 y 11). Los mejores resultados (33.09 y 33.02% para MPD y PAI, respectivamente) se obtuvieron con 4 horas de TEQ ($P < 0.05$) y las muestras tratadas con 2 horas de TEQ tuvieron significativamente mejores ($P < 0.05$) MPD y PAI (35.09 y 30.26%, respectivamente) que las muestras que fueron procesadas sin TEQ (19.64 y 23.75%, respectivamente).

La temperatura de descongelación (TD) también ocasionó resultados estadísticamente diferentes para las dos variables de respuesta (cuadros 12 y 13). Cuanto más rápida fue la descongelación mejor fue la recuperación espermática. Los resultados obtenidos

descongelando a 75°C durante 8 segundos (31.41 y 39.34 % para MPD y PAI, respectivamente) fueron significativamente superiores ($P < 0.001$) a los observados cuando las muestras se descongelaron a 35°C durante 30 segundos (26.09 y 32.66%) o a 50°C durante 3 minutos (15.68 y 18.93%). Con esta última temperatura de descongelación se obtuvo menor recuperación ($P < 0.001$) de la MPD y el PAI que con la descongelación en agua a 35°C. Las diferencias entre las medias de MPD y PAI para las TD de 5 y 350 fueron mayores que para las medias correspondientes a 35 y 750.

Del cuadro 2 se desprende que para el modelo utilizado para la MPD, fueron significativas las siguientes interacciones: nivel de glicerol por temperatura de agregado del glicerol (GL * TAG) ($P < 0.05$); temperatura de agregado de glicerol por temperatura de descongelación (TAG * TD: ($P < 0.001$); nivel de glicerol por temperatura de descongelación (GL * TD) ($P < 0.05$).

En el gráfico I puede observarse la relación entre GL*TAG para MPD. A medida que se incrementó el porcentaje de glicerol la diferencia de MPD entre las dos TAG fue mayor.

En el gráfico II puede apreciarse que la diferencia de la MPD debida a la TD fue menor a medida que se incrementó el porcentaje de glicerol.

La interacción TAG*TD se puede observar en el gráfico III. La diferencia de MPD entre las dos TAG se incrementó a medida que la TD aumentó.

Cuando se consideró el PAI como variable de respuesta (cuadro 4) se obtuvieron cuatro interacciones estadísticamente significativas para el modelo aplicado: nivel de glicerol por tiempo de equilibrio (GL * TEG) ($P < 0.001$); nivel de glicerol por temperatura de descongelación (GL * TD) ($P < 0.001$);

temperatura de agotamiento de glicerol por tiempo de equilibrio (TAB * TEO) ($P < .05$) y tiempo de equilibrio por temperatura de descongelación (TEO * TD) ($P < .01$).

El efecto significativo de la interacción GL*TD (gráfica IV) indica que a medida que se aumentó el porcentaje de GL, las diferencias de PAI debidas a los distintas temperaturas de descongelación, disminuyeron.

La interacción GL*TEO (gráfica V) es más compleja en su interpretación que las que se han descrito anteriormente en este texto. Cuando se agregó 3% de GL no se observaron diferencias de PAI entre 2 y 4 h de TEO, pero los resultados obtenidos fueron significativamente mejores a los del tratamiento TEO = 0 h. Cuando se utilizó el diluyente con 6% de GL los resultados fueron superiores con 4 h de TEO que con 2 h, y estos mejores o cuando no se utilizó tiempo de equilibrio, mientras que cuando el diluyente tenía 9% de GL las diferencias de PAI para 2 y 4 h de TEO volvieron a ser menores y ambas mejores que cuando no se usó tiempo de equilibrio. Cabe mencionar que la tendencia que sigue la variable es similar cuando no se utilizó tiempo de equilibrio a este era de 2 h. En estos tratamientos el PAI disminuyó a medida que se aumentó el porcentaje de glicerol en el diluyente. Sin embargo, cuando se utilizó 4 horas de tiempo de equilibrio, el PAI aumentó cuando el diluyente tenía 6% de glicerol comparado cuando tenía 3%, aunque los resultados con este nivel de crioprotector fueron mejores que con 9% del mismo nivel que en los otros tiempos de equilibrio.

A pesar de que no hubo efecto estadísticamente significativo de la TAB sobre el PAI ($P > .05$), se encontró significancia en la interacción TAB*TEO (gráfica VI). Cuando se utilizó 2 h de TEO, el PAI fue superior con 35°C de TAB, mientras que con 4 h de TEO, 5°C de TAB determinaron superior PAI que 35°C.

En la gráfica VII se esquematiza el efecto de la interacción TEO*TD para el PAI. Puede advertirse una tendencia a que aumenten las diferencias de PAI debidas a la TD, a medida que se incrementó el TEO.

5.3. Experimento 2.

En el cuadro 14 se observan los resultados obtenidos en el experimento de campo de Inseminación Artificial. Con semen fresco se obtuvieron 28 partos de un total de 54 ovejas servidas (54%), mientras que de los 53 ovejas inseminadas con semen congelado, parieron 17 (32%). El análisis estadístico (Chi cuadrada) indicó que el tratamiento afectó significativamente ($P < 0.05$) los resultados de parto.

VI. DISCUSION

Del estudio de las correlaciones (cuadro 5) entre las distintas variables que se incluyeron en el experimento se pueden sacar las siguientes conclusiones: las correlaciones entre MPB y APBF (la correspondiente transformación ARCOSENO) y entre PAI y PAIT fueron de .92 y .89 respectivamente. Por dicho motivo se consideró que no se obtendría ninguna ventaja al analizar a los datos transformados, y sólo se utilizaron los valores sin transformar.

La correlación entre MPB y PAI fue de .72 por lo que puede considerarse que son buenos estimadores entre sí y que por lo tanto ya el PAI es un buen estimador de la fertilidad de una muestra de semen (Robbins, Soacke y Chandler, 1976), la MPB será también un estimador aceptable.

Por otra parte, la correlación entre la motilidad progresiva y el porcentaje de acrosomas intactos del semen fresco fue muy baja (.07), por lo que no son buenos estimadores entre sí. Además estas variables presentaron correlaciones muy bajas con los correspondientes evaluaciones en el semen descongelado. Por lo que no se podrían hacer estimaciones confiables de la recuperación espermática postdescongelado, en base a la información obtenida de la evaluación del semen fresco.

Los resultados obtenidos con los niveles de glicerol utilizados pueden observarse en los cuadros 6 y 7. La mayoría de la literatura revisada coincide con

los resultados de este experimento. Parece que para el semen ovino, niveles mayores de 3 o 4 % de glicerol son perjudiciales, mientras que para el semen bovino los niveles requeridos serían mayores (de 7 a 8%). Sin embargo, los resultados obtenidos en los experimentos citados presentan algunas variaciones. Sahn y Roy (1972) trabajaron los mismos tres niveles de glicerol que en este experimento y no encontraron diferencias estadísticamente significativas, mientras que los resultados obtenidos por Visser (1974a) coinciden con los hallados en este trabajo. Este investigador obtuvo una recuperación espermática superior con 2 o 4 % que con 8 % de glicerol. Pero, Celis (1975), First (1961), y Nelson et al (1985), coinciden en que 2 % de glicerol es insuficiente para obtener una recuperación espermática tan buena o superior a la que obtuvieron con 4 %. Los resultados obtenidos en este experimento con 3 % hacen pensar en que este sería el nivel óptimo en las condiciones empleadas en el mismo. De todas formas sería interesante realizar un experimento comparando distintos niveles entre 2 y 4 % de glicerol.

Debe considerarse además, que hay una fuerte influencia de otros factores tales como: tipo de diluyente utilizado, velocidad de congelación, temperatura de descongelación, tiempo de equilibrio, etc. En el experimento se encontraron significativas las siguientes interacciones en que participa el GL: GL*TAG y GL*TB para SPB, y GL*TEO y GL*TB para PÁL. La primera de estas interacciones (gráfica 1) indica que con 50 de T&S se hace aun mas prove el efecto del incremento del porcentaje de glicerol en el diluyente. Los mejores resultados de motilidad progresiva postdescongelado se obtuvieron con niveles de 3% de glicerol agregados a 35C. Por otra parte debido a esta interacción los resultados obtenidos con 5 % de GL y 35C, son similares a los que se obtuvieron con 3% de GL y 50 (27.7 y 27.5 % respectivamente).

El efecto de la interacción GL*TB determinó que las diferencias entre las 3 TB fueran mayores para 3 y 6 % de GL que para 9 %. Sin embargo el efecto de la TB es tan importante que con 750 se obtuvo mayor MPD tanto para 3 como para 6 % que con 350 y 3 % (gráfica 11). La gráfica para esta misma interacción pero para PAl (gráfica 4) es muy parecida, aunque las diferencias del PAl a 3 y 6 % de GL y a un mismo nivel de TB solo son significativas a 350. Con 9 % de GL las diferencias del PAl entre las 3 temperaturas son menores que las que se observan en los otros 2 niveles de GL pero la caída del PAl entre 6 y 9 % de GL es muy marcada. En las tres interacciones analizadas hasta este punto los mejores resultados se obtuvieron de acuerdo con los efectos principales de las variables estudiadas. Para el caso de la interacción GL*TEG considerando como variable de respuesta al PAl (gráfica 12) se obtuvo el mejor resultado con 6 % de GL y 4 horas de TEG. Sin embargo este efecto de incremento del PAl entre 3 y 6 %, no se observó para 0 y 2 horas de TEG. Sería conveniente profundizar la investigación sobre este punto diseñando un experimento especialmente para estudiar los efectos del TEG y el GL sobre el PAl.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los PAl al agregar la fracción glicerolada del disolvente a 50 o a 350 (29.35 y 31.75% respectivamente; ver cuadro 4). Estos resultados coinciden con los de Foote (1970 a y b) con semen de toro y comparando la fertilidad obtenida con semen procesado en las dos formas. En lo que se refiere a MPD hubo una pequeña diferencia a favor de 300 (26.94 contra 22.70%; ver cuadro 3). Sin embargo los resultados de PAl y la magnitud de la diferencia de la MPD, hacen pensar en que es poco probable que hubiera diferencias en la fertilidad, utilizando ambos métodos.

Varios autores publicaron buenos resultados agregando el glicerol a 300 en semen ovino diluido en

Tris y congelado en forma de pellets (Maxwell et al. 1977; Salomon, 1977; Fukui, 1979). Otros autores como Colas (1975) y Feredean y Bragaru (1983) obtuvieron mejores resultados agregando el glicerol al semen refrigerado que al semen a temperatura ambiente.

La interacción TAG*TD para MPD (gráfica 3) indica que la diferencia entre los dos niveles de TAG es mayor a 750 y especialmente a 350 de TD. En la gráfica puede advertirse claramente que la magnitud del efecto de la TD es mucho mayor que el de la TAG.

La interacción TAG*TEO para PAI (gráfica 6) tiene una interpretación un poco más compleja. Para TEO = 2 horas los PAI para 30 y 350 de TAG (34.5 y 31.2 % respectivamente) no fueron estadísticamente significativos, pero con TEO de 4 horas y TAG de 30 se obtuvo un PAI (33.6%) estadísticamente superior (P<.05) al que se obtuvo con 4 horas de TEO y 350 de TAG (32.2%). Como conclusión puede decirse que el mejor resultado se obtiene con 4 horas de TEO y 30 de TAG. Esto no está de acuerdo con los resultados de MPD obtenidos para TAG pero sí coincide con mucho de la literatura publicada sobre el tema (Colas, 1975; Feredean y Bragaru, 1983).

Los tres niveles de TEO utilizados (0, 2 y 4 horas) ocasionaron diferencias significativas tanto para la MPD como para el PAI. Los resultados fueron superiores a medida que se aumentó el TEO (31.25 y 26% para MPD y 23.6, 30.9 y 33% para PAI).

El TEO óptimo varía mucho de un experimento a otro y esto podría explicarse por las múltiples interacciones entre el TEO y otras variables incluidas en los diluyentes o en la técnica de congelación (Abraham, Deeba y Face, 1979).

Algunos autores no encontraron diferencias entre distintos tratamientos de TEO. Tal es el caso de Sahni

y Roy (1972) que no encontraron diferencias de recuperación espermática para tratamientos de 1 y de 6 horas. Coias (1975) tampoco obtuvo diferencias entre 25 y 150 minutos.

En la gráfica 7 se esquematiza el efecto de la interacción entre TEG y TI para PAI. Puede advertirse una tendencia a que las diferencias entre los PAI para las tres TI estudiadas se incrementen a medida de que aumenta el TEG. El efecto de esta interacción no aporta mayor información a la que se discutió sobre los efectos principales de las dos variables en cuestión.

A medida de que se incrementó la temperatura de descongelación, los resultados tanto de MPB como de PAI fueron superiores. Estos datos coinciden con la mayoría de la literatura publicada sobre el tema, tanto en equinos como en bovinos. Para definir una temperatura de descongelación óptima, también debe considerarse que en el experimento se encontraron efectos estadísticamente significativos para las interacciones de TEG x TI y TEG x TI x T, para MPB, y de TEG x TI x T, para PAI. Esto quiere decir que la TI es una variable fuertemente influida por otros factores de la técnica de congelación utilizada.

Coias (1979) también obtuvo resultados superiores con descongelaciones rápidas para plantas que debe considerarse seriamente si los ventajas obtenidos con esta técnica, justifican los riesgos que implican descongelar durante 5 o 10 segundos, a una temperatura a la cual pequeñas variaciones en el tiempo de descongelación pueden provocar daños irreversibles en la sobrevivencia espermática.

Cabe destacar que si bien existieron varias interacciones significativas, estas no invalidan el efecto de los factores principales, ya que salvo en un

caso, en las demás interacciones se mantuvo la respuesta relativa entre los efectos principales.

Con respecto a los resultados obtenidos en el segundo experimento, son muchos los autores que publican mejores porcentajes de fertilidad con semen congelado comparado con semen fresco (Visser, 1974b; Graham, Crabo y Pace, 1978). Los trabajos que presentan resultados similares entre semen fresco y congelado generalmente utilizan una técnica de inseminación intruterina (Fuhai, 1977; Fuhai y Roberts, 1978 y 1979) y en este trabajo la técnica utilizada fue la peri-cervical.

Los resultados obtenidos con el semen fresco (54%) son similares a los de Valdés (1987) quienes empleando un metodología similar obtuvieron 47% de perición a primer servicio. Sin embargo, es algo menor a lo encontrada por Martínez y Pérez (1986, datos no publicados) quienes obtuvieron 89% de no retorno al estro a primer servicio. Cabe mencionar que en este último trabajo se utilizó solamente un sesental de muy alta fertilidad, mientras que en los otros dos trabajos se usó más de un macho cuyos fertilidades no eran totalmente conocidas. También son similares a los obtenidos por Trejo et al (1986). Es interesante destacar que la fertilidad obtenida en este tratamiento es similar a lo publicado por Hochán y Pérez (1986) (82.6%) y Rangel y Pérez (1986) (50%) para primer servicio pero con monta natural.

Por otra parte, los resultados obtenidos con semen congelado (32%) están comprendidos entre lo que la literatura internacional publica cuando se utiliza la mismo técnico de inseminación (Visser, 1974b).

VII. CONCLUSIONES

1.- Los mejores resultados de recuperación esperotico medido como MPD y PAI se obtuvieron con el diluyente que contenia 3% de glicerol.

2.- La temperatura a la que se calentó la fracción glicerolada del diluyente afectó a la MPD de forma tal que los mejores resultados se obtuvieron cuando el glicerol se agregó a 35°. Sin embargo las diferencias de MPD para este tratamiento fueron muy bajas (22.7% para 50° y 23.94% para 35°). La TAG no afectó significativamente el PAI, pero los resultados superiores se obtuvieron con 50°.

Sobre esta variable la información analizada no permite definir claramente cual es el tratamiento más adecuado, pero sí se puede concluir que no hoy inconveniente en utilizar 35° como TAG bajo las condiciones empleadas en el experimento.

3.- El tiempo de equilibrio que permitió obtener los mejores resultados tanto de MPD como de PAI fue de 4 horas.

4.- La temperatura de descongelación que determinó los resultados superiores de MPD y PAI fue de 75° durante 8 segundos. La diferencia con 35° / 30seg. no fue muy importante (26 y 31% para MPD, y 33 y 34% para PAI). Por este motivo y considerando el riesgo que significa para el semen la utilización de temperaturas tan elevadas como 75°, sería conveniente recomendar la descongelación a 35° durante 30seg. como la técnica más adecuada para la inseminación a nivel del campo.

3.- El porcentaje de parición obtenido con el semen congelado (32%) si bien está de acuerdo con la mayoría de los trabajos publicados sobre el tema, es bajo. Es necesario seguir investigando para establecer técnicas de procesamiento del semen y de IA que permitan incrementar a estos resultados.

4.- La recuperación embrionaria obtenida en el experimento, estimada por los medios generales de las dos variables estudiadas (MRB = 24% y PBI = 30%) fue baja. En base a la información obtenida con estos experimentos y a la experiencia práctica adquirida, dichas cifras se han ido incrementando en la práctica diaria del laboratorio.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Acemal, J. and K. Andersen, 1968. Freezing of ram semen in straws. VI Cong. Intern. Reared. Anim. Insem. Artif., Paris, II:277.

Abdelnazeem, A., S.H. Tany, and Yassen and M.A. El-Atany, 1978. Ram sperm motility aged in glucose and Tris buffered extenders at 5°C. Alex. J. Agric. Res. 26(2):301.

Acuña, M. 1982. Evaluación de los diluyentes para congelar semen de borrego Felibuey. Tesis de Licenciatura FES-C UN66.

Almqvist, J.O., 1976. Effect of cold shock after thawing on acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in plastic straws. J. Dairy Sci., 59 (10):11625.

Amann, R.P. and R.H. Hemmerstedt, 1980. Validation of a system for computerized measurements of spermatozoal velocity and percentage of motile sperm. Biol. of Reprod., 23:447.

Andersen, K., J. Acemal and J.A. Fouaner, 1973. Intrauterine and cervic cervical insemination with frozen semen in sheep. Eucythia, 8:113.

Ansí, L., J.C. Tapiero, J.H. Ruiz, y M. Abad, 1984. Efecto de la cafeína sobre la motilidad y supervivencia espermatocin del semen descongelado de morueco. 10th Intern. Cong. Anim. Rep. Artif. Inse., II:47.

Austin, J.W.; E.M. Lyon and R.L. Hurdnes. 1961. Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. J. Dairy Sci. 44: 2292.

Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1960. Applied Animal Reproduction. Boston Publishing Company, Inc. Boston, Virginia, USA.

Becker, W.C., P.L. Senger, E.P. Adalseth and C.E. Marshall. 1977. Influence of glycerol levels, diluent and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. J. Anim. Sci. 44(6): 1067.

Benton, R.W., E.H. Fooks, R. Shipman. 1966. Procedure for counting bovine sperm with a hemocytometer, and the calibration and operational use of a photometer to estimate sperm count by optical density. Animal Husbandry Department, Cornell University, Ithaca, N.Y., USA.

Estamante, G.C. y J. Valencia M.. 1991. Acción del sulfóxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de certero durante la congelación. Veterinaria Méx. 19: 211.

Cameron, R.D.A., 1977. Semen collection and evaluation in the ram. Austr. Vet. J. 53:306.

Cochran, R.C.; J.K. Juay; C.F. Parker and D.H. Hallford. 1985. Freezing and post-thaw semen characteristics of five ram breeds collected by electroejaculation. Theriogenology 23 (3): 451.

Colas, G., 1979. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. J. Reprod. Fert. 42:277.

Colas, G., 1979. Fertility in the ewe after artificial insemination with fresh and frozen semen at the induced oestrus, and influence of the photoperiod on the semen quality of the ram. Liv. Prod. Sci. 8: 173.

Colas, G., 1980. Normas internacionales sugeridas para el intercambio de semen ovino. IX Cong. Intern. Reprod. Anim. Inssem. Artif. 2: 287. Madrid.

Colas, G. and Courot. 1977. Production of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in the sheep. Proc. Symp. Management of Reproduction in Sheep and Goats, University of Wisconsin, Madison.

Colas, G. and Courot, 1979. Storage of ram semen. En: Sheep Breeding, Ed.: G.L. Tomes, D.E. Robertson y R.J. Lightfoot, Butterworths, Second Edition.

Colas, G., L. Duzier, M. Courot, S. Ortavant, J.P. Sagnoret. 1968. Résultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'insémination artificielle ovine. Ann. Zootech., 17 (1):47.

Contró, F.P., 1985. Evaluación de semen de ovinos de raza Merino Australiano en el periodo de transición entre la etapa reproductiva y la no reproductiva en el Estado de Querétaro. Tesis ITESM CO.

Cunns, F.T., B. McGowan, D.F. Hoimo, A.R. Beeden and W.C. Weir, 1960. Seasonal changes in the semen of rams. J. Anim. Sci. 19:208.

Maeder, A.H. and A. Tabu, 1984. Survival rate of ram spermatozoa supplemented with prostaglandin. X Cong. Intern. Reprod. Ins. Actif. Univ. Illinois, Urbana-Champaign, EUA.

De Abreu, R.M. & W.E. Sernatson, Scl. Smith and B.W. Pickett, 1979. Effect of post-thaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in french straws. J. Dairy Sci. 62:1449.

Dimov, M. and G. Georgiev, 1977. Ram semen prostaglandin concentration and its effect on fertility. J. Anim Sci. 44(4): 1050.

Jurán del Campo, A., 1980. Anatomía, fisiología de la reproducción e inseminación artificial en ovinos. Editorial Hemisferio Sur, Montevideo, Uruguay.

Drink, P.J., J.W. Lewis, E.F. Graham and R.H. Boyer, 1972. Comparison between natural service and artificial insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe. J. Anim. Sci. 35(3): 573.

Elliot, F.J. (1978). Semen evaluation, en: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle, Ed. Salisbury, Van Bemark and Lodge, second edition, Freeman and Company, San Francisco.

Elliot, F.J., J.M. Sherman, K.J. Elliot, J.S. Sullivan, 1973. A photographic method of measuring percentage of progressively motile sperm cells using dark-field microscopy. VIII International Symp. on Zootechny, Milan, Italy.

Entwistle, K.W. and I.C.A. Martin. 1972a. Effects of the number of spermatozoa and of volume of

diluted semen on fertility in the ewe. Aust. J. Agric. Res. 23:467.

Entwistle, K.W. and L. de Maestra. 1972. Effects of composition of diluent, method of addition of glycerol, freezing rate, and storage temperature on the revival of ram spermatozoa after deep freezing. Aust. J. Biol. Sci. 25:379.

Feredean, T., and F. Bogaru. 1963. The preservation of ram semen by freezing to -79°C . A.R.A. 33, 1377.

First, N.L., H.A. Henniman, W.F. Hedges, and J.A. Williams. 1961. The frozen storage of ram semen. J. Anim. Sci. 20:174.

Fiser, P.S., J. Ainsworth and R.W. Fairfull, 1982. Cryosurvival of ram spermatozoa in hypertonic and isotonic diluents. Can. J. Animal Sci. 62:425.

Fiser, P.S. and T.S. Beten. 1984. Effect of equilibration time at 5°C and photoperiod on survival of ram spermatozoa frozen in straws. Can. J. Anim. Sci. 64(3): 777.

Fiser, P.S. and R.W. Fairfull. 1983. Influence of glycerol concentration and cooling rate on survival of ram sperm frozen in straws. Cryobiology 20, Abs. 20th annual meeting: 160.

Fiser, P.S. and Fairfull, 1984. Combined effects of glycerol concentration, cooling velocity, and osmolality of skim milk diluents on cryopreservation of ram spermatozoa. Theriogenology 25(3):473.

Foote, R.H., 1970. Fertility of bull semen at high extension rates in trip-buffered extenders. J. Dairy Sci. 53 (10): 1475.

Foote, R.H., 1970b. Influence of extender, extension rate, and glycerolating technique on fertility of frozen bull semen. *J. Dairy Sci.* 53(10): 1478.

Foote, R.H., 1974. Artificial insemination, and Reproduction in Farm Animals. Ed. E.G.E. Hafez, Lea and Febiger, Philadelphia.

Foote, R.H., 1978. Extenders and extension of unfrozen semen. in: *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, Ed. Salisbury, VanDemark and Loose, second edition, Freeman and Company, San Francisco.

Forde, K. K. Gray, 1974. A uniform method of thawing frozen semen. *A.R.A.* 42 (9).

Fukui, Y., 1977. Effect of non-surgical intra-uterine insemination on fertility at first estrus synchronized with Prostaglandin F2 alfa. *Japan J. Anim. Reprod.* 23(3): 116.

Fukui, Y., 1979. Effects of different diluents, thawing temperatures and materials of thawing containers on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Japan J. Anim. Reprod.* 25:160.

Fukui, Y. and E.M. Roberts, 1977a. Repeatability of non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. *Theriogenology* 8 (2-3): 77.

Fukui, Y. and E.M. Roberts, 1977b. Sperm transport after non-surgical intrauterine insemination with frozen semen in ewes treated with prostaglandin F-2 alfa. *J. Reprod. Fert.* 51: 141.

Fukui, Y. and E.M. Roberts, 1978. Further studies on non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. Theriogenology 10(5): 381.

Fukui, Y. and E.A. Roberts, 1979. Fertility after non-surgical intrauterine insemination with frozen-pelleted semen in ewes treated with prostaglandin F2 alpha on Sheep Breeding, Ed. G.L. Towner, D.E. Robertson and S.J. Lightfoot, Butterworths, 533.

Gaial, M.S.E., El-Gemal, A., Abou-Haga and M.A. El-Fouly, 1978. Male reproductive characteristics of Merino and Usadmi sheep and their crosses. Anim. Prod. 27: 261.

Graham, E.F., A.K.L. Schmehl, R. Beccaria and R.G. Crabo, 1976. Laboratory and fertility results with frozen ram semen. Scientific Journal Series Paper No. 6893. Minnesota Agricultural Experiment Station.

Graham, E.F., R.G. Crabo and M.M. Pace, 1978. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci. 47 Suppl. II: 80.

Gustafsson, B.K., 1972. Aspects of fertility with frozen-thawed ram semen. Cryobiology 15: 358.

Hackett, A.J., E.N. Incheep, H. Robertson, J.W. S. Shrestha and R.S. Malinetz, 1979. Comparison of artificial insemination and natural mating on reproductive performance of five strains of sheep during the oestrous season in an intensive system. Can. J. Anim. Sci., 59: 675.

Healey, P. Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. *J. Reprod. Fert.* 1949 19: 21.

Hernandez, J.J., D.R. Rodriguez, E. Gonzalez P., 1974. Evaluación de cuatro métodos para colección de semen en borrego Tabasco o Pelibuey. *Ins. Pec. Mex.*

Johnson, L., 1974. Optima of glycerol, time and thaw rate in freezing ram semen. *J. Anim. Sci.* 39: 213.

Jones, R.C., 1969a. Studies of the suitability of preparations of ewe and cow milk for storing ram spermatozoa at 37.5 and -79°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 983.

Jones, R.C., 1969b. Influence of diluents and processing times after ejaculation on the survival of deep-frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* 22: 995.

Jones, R.C. and T. Mann, 1977. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. *J. Reprod. Fert.* 50: 241.

Kristinsson, G., and H. Wibbenf, 1985. Fou der cervix uteri und Verlauf des canalis cervicis uteri beim schaf. *Tierärzt. Prax.* 13: 299.

Langford, G.A., G.J. Marcus, A.J. Hockett, L. Hinsworth, M.S. Welynetz and H.F. Peters, 1979. A comparison of fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 59: 405.

Lightfoot, R.W. and S. Salomon, 1969. Freezing ram spermatozoa by the pellet method. II. The effects of method of dilution, dilution rate, glycerol

concentration, and duration of storage at 5°C prior to freezing on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci., 22: 1947.

Lichtfoot, R.J. and S. Salomon, 1970. Fertility of ram spermatozoa frozen by the pellet method. I. Transport and viability of spermatozoa in the genital tract of the ewe. J. Reprod. Fert., 22: 381.

Lillo, A., 1984. Lambing rates after single inseminations of ewes with liquid or deep-frozen semen. X Cong. Intern. Reprod. Anim. Ins. Artif. Univ. Illinois, Urbana-Champaign, EUA.

Linge, F., 1972. Field trials with frozen semen. A.B.A. 41, 1879.

López, A., R. Pérez, E. Sosa y C. Marquez, 1986. Evaluación de las características espermáticas de carneros de raza Merino Australiano en el Estado de Querétaro. X Reunión de ALPA, Acapulco, Guerrero.

López, G.A.F. y H.Z. Valencia, 1982. Técnica descriptiva de la colección, evaluación, y congelación de semen del certero Pelibuey. VIII Congreso Nacional de Genética, Veracruz, México.

Lu Zhao-qi, Li Miao-qi, Wu-Miao, Guo Xiao-hui, Liu Yun-xing, Guan Xiao-ling, Song Tian-shan y Xia Luo-zuo, 1982. Electron microscopic and biochemical methods used to evaluate the quality of frozen ram semen. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 12(4): 341.

Norley, P.R., S.R. Morris and I.G. White, 1977. Concentration of prostaglandins E and F, fructose and glycerylphosphorylcholine in ram semen obtained by electro-ejaculation or artificial

vagina and in vesicular fluid. *Theriogenology* 8(1): 33.

Mattos, R., A.R. Guzman, J. Neves. 1985. Effect of different cryobiological factors on quality and fertility of frozen ram semen. *A.B.A.* 53(6): 3483.

Maxwell, W.M.C.. 1984a. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 301.

Maxwell, W.M.C.. 1984b. Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronised oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 10: 309.

Maxwell, W.M.C., R.H. Cannon, D.H. Logue and H.C.S. Koen. 1980. Fertility of ewes following artificial insemination with semen frozen in pellets or straws. a preliminary report. *Theriogenology*

Mayer, P.. 1980. Fundamental aspects of the freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos. *Proc. 9th Conf. Anim. Reprod. Artif. Ins.*, Madrid, España, Vol.

McElwee, M.A.C., J.J. Robinson and R.P. Aitken. 1985. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. *Theriogenology*, 23 (5):519.

Monson, R.A., B.N. Gustafsson, G.F. Graham and B.G. Crobe. 1980. Influence of prostaglandins on acrosome morphology of ram spermatozoa. *Proc. 9th Intern. Cong. on Anim. Reprod. and A.I.*, Madrid, España, Vol.3

Hemen, M.A., P.K. Gustafsson, G.F. Graham and E.G. Crabo, 1984. Effects of prostaglandin supplementation on frozen thawed ram spermatozoa. Proc. 10th Int. Cong. Anim. Rep. Artif. Ins., Urbana-Champaign, U.S.A., Abs. 201.

Hickelson, W.P., L.G. Poole and J.J. Bohmen, 1981. The effect of scrotal circumference, sperm motility and morphology in the ram on conception rates and lambing percentage in the ewe. Theriogenology 16(1): 53.

Nelson, E.A., T.C. Liu, E.J. Fonda and E.A. Cogger, 1985. The effect of freezing rate, glycerol level and equilibration time on motility and GGT release of frozen ram semen. Proceedings of American Soc. Anim. Sci. and Canadian Soc. Anim. Sci. 36: 761.

Ott, R.S., M.A. Mason, 1980. Sheep and goat manual. Society for Theriogenology.

Pace, M.M. and E.F. Graham, 1974. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. J. Anim. Sci. 39(6): 1144.

Parker, G.W. and C.J. Theobald, 1972. The effects of under nutrition on libido and semen quality in adult Merino rams. Aust. J. Agric. Res. 23: 109.

Patt, J. A. Jr. and J. Nath, (1989). Effect of diluents equilibration time and freezing rates on the storage of ram semen. Cryobiology 5: 6.

Perez, R. y A. Lopez, 1984. Inseminación artificial en ovinos. Memorias del curso bases de la cría ovina, UASH Toluca, Mexico. 52.

Pickett, B.W. and W.E. Berndtson, 1976. Principles and techniques of freezing spermatozoa, en

Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle, Ed. Salisbury, Vandalia, Lodge, 2nd. edition- Freeman and Company, San Francisco.

Quinn, P.J., T.G. White and K.W. Cleland, 1967. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing, cold shock and freezing. J. Reprod. Fert. 18: 209.

Ramos, G.R.d.: A. Tejeda G., 1986. Comparación entre métodos de microscopía óptica y microscopía electrónica para determinar anomalías cromosómicas en semen congelado de carnero. Reunión de Investigación Pecuaria en México 173.

Rangel F.O. y R. Pérez C., 1986. Resultados de un empadre en el mes de febrero de ovasas Corriedale en el estado de Querétaro. Memorias de la Primera Reunión de Investigación, FEZ-Quantitlan- UNAM, México.

Rienn, G.S., 1984. Some similarities and differences of female sheep and goat reproduction. N. Hong. Intern. Reprod. Ins. Artif., Urbana-Champaign, EUA.

Robertson, L. and P.F. Watson, 1984. Calcium transport in diluted or cooled ram semen. J. Reprod. Fert. 27: 177.

Robbins, R.K., E.S. Saecke and P.T. Chandler, 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on seasonal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. J. Anim. Sci. 42 (1):145.

Rochin, G. y R. Pérez C., 1986. Empadre de un rebaño ovino Corriedale en el estado de Querétaro

durante el mes de mayo, Memoria del IX Reunión de Investigación Pecuario en México, México.

Rodriguez, G.L., W.H. Herderson and B.W. Pickett, 1975. Effects of rates of freezing, thawing and level of glycerol on the survival of bovine spermatozoa in straws. *J. Anim. Sci.*, 41 (1):129.

Sahni, K.L. and A. Roy, 1972. A study on the effect of deep-freezing (-79°C) on post-thawing revival of sheep and goat spermatozoa. *Indian J. Anim. Sci.* 42 (2): 102.

Sahni, K.L. and S.K. Tiwari, 1974. Artificial insemination of sheep with diluted and stored semen in milk diluents. *Anim. Breed. Abst.*, 42(2).

Salaman, S., 1967. Observations on fertility of ram semen frozen by different methods. *Aust. J. Exp. Agric. and Anim. Husband.* 7: 559.

Salaman, S., 1970. The survival of ram spermatozoa following pellet freezing below -79°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 459.

Salaman, S., 1976. Artificial insemination of sheep. Department of Animal Husbandry, University of Sydney.

Salaman, S., 1977. Fertility following deposition of equal numbers of frozen-thawed ram spermatozoa by single and double insemination. *Aust. J. Agric. Res.* 28: 477.

Salaman, S., G. Evans and M.H.C. Maxwell, 1986. Fertility of Merino ram semen frozen-stored for 16 years. Segunda Conferencia Mundial del Merino. Madrid: 52.

Salomon, S. and R. J. Lightfoot, 1969. Freezing ram spermatozoa by the pellet method, I Effect of diluent composition on survival of spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 22: 1537.

Salomon, S., W.H.C. Maxwell and J.H. Firth, 1977. Fertilizing capacity of ram spermatozoa stored at 5°C. Theriogenology 8(4): 260.

Salomon, S. and G. Visser, 1973. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. Aust. J. Biol. Sci. 26: 505.

Salomon, S. and B. Visser, 1974. Fertility of ram spermatozoa frozen-stored for 5 years. J. Reprod. Fert. 37: 433.

Schonbacher, B.D., 1977. Increased lamb production with rams exposed to short day lengths during the non breeding season. J. Anim. Sci. 49: 927.

Songer, P.L., M.C. Becker and J.K. Hillers, 1976. Effect of thawing rate and post-thaw temperature on motility and acrosomal maintenance in bovine semen frozen in plastic straws. J. Anim. Sci., 42 (4):933.

Shrestha, J.N.B.; P.S. Fisher; G.A. Longford and D.P. Heaney, 1983. Influence of breed, birth date, age, and body weight on testicular measurements of growing rams maintained in a controlled environment. Can. J. Anim. Sci. 63: 835.

Sorenson, A.W., 1979. Animal Reproduction, Principles and Practices, Ed. McGraw - Hill Inc.

Steel, F.G.G. and J.H. Torrie, 1980. Principles and Procedures of Statistics, A biometrical approach, 2nd Ed. McGraw-Hill Kogakusha, Ltd.

Sullivan, J. J., 1978. Morphology and motility of spermatozoa, en *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, Ed. by Salisbury, Vandemark, Lodge, 2nd. edition, Freeman and Company, San Francisco.

Tesseron, F., P. Amir and H. Schindler, 1977. Acrosome damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. *J. Reprod. Fert.* 51: 461.

Tomkins, T. and M. J. Bryant, 1976. Influence of mating pressure and season on the semen characteristics of rams. *Anim. Prod.* 22: 371.

Trejo, G.A. *Educionalidad del macho ovino. Memorias del curso 'Bases de la Cría Ovina'* UAEM, Toluca, 1954.

Trejo, G.A.; E. Gonzalez P. y C.P. Vazquez, 1984. Actividad reproductiva en machos ovinos en el Estado de México. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Urbana-Champaign, U.S.A. Vol. III: 395.

Trejo, G.A.; Gm. Lopez P.; R. Pizarro C.; E. Sosa G.; C. Sosa F. y C. Vázquez L., 1986. Semen evaluation and Artificial Insemination with Australian Merino rams imported from Australia: 3 years of work. Biennial Conference, Austr. Soc. Anim. Prod., Canberra, Australia.

Valdes, L. J. C., 1977. Evaluación de las tasas de parto en ovejas tratadas con oxitocina como mejorador de la fertilidad en estró sincronizado con prostaglandinas e inseminadas artificialmente. Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Querétaro.

Valencia, J. B., Rorero y S. Fernandez-Soca, 1979. Variaciones estacionales del semen de cornero en Mexico. *Mem. Mex.*, 10: 151.

Vazquez, C.L., 1985. Evolucion de las características espermaticas de corneros Merino Australiano. Tesis. ITESO, C.Oro. Querétaro, Mexico.

Visser, D., 1974a. The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 4: 157.

Visser, D., 1974b. Recent advances in the deep-freeze preservation of ram semen. *S. Afr. J. Anim. Sci.*, 4: 275.

Visser, D. and Salomon, 1973. Fertility of ram spermatozoa frozen in a tris-based diluent. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 513.

Watson, P.F. and I.C.A. Martin, 1972. A comparison of changes in the acrosomes of deep frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 22: 99.

Watson, P.F. and I.C.A. Martin, 1973. The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5 or -196C. *Aust. J. Biol. Sci.*, 26: 932.

Watson, P.F. and I.C.A. Martin, 1976a. Artificial insemination of sheep: the fertility of semen extended in diluents containing egg yolk and inseminated soon after dilution or stored at 5°C for 24 or 48 hours. *Theriogenology* 6(5): 553.

Watson, P.F. and I.C.A. Martin, 1976b. Artificial insemination of sheep: the effect of semen diluents containing egg yolk on the fertility of ram semen. *Theriogenology* 6(5): 559.

Wells, W.E. and Aho, 1970. New technique for assessing scrotoal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy Sci.*, 53 (2): 227.

White, I.G., P. Chow and P.J. Quinn, 1980. Role of phospholipids in protecting spermatozoa from cold shock. *Proceedings from the 9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Madrid Spain, III: 381.*

Zlotarev, S., 1984. Increased efficiency of A.I. of sheep in large-scale sheep farms. *Proceedings of 10th Intern. Cong. Animal Reprod. and Artif. Insemin. Urbana-Champaign, U.S.A.*

CUADRO 1

ANALISIS DE VARIANZA PARA MOTILIDAD PROGRESIVA AL
DESCONGELADO

Fuente	Glicerol	Cuadrado Medio	F	P>F
Modelo	15	,884	153,64	,0001
Error	1784	,006		
Total	1799			

2				
R = ,56		C.V. = 31,09		Media MPD = 24%

CUADRO 2

ANALISIS DE VARIANZA PARA PARA EL PORCENTAJE DE MOTILIDAD
PROGRESIVA DEL SEMEN DESCONGELADO

Fuente	Glicerol	Cuadrado Medio	F	P>F
Glicerol	2	2.02	351.71	**
Temperatura de agregado	1	.78	134.70	**
Tiempo de equilibrio	2	.27	47.05	**
Temperatura de descong.	2	7.84	667.96	**
GL * TAG	2	.02	3.15	*
GL * TD	4	.04	4.07	**
TAG * TD	2	.02	2.94	*
Error	1784	.01		

* : P<.05

** : P<.01

CUADRO 3

ANALISIS DE VARIANZA PARA EL PORCENTAJE DE ACROSOSMAS
INTACTOS DEL SEMEN DESCONGELADO

Fuente	Glicerol	Cuadrado Medio	F	P>F
Modelo	20	1.301	123.88	.0001
Error	1779	.011		
Total	1799			

2

R = .58

C.V. = 33.81

Media MPD = 30.31%

CUADRO 4

ANALISIS DE VARIANZA PARA PARA EL PORCENTAJE DE ACROSOMAS
INTACTOS DEL SEMEN DESCONGELADO

Fuente	Glicerol	Cuadrado Medio	F	F>F
Glicerol	2	4.71	467.64	**
Temperatura de agregado	1	.25	23.77	**
Tiempo de equilibrio	2	.93	88.51	**
Temperatura de descong.	2	6.49	618.37	**
GL * TEQ	4	.07	6.50	**
GL * TI	4	.16	15.58	**
TAG * TEQ	1	.05	4.45	*
TEQ * TI	4	.03	3.01	**
Error	1779	.01		

* : P<.05

** : P<.01

CUADRO 5

COEFICIENTES DE CORRELACION

	TEQ	MPD	PAI	MPDT	PAIT
TAG	.27	.18	.07	.17	.07
GL		-.39	-.43	-.39	-.43
TEQ		.17	.18	.17	.18
TD		.56	.53	.53	.52
MPD			.71	.98	.72
PAI				.69	.99
MPDT					.70

Todas las correlaciones son altamente significativas ($P < .01$)

CUADRO 6

EFFECTO DEL PORCENTAJE DE GLICEROL EN EL DILUYENTE SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN DESCONGELADO

Glicerol (%)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
3	600	28.71 ^a	10.43	36.34
6	600	26.68 ^b	10.66	39.97
9	600	17.79 ^c	10.13	56.92

* medias mínimo cuadráticas.

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<.05).

CUADRO 7

EFFECTO DEL PORCENTAJE DE GLICEROL EN EL DILUYENTE SOBRE EL PORCENTAJE DE ACROSOMAS INTACTOS DEL SEMEN DESCONGELADO

Glicerol (%)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
3	600	36.35 ^a	14.63	40.23
6	600	34.67 ^b	16.35	47.17
9	600	19.91 ^c	10.06	50.52

* medias mínimo cuadráticas.

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<.05).

CUADRO 8

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE AGREGADO DEL GLICEROL (TAG)
SOBRE LA MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN DESCONGELADO

TAG (C)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
5	900	22.70 ^a	11.13	49.05
35	900	26.94 ^b	11.42	42.38

* medias mínimo cuadráticas.
Literales diferentes indican diferencias estadísticamente
significativas (P<.05).

CUADRO 9

EFFECTO DE LA TEMPERERATURA DE AGREGADO DEL GLICEROL (TAG)
SOBRE EL PORCENTAJE DE ACROSOMAS INTACTOS DEL SEMEN
DESCONGELADO

TAG (C)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
5	900	29.35 ^a	15.51	52.84
35	900	31.75 ^a	16.04	50.54

* medias mínimo cuadráticas.
Literales diferentes indican diferencias estadísticamente
significativas (P<.05).

CUADRO 10
EFECTO DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO DEL SEMEN DILUIDO SOBRE LA
MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN DESCONGELADO

TEQ (horas)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
0	600	19.64 ^a	10.38	52.85
2	600	25.08 ^b	11.49	45.82.
4	600	26.08 ^c	11.25	43.13

* medias mínimo cuadráticas.
Literales diferentes indican diferencias estadísticamente
significativas (P<.05).

CUADRO 11
EFECTO DEL TIEMPO DE EQUILIBRIO DEL SEMEN DILUIDO SOBRE EL
PORCENTAJE DE ACROSOMAS INTACTOS DEL SEMEN DESCONGELADO

TEQ (horas)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
0	600	23.75 ^a	12.94	54.48
2	600	30.86 ^b	15.54	50.33
4	600	33.03 ^c	16.36	49.53

* medias mínimo cuadráticas.
Literales diferentes indican diferencias estadísticamente
significativas (P<.05).

CUADRO 12

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE DESCONGELACION SOBRE LA
MOTILIDAD PROGRESIVA DEL SEMEN DESCONGELADO

TD (C/seg)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
5/180	600	15.68 ^a	7.49	47.77
35/ 30	600	26.09 ^b	10.62	40.69
75/ 8	600	31.41 ^c	9.78	31.12

* medias mínimo cuadráticas.

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<.05).

CUADRO 13

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE DESCONGELACION SOBRE EL
PORCENTAJE DE ACROSOMAS INTACTOS DEL SEMEN DESCONGELADO

TD (C/seg)	No. Obs.	Medias * (%)	Desviac. Estandar	Coef. Var.
5/180	600	18.93 ^a	9.41	49.73
35/ 30	600	32.66 ^b	14.41	44.12
75/ 8	600	39.34 ^c	15.28	38.83

* medias mínimo cuadráticas.

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (P<.05).

CUADRO 14

RESULTADOS DE FERTILIDAD OBTENIDOS CON SEMEN FRESCO Y CONGELADO

Tratamiento	No. Obs.	Ovejas paridas No.	%
Semen Fresco	52	28	54 ^a
Semen Congelado	53	17	32 ^b

Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($P < .05$)

RELACION DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

C	Grados centígrados
EF	Electroyacuación
GL	Glicerol
IA	Inseminación artificial
MPD	Motilidad progresiva al descongelado
PAI	Porcentaje de acrosomas intactos
TAG	Temperatura de agregado de la fracción glicerolada
TD	Temperatura de descongelación
TEQ	Tiempo de equilibrio
TES	Acido N-Tris (hidroximetil) metil-2-aminometanosulfónico
TEST	TRIS + TES
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
VA	Vagina artificial