



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

DETERMINACION DE LA TEMPERATURA Y TIEMPO OPTIMOS
PARA LA DESCONGELACION DEL SEMEN DE OVINO

T E S I S

Que para obtener el Título de
Médico Veterinario Zootecnista
p r e s e n t a

ROSA BERTA ANGULO MEJORADA



Asesores

M.V.Z. Antonio Ortiz Hernández
M.V.Z. Deborah Feldman Steele
M.V.Z. Javier Valencia Méndez
M.V.Z. Marcelino Flores del Angel

México, D. F.

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

- I.- RESUMEN.
- II.- INTRODUCCION.
- III.- MATERIAL Y METODOS.
- IV.- RESULTADOS.
- V.- DISCUSION Y CONCLUSION.
- VI.- LITERATURA CITADA.

RESUMEN.

ANGULO MEJORADA ROSA BERTA. Determinación de la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen del ovino (bajo la dirección del M.V.Z. Antonio Ortiz Hernandez, M.V.Z. Deborah Feldman Steele, M.V.Z. Javier Valencia Méndez y M.V.Z. Marcelino Flores del Angel.

El objetivo del presente trabajo fué determinar la temperatura y tiempo óptimos para la descongelación del semen del ovino y su efecto sobre la fertilidad. El experimento se realizó en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria de la Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizó un total de 208 hembras y 13 sementales de las razas Suffolk, Polled Dorset, Tabasco, Finnish Landrace y Hampshire.

El semen se obtuvo por medio de una vagina artificial, se evaluó y se diluyó con el diluyente de Tris, ácido cítrico, fructosa, glicerina y yema de huevo. El semen diluido se congeló en pajillas francesas de 0.25 ml con 300 millones de espermatozoides móviles. Se hizo la detección de calores 2 veces al día, utilizando machos vasectomizados provistos de un mandil. Las hembras que presentaron el celo en la mañana se inseminaron en la tarde y las que lo presentaron en la tarde se inseminaron al día siguiente en la mañana. La descongelación del semen fué realizada sumergiendo las pajillas en agua caliente a 36°C durante 8 segundos ó a 70°C durante 4 segundos.

A la mitad de las 426 pajillas obtenidas de los eyaculados, se les evaluó la recuperación de los espermatozoides al descongelar a las dos diferentes temperaturas y tiempos, observando el movimiento progresivo al microscopio. Las 213 dosis restantes se utilizaron en la inseminación artificial. La inseminación fué intracervical. La determinación de la fertilidad se hizo tomando en cuenta el número de hembras paridas. El análisis estadístico se realizó por medio de la Prueba de Z. Se obtuvo 51.2% de movimiento progresivo en el semen descongelado a 36°C durante 8 segundos y 47.9% en el semen descongelado a 70°C durante 4 segundos, con una fertilidad de 30.7% y 29.2% respectivamente, no habiendo diferencia significativa.

INTRODUCCION.

En los últimos 15 años ha aumentado el interés en el uso de la inseminación artificial (I.A.) en los ovinos, con el fin de mejorar los sistemas de explotación, así como la calidad genética de esta especie (14,18,24). Los métodos tradicionales de la I.A. usados en ovinos con semen fresco, presentan ciertas limitantes, como son el utilizar un carnero el cual se encuentra en lugares lejanos a las hembras, siendo necesario llevar al macho al lugar donde se localizan las hembras o viceversa, limitando de esta manera el número de ovejas que se inseminarían (14,18).

El estrés que se produce con el transporte tanto del macho como de las hembras, disminuye el porcentaje de fertilidad (18).

Con la técnica del congelamiento del semen del carnero, se incrementan las posibilidades de utilizar la I.A. en los ovinos, se facilitaría el desarrollo de programas tendientes a beneficiar a esta especie, principalmente en las regiones tropicales a las que se les está dando un gran impulso. El mejoramiento genético de los ovinos se vería acelerado y el costo monetario sería inferior al necesario en la actualidad, para la adquisición de sementales de gran valor genético (3,18).

El semen de ovino presenta una aceptable supervivencia ep_uermática al proceso de descongelado. Se ha encontrado que el índice de concepción con semen descongelado, es por lo menos 20% inferior al logrado con semen fresco, encontrándose así una fertilidad del 42.20% en ovejas inseminadas con semen descongelado a 36°C durante 8 segundos (5,13,15).

Entre las causas que afectan la viabilidad del semen congelado está la formación de hielo intracelular, tanto en la congelación como en la descongelación, los espermatozoides pueden sufrir la pérdida de la integridad de las membranas celulares, inactivación de un 20% de enzimas acrosomales y pérdida de los fosfolípidos (3,9,16,18,19,22,26).

Los espermatozoides tienen al recuperación si un crioprotector está presente en el medio que los suspende al congelar y al descongelar (3,11,13,23).

El daño celular de los espermatozoides congelados con glicerol, es menor que el producido al utilizar otros crioprotectores como el DMSO (3,9,16,23). El glicerol ha sido utilizado como crioprotector para la congelación del semen del carnero (3). La concentración del glicerol requerida para proteger a un máximo de espermatozoides es determinada considerando la velocidad del enfriamiento y del descongelamiento (9).

El glicerol utilizado como crioprotector reduce la formación del hielo intracelular, evitando la muerte de los espermatozoides (3,4,9,16,18,19,22,26).

Estudios recientes han demostrado que la concentración de 5% de glicerol en el diluyente, es la óptima para la protección de los espermatozoides del carnero (4,9).

Otro punto que debe tomarse en cuenta es la temperatura y el tiempo de descongelado que debe utilizarse.

Se ha encontrado que es mejor descongelar a temperaturas como son 65°C que a 40°C ya que a medida que se incrementa la temperatura de descongelación, aumenta el porcentaje de motilidad espermática y disminuye el número de espermatozoides con daño acrosomal (1,5,7,14,17).

Algunos investigadores mencionan que el descongelar las pajillas de 0.5 ml a temperaturas de 75°C durante 12 segundos, es mejor que descongelar a 35°C durante 30 segundos (1,17). Sin embargo, otros autores recomiendan descongelar las pajillas a una temperatura semejante a la del aparato reproductor de la hembra, de 36°C a 38°C (4,5,15).

Existe muy pocas investigaciones en las que se han comparado diferentes temperaturas y tiempos para la descongelación del semen del carnero, por lo que el presente trabajo tiene como finalidad el determinar la temperatura y tiempo óptimos de la descongelación del semen del carnero en pajillas de 0.25 ml.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

MATERIAL Y METODOS.

El trabajo fué realizado en el Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria (C.O.P.E.A.), localizado en el Km 29.5 de la carretera federal México-Cuernavaca.

El C.O.P.E.A. se encuentra ubicado a 19° latitud Norte y 99° longitud Oeste, a una altura de 2760 msnm, con una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm anuales y una temperatura promedio de 19°C (10).

Se utilizaron 13 carneros de la siguientes razas: 2 Suffolk, 4 Polled Dorset, 2 Tabasco, 4 Finnish Landrace y 1 Hampshire.

Se obtuvo un total de 43 eyaculados por medio de una vagina artificial (8).

La evaluación de los eyaculados se realizó tomando en cuenta los siguientes puntos (3): 1.- Volúmen.

2.- Motilidad (movimiento en masa y movimiento progresivo).

3.- Concentración.

4.- Determinación de anomalías morfológicas.

Esta evaluación se realizó utilizando un microscópio óptico y condicionando una botella plana con agua a 38°C, a modo de termostato. Solo se utilizaron aquellos eyaculados con una concentración mayor a 2,000 millones de espermatozoides por mililitro, con un movimiento progresivo no menor a 60% y con menos del 20% de anomalías morfológicas.

Una vez evaluado el eyaculado fué diluido en una proporción de 1:9 utilizando el diluyente de Tris (Tris[hidroximetil] amino metano:36.05 g, ácido cítrico:20.24 g, fructosa:14.88 g, agua bidestilada: 100 ml), adicionando 20% de yema de huevo y 5% de glicerol (2,18). Posteriormente fué centrifugado a 200 g durante 15 minutos. Ya centrifugado, el sobrenadante fué decantado, dejando el paquete de los espermatozoides y éste fué aforado al volúmen final necesario para envasar con 300 millones de espermatozoides móviles, pajillas francesas de 0.25 ml cada una.

Las pajillas fueron sumergidas en un recipiente de poliu-retano con agua a 22°C y se introdujeron al congelador (0°C) durante 2 horas, tiempo en el que paulatinamente el semen al-

alcanza una temperatura de 5 °C sin sufrir choque térmico. Transcurrido este período de equilibramiento, las pajillas se expusieron a vapores de nitrógeno líquido a una distancia de 4.5 cm sobre el nitrógeno, durante 10 minutos, obteniendo una temperatura de -80°C aproximadamente (21). Ya congeladas las pajillas, se introdujeron directamente al nitrógeno líquido del termo (-196°C) y se almacenaron aproximadamente un mes, hasta el día en que se utilizaron.

Las pajillas se descongelaron en baño maría a dos diferentes temperaturas y tiempos, a 36°C durante 8 segundos ó a 70°C durante 4 segundos.

A la mitad de las 426 pajillas obtenidas de los eyaculados se les evaluó la recuperación de los espermatozoides al descongelar a las dos diferentes temperaturas y tiempos, ésto se hizo observando el movimiento progresivo de los espermatozoides al microscopio. Las 213 dosis restantes fueron descongeladas también a las temperaturas y tiempos mencionados y con ellas se inseminaron a las hembras que presentaron el celo. La detección de calores se realizó con machos vasectomizados, provistos de un mandil, haciendo la detección de calores en la mañana (7:00) y en la tarde (15:00). Las hembras que presentaron el celo en la mañana se inseminaron en la tarde y las que lo presentaron en la tarde se inseminaron en la mañana del día siguiente (20).

La I.A. se realizó utilizando un espéculo de pico de pato con iluminación propia*, depositando el semen en la entrada del cervix.

Durante los 45 días que duró el empadre se inseminó un total de 208 hembras, 143 con semen descongelado a 36°C durante 8 segundos y 65 con semen descongelado a 70°C durante 4 segundos.

La evaluación de la fertilidad se llevó a cabo tomando en cuenta el número de ovejas paridas.

Para evaluar la recuperación espermática y la fertilidad después de la descongelación, se utilizó la Prueba de Z (25).

*I.M.V. (Instruments de Médecine Veterinaire) Francia.

RESULTADOS.

Se observó que el promedio del movimiento progresivo en el semen descongelado a 36°C durante 8 segundos fué mayor al presentado en el semen descongelado a 70°C durante 4 segundos, no existiendo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre ellos (cuadro 1).

Con respecto a la fertilidad no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) al comparar los dos ritmos de descongelación utilizados (cuadro 2).

Cuadro 1

Evaluación del movimiento progresivo de los espermatozoides de semen fresco y semen descongelado a 36°C durante 8 segundos ó a 70°C durante 4 segundos.

PRESENTACION	MOVIMIENTO PROGRESIVO PROMEDIO
SEMEN FRESCO	71.3 %
SEMEN DESCONGELADO A 36°C DURANTE 8 SEGUNDOS	51.2 %
SEMEN DESCONGELADO A 70°C DURANTE 8 SEGUNDOS.	47.9 %

Cuadro 2 Porcentajes de fertilidad en ovejas inseminadas con semen descongelado a dos diferentes ritmos.

TRATAMIENTO	NUMERO DE HEMBRAS INSEMINADAS	NUMERO DE HEMBRAS PARIDAS	PORCENTAJE DE FERTILIDAD
SEMEN DESCONGELADO A 36°C DURANTE 8 SEGUNDOS.	143	44	30.7 %
SEMEN DESCONGELADO A 70°C DURANTE 4 SEGUNDOS.	65	19	29.2 %
TOTAL	208	63	59.9 %

DISCUSION.

Como se menciona en los resultados no se encontró diferencia estadística entre los dos ritmos de descongelación utilizados, aún cuando diferentes autores mencionan que a medida que se aumenta la temperatura de descongelación, aumenta el porcentaje de motilidad espermática y disminuye el número de espermatozoides con daño acrosomal (1,5,7,14,17).

Otros investigadores mencionan un menor porcentaje de espermatozoides muertos al descongelar a altas temperaturas (75° C) que al descongelar a bajas temperaturas (35°C) (1).

Existen reportes donde se obtienen resultados superiores con las descongelaciones rápidas, pero con la observación de que deben considerarse las pequeñas variaciones en el tiempo de descongelación que pueden provocar daños irreversibles en la sobrevivencia de los espermatozoides (6). Por ejemplo, se ha observado hasta un 62.0 % de motilidad en los espermatozoides descongelados a 65°C y a 70°C durante 6 y 4 segundos respectivamente (5,12).

Algunos investigadores han encontrado que al trabajar con semen de bovino, no obtienen diferencias significativas en la motilidad progresiva e integridad del acrosoma cuando descongelan a 35°C o a 75°C, contrario a los reportes de mayores porcentajes de motilidad progresiva al descongelar a 35°C que a 50°C (2,7).

Con respecto a la fertilidad, existen investigaciones que mencionan una fertilidad del 42.2% en ovejas inseminadas con semen descongelado a 36°C durante 8 segundos, contrario a lo obtenido en este trabajo y a lo reportado por Linge, donde se obtienen porcentajes menores (30%) al utilizar la misma temperatura y tiempo de descongelación (5,15).

Otros autores mencionan que no hay diferencia significativa de fertilidad al inseminar con semen descongelado a 40°C o a 70°C, lo que coincidiría con los resultados del presente trabajo (17).

Por lo anterior se concluye que al no haber diferencia significativa entre los dos ritmos de descongelación, es posible utilizar ambos, tomando en cuenta que es más recomendable la

descongelación a 36°C durante 8 segundos por la facilidad que presenta tanto al obtener esta temperatura como para mantenerla y utilizarla, sobre todo a nivel de campo, además se evita el riesgo de que pequeños errores en el tiempo de descongelación cuando se usan altas temperaturas, provoquen un descongelamiento insuficiente, si el tiempo es corto ó el daño irreversible de los espermatozoides si el tiempo se pasa de 1 ó 2 segundos, por lo que se recomienda el utilizar las temperaturas bajas (36°C durante 8 segundos).

LITERATURA CITADA.

- 1.- Aamdal, J. and Andersen, K.: Freezing of ram semen. J. Reprod. Fert. 42:277-285 (1968).
- 2.- Almquist, J.O.: Effect of cold shock after thawing on acrosomal maintenance and motility of bovine spermatozoa frozen in plastic straws. J. Dairy Sci. 57:1825 (1976).
- 3.- Bustamente, C.G.: Acción del Sulfoxido de dimetilo y glicerol como agentes crioprotectores del acrosoma del espermatozoide de carnero durante la congelación. Tesis de maestría. Fac. Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1980).
- 4.- Colas, G. and Courot, M.: Production of spermatozoa, storage of semen and artificial insemination in sheep. Proc. Symp. Management of Reproduction in Sheep and Goats. University of Wisconsin, Madison. 31-40 (1977).
- 5.- Colas, G.: Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. J. Reprod. Fert. 42:277-285 (1975).
- 6.- Colas, G. and Courot, M.: Storage of ram semen. In: Sheep Breeding '74. G.L. Tomes, D.E. Robertson y R.J. Lightfoot. Butterworths. Second Edition. (1979).
- 7.- De Abreu, R.M.; Berndtson, W.E.; Smith, R.L. and Pickett, B.W.: Effect of post-thaw warming on viability of bovine spermatozoa thawed at different rates in french straws. J. Dairy Sci. 62:1449. (1979).
- 8.- España, G.M.: Evaluación de la fertilidad en ovejas inseminadas artificialmente, utilizando dos dosis de concentración espermática de semen fresco diluido y semen diluido refrigerado. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1986).
- 9.- Fiser, P.S. and Fairfull, R.W.: The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram frozen in straws. Ann. Rech. Centre. Cryobiology. 21:542-551 (1984).
- 10.- García, M.E.: Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. 3a. ed. Ofset Larios, México, D.F. (1981).
- 11.- Graham, E.F.: Fundamentals of preservation of spermatozoa. In: The integrity of frozen spermatozoa. National Academy of Sciences, Washington, D.C. (1978).

- 12.- Graham, E.F.; Crabo, B.G. and Pace, M.M.: Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. J. Anim. Sci. **47** (Suppl. 2): 80-118 (1978).
- 13.- Gustafsson, B.K.: Aspects of fertility with frozen-thawed ram semen. Ann. Rech. Centre. Cryobiology. **15**:358-361 (1978).
- 14.- Lillo, A.: Lambing rates after single inseminations of ewe with liquid or deep-frozen semen. 10TH International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Illinois, 1984. 373-374. University of Illinois. Urbana, Champaign (1984).
- 15.- Linge, F.: Field trials with frozen semen. A.B.A. **41**:1679 (1972).
- 16.- Locksley, E.M.: Differing actions of penetrating and non-penetrating cryoprotective agents. Ann. Rech. Centre. Cryobiology. **15**:382-390 (1978).
- 17.- López, P.G.A.: Evaluación de diferentes técnicas para la congelación de semen de ovino. Tesis de Maestría. Cuautitlán, Izcailli, México. (1987).
- 18.- Maxwell, W.M.C.: Current problems and future potential of artificial insemination programmes. In. Reproduction in Sheep. Ed. Lindsay, D.R. and Pearse, D.T. 291-297. Cambridge University Press, Cambridge. (1984).
- 19.- Mazur, P.: Fundamental aspects of freezing of cells, with emphasis on mammalian ova and embryos, 9th. International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Madrid 1980, 99-114. Ed. Garsi, Madrid España (1980).
- 20.- Miller, S.J.: Artificial breeding in sheep. Current Therapy in Theriogenology. Edited by: Morrow, D.; Vol X:947-950. (1979).
- 21.- Orizaga, V.M.: Efecto del congelamiento sobre la movilidad progresiva y la estructura acrosomal del espermatozoide del morueco. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1982).
- 22.- Reza G.G.: Daño acrosomal del espermatozoide de bovino congelado en pajilla francesa y en pipeta. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1985).
- 23.- Robbins, R.K.; Saacke, R.G. and Chandler, P.T.: Influence of freeze rate, thawrate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in french straws.

J. Anim. Sci. 42 (1):145 (1976).

24.- Valencia, M.J.; Mendoza, G.; Barrón, C.; Fernández-Baca, S.
: Manejo y Reproducción de Ovinos en al Región del Ajusco, Méxi-
co, D.F. Vet. Mex. 9:85-90 (1978).

25.- Wayne, W.D.: Bioestadística: Base para el análisis de las
ciencias de la salud. Limusa. México. (1979).

26.- Willis, E.D.: Effect of unsaturated fatty acids and their
peroxides on enzymes. Biochem. Pharmacol. 7:7-16 (1961).