



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN



12
2ej

**EFFECTO DE DOS CONCENTRACIONES DE YEMA DE
HUEVO Y LA VELOCIDAD DE ENFRIAMIENTO SOBRE LAS
CARACTERISTICAS ESPERMATICAS EN SEMEN
CONGELADO DE OVINOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
MARTIN DELGADO FUENTES

ASESOR: MVZ. MC. ARTURO A. TREJO GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

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

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

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el trabajo de Tesis

"Efecto de dos concentraciones de yema de huevo y la velocidad de enfriamiento sobre las características espermáticas en semen congelado de ovinos"

que presenta al pasante: Martín Delgado Fuentes con número de cuenta: 8506435-I para obtener el TITULO de: Medico Veterinario Biotecnista.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

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

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 17 de Abril de 1996

PRESIDENTE	<u>M. en C. José de Lucas Trón</u>	
VOCAL	<u>M. en C. Arturo Trejo González</u>	
SECRETARIO	<u>MVZ. Enrique Eparón Sumano</u>	
1er. SUPLENTE	<u>MVZ. Humberto Flores Vázquez</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M. en C. Rosalba Soto González</u>	

AGRADECIMIENTOS

A MI PADRE

Sr. Martín Delgado Mejía.

Como un sencillo homenaje a sus sacrificios
apoyó y confianza, por ser ejemplo de trabajo
y honradez. Para toda la vida. Gracias.

A MI MADRE.

Que con su dedicación, Amor
sacrificios, Abnegación y
comprensión supo ser madre
y amiga refugio y calor
maestra y guía.

A MIS HERMANOS

Por su apoyo incondicional
y sus frases de aliento para
no detenerme y siempre dar
un paso más.

AGRADEZCO. al M.V. Z.M.C. ARTURO ANGEL TREJO GONZALEZ.

Porque acepto dirigir esta tesis A pesar de ser una
persona tan ocupada solo por la satisfacción de ayudar
demostrando su calidad profesional al atenderme,
orientarme y enseñarme, para la realización de esta
tesis.

JURADO

PRESIDENTE.....M.en C. José de Lucas Trón
VOCAL.....M.en C. Arturo Trejo González
SECRETARIO.....M.V.Z...Enrique Esperón Sumano
1er.SUPLENTE...M.V.Z...Humberto Flores Vázquez
2do.SUPLENTE...M.en.C...Rosalba Soto González

INDICE.

RESUMEN.....	1
I.-INTRODUCCION.....	1
II.-OBJETIVOS.....	12
III.-MATERIAL Y METODOS.....	13
IV.- RESULTADOS.....	20
V.-DISCUSION.....	27
VI.-CONCLUSIONES.....	33
VII.-BIBLIOGRAFIA.....	34
VIII.-ANEXO.1.....	38
IX .- ANEXO.2.....	39

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del centro agropecuario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en los meses de junio, julio y agosto de 1995. utilizando dos machos ovinos de la raza Suffolk, de los cuales se recolectaron 30 muestras de semen por medio de la vagina artificial, para determinar el efecto de dos concentraciones de yema de huevo (10 y 20 %) sobre la motilidad progresiva y el daño acrosomal del semen ovino antes y después de su congelación y se evaluó la velocidad de enfriamiento para la conservación del semen de ovinos, utilizando para esto la medición del descenso de la temperatura por dos termómetros, uno digital y uno químico.

El eyaculado de cada carnero se dividió en dos alícuotas en partes proporcionales y se diluyó 1:10 (V/V), se procedió a envasar la dilución en pajillas francesas y se colocaron en dos tubos de ensayo para introducirlos en recipientes de plástico con capacidad de un litro, se llenaron estos recipientes con agua a 37°C y se introdujeron a un refrigerador a temperatura de 4°C con los dos termómetros. Se anotó la hora de entrada de los recipientes y la temperatura ajustada a 37°C de los termómetros al inicio y cada quince minutos hasta descender al punto de equilibrio que es de 5°C.

Después se procedió a la congelación de las muestras enpajilladas en vapor de nitrógeno, el semen se conservó en congelación hasta obtener las 30 muestras, se descongelaron una por una en baño María y se observó la recuperación del movimiento espermático. Se realizaron tinciones con el colorante Wells-Awa antes y después de la congelación. Con los frotis obtenidos tanto del semen fresco como del semen congelado, se evaluó la integridad del acrosoma con la ayuda de un microscopio de contraste de fase con un aumento de 1000 X.

La proporción de yema de huevo, en relación a la motilidad progresiva y la recuperación de la motilidad del semen congelado fue mejor en la dilución de yema al 20 % que obtuvo 27.92% de la motilidad progresiva v/s 35.50 % de la recuperación de la motilidad espermática en 20 % observándose una diferencia de ($P < 0.05$)

Fueron significativos los efectos de la motilidad progresiva del semen fresco, con la relación de la recuperación de la motilidad espermática del semen congelado ($P < 0.05$).

El efecto de el tiempo de descenso de la temperatura de 37°C a 5°C sobre la recuperación de la motilidad espermática, fue significativa tanto de la medición de el descenso de la temperatura por el termómetro digital y la medición del tiempo de descenso de la temperatura por el termómetro químico ($P < 0.05$).

Se puede concluir que el efecto de la concentración de la yema de huevo del 20 % resultó con mejor protección que la de 10% en relación con la motilidad progresiva del semen descongelado.

I. INTRODUCCION.

Las ovejas son animales que han proporcionado satisfactores al hombre desde etapas muy tempranas en su historia, ya que junto con el perro y la cabra fueron quizás las primeras especies domesticadas hace aproximadamente 9 000 a 10 000 años, la relación del hombre con el ovino surge como una necesidad, primero con la obtención de carne y prendas de vestir y posteriormente la obtención de leche.

Los ovinos son una de las especies más versátiles en los productos que proporcionan al hombre, ya que suministran dos de los alimentos básicos de su dieta que son la leche y la carne, y para su vestido, a través de las pieles y la lana. Las ovejas son además proveedoras de una serie de subproductos entre los que destacan la lanolina, que es el elemento base de los mejores jabones, cremas y shampoos del mundo (De Lucas, 1986).

Los productos ovinos han tenido y tienen una demanda alta entre las poblaciones ya sea por los tradicionales platillos de barbacoa o mixiotes, o por la artesanía lanera. Por esto se han buscado diferentes procesos para aumentar su productividad (De Lucas, 1986).

Uno de estos procesos ha sido el mejoramiento de ovinos y caprinos por medio de cruzamientos de razas nativas y mejoradas con el objeto de aumentar su producción, constituyendo esto una necesidad imperativa del país. Por razones económicas y técnicas, la mejor manera para lograr este objetivo es la aplicación de la inseminación artificial (Rodríguez, 1978 citado por Castro y

Peralta, 1986).

La técnica de la inseminación artificial en ovinos y caprinos presenta diversas ventajas, en las que destacan la utilización de estas especies de alto valor genético, que generalmente no están al alcance de los ovinocultores de escasos recursos, con el fin de incrementar la producción de carne en México (Barrón, 1981).

La inseminación artificial es el método reproductivo en que las células sexuales masculinas son transportadas al aparato genital femenino a través de medios mecánicos que sustituyen los habituales órganos especializados del macho (Durán del Campo, 1980).

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

La obtención de adecuados niveles de fertilidad pueden depender de factores tales como la elección de la mejor época de empadre, así como la fisiología normal del macho, la nutrición, edad y raza (Barrón, 1981).

La principal meta de la inseminación artificial es el mejoramiento de la raza y el control de las enfermedades venéreas, así como la disponibilidad de registros exactos de crianza necesarios para un buen manejo del rebaño (Lunca, 1965).

La inseminación artificial juega un papel cuantitativo y cualitativo en el incremento de la población animal y el aprovechamiento de los productos obtenidos, requeridos por la población (Azawi y col., 1993).

En México se tiene un alto potencial de producción caprina y ovina, sin embargo, se está importando semen de dudosa calidad genética proveniente de Estados Unidos y Canadá, por lo que el desarrollo de programas nacionales de mejoramiento genético e inseminación artificial deben ser considerados (Grajales y Trejo 1991).

La inseminación artificial requiere de una serie de procedimientos los cuales son:

- a) Colección, evaluación y conservación del semen.
- b) Detección del estro.
- c) Técnica de la inseminación (Noriega, 1984).

Por lo tanto, la obtención del semen de alta calidad depende de que los machos hayan sido mantenidos bajo buenas condiciones de alimentación y manejo. El semen puede ser colectado con éxito a los 7 a 8 meses de edad (Foote, 1989).

El mejor procedimiento para colectar el semen de carnero es la vagina artificial, la cual es simple en su construcción y estimula la cópula normal, el diseño básico es un tubo rígido de unos 15 cm de longitud, por 5 cm de diámetro, este tubo está provisto de una válvula para regular la presión interna, y por dentro se coloca una camisa de látex o de plástico desechable, en uno de los extremos de la vagina, se coloca el cono de colección que terminará en un tubo colector graduado, el cual se protege de

los golpes y las variaciones de luz y de temperatura con una funda de poliuretano (López y Valencia, 1982). Después de armada la vagina se le agregará agua a una temperatura de 48 a 50°C (Durán del Campo, 1980).

Existen diferencias entre la calidad del semen entre machos de una misma raza, presentando además diferentes porcentajes de fertilidad ya que el semen reacciona de diferentes formas a los procesos de enfriamiento y congelación. El semen colectado fuera de la estación de cría tiene mayor número de espermatozoides anormales y éstos no sobreviven adecuadamente al proceso de congelación, como los obtenidos durante la estación de cría.

El semen es normalmente evaluado por concentración, motilidad y morfología, tomando en cuenta éstas características se decide cuál es el semen adecuado para refrigerarse o congelarse (Esquivel, 1986).

En especies de reproducción estacional las cuales están influenciadas por el fotoperíodo, como es el caso de los ovinos, una ventaja sería la conservación del semen, porque se puede congelar en la estación reproductiva cuando éste se produce de mejor calidad (Salamon y Maxwell, 1995).

Entre las posibles causas de los bajos resultados obtenidos con semen congelado, se señala el daño acrosomal en la dilución y congelación por falta de protección de los diluentes ordinarios. En el semen de carnero se dañan una gran proporción de espermatozoides en el proceso de congelación y descongelación, pero si se compara el uso del semen congelado entre cabras y borregos se tiene, que en los caprinos los resultados son más exitosos (Esquivel, 1986).

Para procesar el semen se han empleado diversos tipos de diluentes, como gelatina, yema de huevo y leche descremada, con el fin de aumentar el volumen del eyaculado y de proveer al espermatozoide de un medio que llene sus requerimientos fisiológicos y que le permita sobrevivir y conservar su capacidad fecundante pese a la congelación. Las características que pueden ser evaluadas se clasifican en tres formas: pruebas macroscópicas, microscópicas y biológicas (Durán del Campo, 1980).

Aunque de éstas características las más importantes son las pruebas microscópicas, que son la motilidad progresiva y la morfología de los espermatozoides (Zemjanis, 1985; Duanel y col., 1989; Hopkins y Evans, 1989).

Para evaluar la concentración existen dos formas, una directa a través del conteo de espermatozoides, por medio de la cámara de Neubauer o indirecta, ya sea por medio de un espectrofotómetro o por cualquier otro medio electrónico (De Lucas, 1986).

La concentración se calcula de forma rutinaria con un espectrofotómetro calibrado, la determinación rigurosa de la concentración del volumen del semen y del porcentaje de las células vivas es esencial para calcular la máxima dilución de espermatozoides en los preparados para la inseminación artificial (Gomes, 1977).

El semen de la mayoría de los machos contiene espermatozoides con defectos de conformación, esto, por lo general no es asociado con fertilidades más bajas, hasta que la proporción de espermatozoides anormales exceda el 20%. Frecuentemente, cuando el semen de un macho muestra un elevado porcentaje de células anormales presenta a la vez baja concentración de espermatozoides

y motilidad progresiva baja (Esquivel, 1986).

Para determinar la morfología espermática así como anomalías de la cabeza, cuello y cola, se emplean preparaciones teñidas (Zemjanis, 1985; De Lucas 1986).

Las anomalías espermáticas se clasifican en primarias y secundarias:

Primarias: a) Anomalías de la cabeza: piriformes, gigantes y pequeñas.

b) Anomalías de la pieza intermedia: mala implantación, doble cuello y cola.

Secundarias: a) Cabeza normal desprendida.

b) Presencia de gota proximal o protoplasmática.

c) Cola curvada.

d) Desprendimiento del acrosoma.

Por lo tanto, la integridad del acrosoma está correlacionada con la fertilidad y se han descrito acrosomas incompletos, arrugados o con gránulos, desprendidos del borde apical, con abultamientos o hinchados (Sorensen, 1982).

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

Debido a que el plasma seminal contiene los suficientes nutrientes y agentes para la conservación de los espermatozoides, será preciso extender las propiedades benéficas del plasma seminal, siendo definitivo que un diluyente deberá ofrecer las condiciones que permitan a los espermatozoides superar las alteraciones antinaturales asociadas a la conservación y a la inseminación

artificial prolongando la viabilidad de los espermatozoides.

Debido a que los espermatozoides eyaculados no sobreviven por largos períodos, es preciso adicionar varios agentes con los siguientes requerimientos:

- a) Deberá tener una presión osmótica isotónica.
- b) Suministrar un equilibrio adecuado de minerales esenciales.
- c) Proveer nutrientes con una fuente de energía.
- d) Proteger a las células espermáticas contra el choque por frío.
- e) Proporcionar capacidad tampón contra los productos metabólicos.
- f) Inhibir el crecimiento bacteriano.
- g) Deberá contener además agentes crioprotectores cuando es congelado (Bearden y Fuquay, 1982; Jainuden y Hafez, 1989).

Desde que se descubrieron los efectos benéficos de la yema de huevo sobre la conservación de las cualidades en la fertilidad de los espermatozoides, ha sido empleada en muchos diluentes de semen para varias especies, siendo su principal ventaja la protección al espermatozoide contra el choque por frío, gracias a las lipoproteínas y lecitinas que contiene, cuando la muestra es enfriada de la temperatura corporal hasta 5°C (Pérez, 1980).

El efecto favorable de los niveles de yema de huevo en los diluentes pueden ser debidos parcialmente al aumento del nivel proporcionado de la yema, la cual contiene cantidades considerables de iones Na, K, Ca. Otra ventaja de la utilización de la yema es su efecto sobre la integridad acrosomal de los espermato-

zoides y la menor liberación de las transaminasas glutámico oxalacética (TGO), durante el precongelado y descongelado (Singh y col., 1992; Dhami y Sahni, 1993).

Al analizar el efecto protector existente en la yema de huevo, se ha llegado a la conclusión que existe en los huevos un factor de protección que es mayor en la yema de huevo en aves salvajes (perdiz, faisán, etc). Esta riqueza de factor de protección espermática parece estar relacionada con la intensidad de la pigmentación dada por el contenido de carotenoides en el alimento, por esto es que los mejores resultados se obtienen con los huevos de primavera, verano y otoño, ya que en éstas estaciones los huevos contienen un alto contenido de carotenoides y lecitinas (Pérez, 1980).

Se puede aceptar que la yema de huevo permite en los diluentes la adición simultánea de fructuosa y glucosa; ésta última es usada en el metabolismo de los espermatozoides como fuente de energía uniéndose así a una mejor crioprotección durante el proceso de congelación (Gurpaul y col., 1992).

Los efectos dañinos de las bacterias como Bacillus spp., Escherichia coli y Corynebacterium piogenes, los cuales son microorganismos de la flora normal del prepucio, han sido parcialmente controladas en su producción como agentes contaminantes del diluente, mediante la adición de antibióticos como son, sulfonamidas, penicilinas, estreptomycinas y polimixinas con el objetivo de disminuir el crecimiento de estos microorganismos en la dilución del semen (Foote, 1989; Ksubramanyam y col., 1991).

El efecto crioprotector se crea mediante la adición del glicerol para proteger a las células de los daños durante la fase

de cristalización en la congelación. El efecto de la adición del glicerol al 6% en diluentes a base de TRIS (hidroximetilaminometano), yema, citrato y fructosa en tiempos de refrigeración de 4 a 5 horas, la supervivencia espermática es muy favorable y su grado de motilidad no es afectado como en el caso de diluentes a base de leche descremada (Deshpande y Mehta, 1991).

El glicerol se adiciona por lo general al semen después de enfriarlo a 5°C, sin embargo ofrece igual protección cuando se adiciona antes del enfriamiento a temperatura ambiente de 22°C; En cuanto al porcentaje de la cantidad se han realizado experimentos en diluentes a base de 5, 6 y 7% de glicerol en leche descremada y los resultados obtenidos de las anomalías acrosomales y motilidad progresiva no han sido de gran significancia en su afección (Singh, y col., 1992).

En cuanto al porcentaje final recomendado de glicerol para el diluyente TRIS, yema, citrato y glucosa se han observado mejores resultados al utilizarla al 8% (Castro Y Peralta, 1986).

Todas las células que se han congelado favorablemente muestran una importante característica de enfriamiento adecuado para sobrevivir, desde la temperatura de recolección a 5°C, la cual puede realizarse en un acondicionamiento rápido de una hora o media hora, el ritmo de ésta reducción de temperatura puede ser del orden de 7.5, 10 y 15°C e incluso 20°C por hora hasta 30°C sin que se observen diferencias importantes al respecto, recomendándose así una reducción de la temperatura de 20 a 30°C por hora (De Lucas, 1986).

También hay autores que han bajado la temperatura de 35 a 50°C en tiempos que varían de 75 minutos a 1.5 horas sin que se

afecten o se interfieran sus resultados al final de sus pruebas (Almquist y col., 1982).

Por lo tanto el semen preparado para congelar se enfría primeramente a 5°C y aquí se le da un tiempo de reposo conocido como período de equilibrio que comprende de 2 a 3 horas (Fraser 1962; Visser, 1984; De Lucas, 1986; Moreno, 1987; Grajales y Trejo 1991).

La forma de congelar el semen, es la congelación en el nitrógeno líquido a -196°C, con la ventaja de que se obtiene un estado más estable así como un tiempo más prolongado de almacenamiento (Evans y Maxwell, 1990).

Primeramente las pajillas preparadas se colocan en vapor de nitrógeno por un período de 8 a 10 minutos lo cual permite que descienda la temperatura de -70°C a -80°C y de aquí se sumergen en el nitrógeno líquido. Lo anterior se debe a que el congelamiento demasiado rápido puede causar un choque térmico y la formación de hielo dentro de la célula espermática.

El congelamiento lento hace que aumente la concentración de sal, a medida que el agua se congela éste aumento en la presión osmótica en un período prolongado de congelamiento lento, puede dañar las proteínas y lipoproteínas de los espermatozoides y su acrosoma. (Corteel, 1967; Foote, 1989).

Una de las dificultades para congelar y descongelar el semen se debe a que algunos diluentes pueden resultar tóxicos para los espermatozoides y tanto al congelar como al descongelar se disminuye la motilidad progresiva y se incrementa la cantidad de acrosomas dañados (Ritar y Salamon, 1983; Evans y Maxwell, 1990).

Pero los diluentes basados en sustancias amortiguadoras como TRIS, y la yema de huevo parecen ser apropiados para la congelación del semen (Deka y Rao, 1984-1986).

Por otra parte las temperaturas y velocidades de congelación y descongelado son críticas para la fertilidad del semen, se menciona como norma general que mientras más rápido se congele y descongele el semen, se obtendrá mejor recuperación espermática (Jondet, 1968; Evans y Maxwell, 1987).

Los métodos usados para realizar la fertilización en la inseminación artificial con el uso de semen congelado de carnero son:

- 1) Inseminación intracervical doble, dependiendo de la concentración espermática de la dosis a inseminar.

- 2) Inseminación intracervical con el uso de fórceps, inoculando el semen de 2.5 a 4 cm dentro del cérvix por medio de pipetas especializadas, y la aplicación de hormonas parenterales como son la relaxina, oxitocina y prostaglandinas, con el fin de facilitar la apertura del cérvix y aumentar la contractibilidad del útero para facilitar el transporte de los espermatozoides.

Pero el mejor método es el uso de la inseminación artificial por endoscopia intrauterina (Salamon y Maxwell, 1995).

II. OBJETIVOS.

- 1) Evaluar dos concentraciones de yema de huevo, 10 y 20%, utilizando como diluyente base TRIS, ácido cítrico y fructosa sobre las características espermáticas (motilidad y daño acrosomal).
- 2) Comparar la motilidad espermática del semen ovino antes y después de su congelación.
- 3) Evaluar la velocidad de enfriamiento para la conservación y congelación del semen de ovinos. Utilizando para esto el descenso de la temperatura de 37°C a 5°C.
- 4) Evaluar cuál es el tiempo adecuado de descenso en el enfriamiento de 37°C a 5°C para la congelación y preservación del semen ovino.

III. MATERIAL Y METODOS.

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

En el experimento se utilizaron dos carneros de raza Suffolk, con edad aproximada de 2 y 6 años, aparentemente sanos, de los cuales se recolectaron 30 muestras de semen por medio de vagina artificial, quince muestras por cada uno cada tercer día.

Se preparó una solución madre a base de TRIS, ácido cítrico, penicilina, estreptomina, glucosa y se aforó a 500 ml con agua desmineralizada, se agitó para disolver los ingredientes y se vertió en cinco matraces de vidrio con capacidad de 150 ml agregando 100 ml por matraz y se procedió a su congelación para preparar el diluyente final el día de la recolección, descongelando un matraz por cada día que se trabajó (Valencia y col., 1994).

En la preparación del diluyente se utilizaron dos concentraciones de yema de huevo 10 y 20%; Se utilizaron dos probetas de 50 ml, en una de ellas se vertió 5 ml de yema de huevo y 43 ml de solución madre, más dos mililitros de glicerol, obteniendo así el diluyente con el 10% de yema de huevo, y 4% de glicerol, se agitó para homogeneizar la mezcla y se agregó una gota de colorante vegetal rojo sin alterar el volumen y se identificó con una etiqueta con la leyenda de "yema 10".

En la otra probeta se agregaron 10 ml de yema de huevo y 38 ml de solución madre, más dos mililitros de glicerol, obteniendo así el diluyente con 20% de yema y 4% de glicerol y una gota sin

alterar el volumen de colorante vegetal azul y se le colocó una etiqueta con la leyenda de "yema 20".

Una vez preparados los diluentes con cada una de las concentraciones de yema, se colocaron en un baño María a 37°C.

En otra probeta de 50 ml se prepararon 50 ml de solución de citrato de sodio al 2.9% en agua desmineralizada, de la cual se prepararon dos tubos, cada uno con 9.9 ml, los tubos se conservaron sumergidos en baño María a 37°C.

Se preparó la vagina artificial colocando una hembra como maniquí en una trampa de contención, se sacaron los machos uno por uno y se les realizó una limpieza previa del prepucio con un paño húmedo, para reducir la contaminación en el eyaculado.

Una vez obtenida la muestra se determinó por observación directa el volumen, color y motilidad masal del semen eyaculado y se colocó en baño María a 37°C; Después de haber recolectado la muestra de semen de los dos animales se procedió a tomar 0.1 ml de semen de cada muestra y se diluyó en los dos tubos con 9.9 ml de citrato de sodio, de manera que se obtuvo una dilución 1:100 (semen:volumen). Con una pipeta de Pasteur se tomó una gota de esta dilución semen citrato de cada muestra y bajo el microscopio con aumento 100 X se evaluó la motilidad progresiva en un porta-objetos calentado a 37°C, dándole un valor subjetivo de 10 a 100%

Para ser procesada la muestra debió tener 60% de motilidad o más.

Se prepararon dos alícuotas en partes proporcionales al volumen del semen obtenidos por cada muestra y se agregó diluyente en relación 1:10 (semen:diluyente) preparándose los siguientes tubos.

a) Un tubo con capacidad de 10 ml con la dilución semen diluyente del 10% del carnero de 6 años.

b) Un tubo con capacidad de 10 ml con la dilución semen diluyente del 20% del carnero de 6 años.

c) Un tubo con capacidad de 10 ml con la dilución semen diluyente 10% del carnero de 2 años.

d) Un tubo con la capacidad de 10 ml con la dilución semen diluyente 20% del carnero de 2 años.

Todas estas diluciones se efectuaron en condiciones de baño María a 37°C.

Después de realizada la dilución semen diluyente se procedió a envasar en pajillas de 0.5 ml, dos por cada alícuota, respectivamente, y se preparó una pajilla extra sin sellar de yema al 10 o de yema al 20%, la cual se utilizó para medir el tiempo de enfriamiento del semen contenido dentro de la pajilla, por medio de la introducción del electrodo de un termómetro digital con rango de temperatura - 180 a 100°C.

Las pajillas se fueron rotando para cada día de trabajo, utilizando primero una pajilla de yema 10 (roja) y al siguiente día que se trabajaba, se utilizaba la pajilla de yema 20 (azul) y así sucesivamente.

Una vez obtenida la muestra de semen del carnero uno y del carnero dos ya enpajilladas, se transportaron al laboratorio en dos tubos de ensaye con capacidad de 35 ml previamente protegidos de la radiación solar.

En uno de los tubos de ensaye con la capacidad de 35 ml se introdujo un termómetro químico con rango de -30 a 50°C junto con

las cuatro pajillas a procesar, previamente identificadas, con el fin de medir el tiempo de enfriamiento.

En el siguiente tubo se colocaron las otras cuatro pajillas más una extra, la cual se utilizó para la introducción del electrodo del termómetro digital. El cuál abarcó todo el diámetro de la pajilla.

Estos tubos de ensaye con sus respectivas pajillas y termómetros se introdujeron en dos matraces de plástico con capacidad de 150 ml, con agua previamente calentada a 37°C. Estos dos matraces estuvieron pegados a su vez en el fondo de otros dos recipientes de plástico con capacidad de 1 000 ml a los cuales también se les agregó agua previamente calentada a una temperatura de 37°C, una vez ajustada la temperatura se colocó el electrodo del termómetro digital dentro de la pajilla a muestrear.

El paso siguiente fue introducir las muestras experimentales dentro de un refrigerador anotando la temperatura y la hora a la que entraron, después se midió cada 15 minutos el tiempo de el descenso de la temperatura en cada termómetro, una vez obtenidas las temperaturas hasta alcanzar los 5°C se sacaron las muestras y se colocaron 10 minutos en vapor de nitrógeno para después introducir las al nitrógeno líquido, para su preservación durante aproximadamente 90 días.

Con la dilución semen citrato de sodio al 2.9%, se midió la concentración espermática utilizando un espectofotómetro previamente calibrado con una longitud de onda de 600 nm.

Ya que se congelaron las 30 muestras de semen, se procedió a descongelarlas 90 días después, para lo cual se prepararon 8 tubos de ensaye previamente identificados con 0.5 ml de solución

de citrato de sodio al 2.9% cada uno, los cuáles se sumergieron en baño María a 35°C a 37°C.

Después se procedió a sacar las pajillas del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente con la ayuda de unas pinzas de Kelly se sumergieron en el agua del baño María y se dejaron incubar por períodos de un minuto para su descongelación.

Una vez descongeladas las pajillas se cortaron de ambos extremos para vaciar el contenido de cada pajilla en el tubo correspondiente. Se esperaron 10 minutos para obtener una completa recuperación de la motilidad y se observó con un microscopio óptico en aumento 100 X la motilidad progresiva del semen descongelado, de la misma manera que en el semen fresco.

Se utilizaron 120 tubos de microcentrifuga previamente identificados para realizar tinciones, agregando 0.2 ml de semen diluido descongelado y 0.5 ml de colorante Wells Awa, se esperó un lapso de 48 horas en reposo para poder realizar la observación por medio de un frotis en condiciones de la platina térmica a 37°C durante 15 minutos, para obtener un secado uniforme y evaluar la integridad acrosomal utilizando un microscopio de contraste de fase en aumento 1000X (Wells y Awa, 1970).

Con el semen fresco se preparó una dilución 1:200 (semen: volumen) con solución Hancock y se prepararon 30 tubos de microcentrifuga previamente identificados a los cuales se les agregó 0.5 ml de la dilución y 0.5 ml de colorante de Wells Awa, se esperó un período de 48 horas en reposo para después realizar un frotis para evaluar así la integridad acrosomal del semen fresco utilizando un microscopio de contraste de fase en aumento 1000 X (Hancock, 1957; Wells y Awa, 1970).

ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados fueron evaluados por correlación lineal, sin embargo debido a las pocas correlaciones significativas existentes, sólo se hará referencia a aquellas que en la discusión sirvan para explicar fenómenos biológicos.

Los datos fueron evaluados estadísticamente mediante análisis de varianza con arreglo factorial 2 X 2, utilizando los valores del semen fresco para cada característica, el volumen del semen fresco, la concentración espermática de la alicuota, así como la motilidad espermática y la concentración espermática de la muestra, el pH del semen fresco y el volumen de la alicuota como covariables y transformando los valores en porcentaje al Arcoseno-Raíz de porcentaje (Steel y Torrie, 1980). De acuerdo al siguiente modelo.

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + Y_k + \beta_1(V_n - V_{\bar{n}}) + \beta_2(SF_n - SF_{\bar{n}}) + \beta_3(CA_n - CA_{\bar{n}}) + \beta_4(CE_n - CE_{\bar{n}}) + \beta_5(PH_n - PH_{\bar{n}}) + \beta_6(VA_n - VA_{\bar{n}}) + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta (motilidad, daño acrosomal, recuperación de la motilidad y concentración espermática).

μ = Media poblacional constante.

S_i = Efecto del semental analizado como bloque.

T_j = Efecto de la medición de la temperatura ($j = 1, 2$).

Y_k = Efecto de la concentración de yema ($k = 1, 2$).

$\beta_1 (V_n - V_{\bar{n}})$ = Volumen del semen fresco utilizado como covariable.

$\beta_2 (SF_n - SF_{\bar{n}})$ = Característica de la motilidad estimada en el semen fresco utilizado como covariable.

$\beta_3 (CA_n - CA_{\bar{n}})$ = Concentración espermática de la alicuota utilizada como covariable.

B4 (CEN-CEñ) = Concentración espermática de la muestra utilizada
como covariable.

B5 (PHn-PHñ) = pH del semen fresco utilizado como covariable.

B6 (VAN-VAñ) = Volumen total de la alícuota utilizado como covariable.

Eijk = Error aleatorio.

IV. RESULTADOS.

Motilidad progresiva.

En el cuadro uno se presenta el análisis de varianza para la motilidad progresiva del semen ovino congelado con dos niveles de yema de huevo y midiendo el tiempo de el descenso de las temperaturas con cada tipo de termómetro.

La motilidad progresiva para cada macho presentó una diferencia significativa ($P < 0.01$).

Para el tiempo de el descenso de la temperatura, la motilidad progresiva presentó significancia a ($P < 0.001$).

Para el nivel de yema de huevo el efecto fue significativo ($P < 0.05$).

Las covariables que tuvieron efectos significativos fueron: Volumen del semen fresco ($P < 0.01$) y la concentración espermática de la alícuota ($P < 0.001$).

En el cuadro 2, se anotan los resultados para el efecto de la medición de el tiempo de descenso de la temperatura durante la refrigeración de 37°C a 5°C , se aprecia que el tiempo de el descenso de la temperatura fue de $12.2 \pm 1.65\%$ a los 60 minutos contra $38.0 \pm 1.65\%$ para la medición de la temperatura a los 135 minutos ($P < 0.05$).

En el cuadro 3, que se refiere al efecto del nivel de yema, se ve que en la concentración de yema de huevo al 10%, la motilidad progresiva fue de $22.28 \pm 1.73\%$ contra $27.92 \pm 1.87\%$ para la concentración al 20% ($P < 0.05$).

Recuperación de la Motilidad Progresiva.

En el cuadro 1 de análisis de varianza se observa que los

efectos significativos para recuperación de la motilidad progresiva fueron:

La variación individual entre machos ($P < 0.05$); La velocidad de enfriamiento ($P < 0.0001$) y el nivel de yema de huevo ($P < 0.05$).

En el mismo cuadro 1 se nota que las covariables significativas fueron: El volumen del semen fresco ($P < 0.05$) y la concentración espermática de la alícuota ($P < 0.0001$).

En el cuadro 2, a los 60 minutos la temperatura para la motilidad progresiva fue de $15.6 \pm 2.07\%$ contra $48.5 \pm 2.08\%$ para el tiempo de enfriamiento de 135 minutos ($P < 0.05$).

Mientras que en el cuadro 3, se presenta la recuperación de la motilidad progresiva, para el nivel de yema al 10% fue de $28.75 \pm 2.17\%$ contra $35.50 \pm 2.35\%$ del nivel al 20% de yema de huevo ($P < 0.05$).

Morfología Acrosómica.

Acrosomas Normales.

Para el porcentaje de acrosomas normales ningún efecto fue significativo (cuadro 1) y las covariables significativas fueron: El volumen del semen fresco ($P < 0.05$) y la concentración espermática de la alícuota ($P < 0.0001$).

Acrosomas Hinchados.

Para acrosomas hinchados hubo efecto significativo del seminal ($P < 0.05$) (Cuadro 1).

Las covariables que influyeron significativamente sobre el porcentaje de acrosomas hinchados se presentan en el cuadro 1 y son: Volumen del semen fresco ($P < 0.01$) y el pH del semen fresco ($P < 0.01$) (Cuadro 1).

Acrosomas Rotos.

Para el porcentaje de acrosomas rotos el único efecto significativo fue la variabilidad entre sementales ($P < 0.05$).

El volumen de la alícuota estudiada analizada como covariable tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de acrosomas rotos ($P < 0.05$).

Acrosomas Ausentes.

Para acrosomas ausentes, ninguno de los efectos fijos tuvieron significancia (cuadro 1), pero si afectó el volumen de la alícuota utilizado como covariable ($P < 0.01$).

En la gráfica 1, se presentan los tiempos de enfriamiento para las concentraciones de yema de huevo.

CUADRO 1.
CUADRADOS MEDIOS PARA EL ANALISIS DE VARIANZA EN SEMEN OVINO CONGELADO CON
DOS NIVELES DE YEMA DE HUEVO.

FUENTES DE VARIACION	gl	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA	A C R O S O M A S			
				NORMALES	HINCHADOS	ROTOS	AUSENTES
MACHO	1	1548.32**	1128.71*	45.35	77.57*	0.24*	0.24
TERMOMETRO	1	19602.27***	31898.13***	80.50	33.27	18.98	0.33
YEMA	1	678.69*	972.82*	49.60	10.07	10.93	0.44
VOLUMEN DEL SEMEN FRESCO	1	1370.55**	1029.41*	199.92*	104.64**	0.00	0.05
CONCENTRACION ESPERMATICA	1	463.56	490.28	2.16	4.68	0.16	1.30
CONCENTRACION ESPERMATICA DE LA ALICUOTA	1	2827.57***	4384.36***	157.75*	32.91	15.47	0.00
PH DEL SEMEN FRESCO	1	19.29	23.17	55.26	111.77**	1.07	0.77
VOLUMEN DE LA ALICUOTA	1	143.70	689.78	60.11	26.21	28.91*	5.92**
ERROR		109	160.45	28.92	13.30	4.58	0.58

Los asteriscos en las columnas representan diferencias significativas:
 *(P<0.05); ** (P<0.01); *** (P<0.001)

CUADRO 2. EFECTO DEL TERMOMETRO UTILIZADO DURANTE LA REFRIGERACION DE 37°C A 5°C SOBRE LAS CARACTERISTICAS ESPERMATICAS DE SEMEN CONGELADO DE OVINO (MEDIA ± E.E.)						
TERMOMETROS	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA	A C R O S O M A S.			
			NORMALES	HINCHADOS	ROTOS	AUSENTES
DIGITAL	12.2±1.65 b	15.6±2.07 b	88.1±0.7 a	7.3±0.47 a	4.02±0.27 a	0.40±0.9 a
QUIMICO	38.0±1.65 a	48.5±2.08 a	89.8±0.7 a	6.2±0.47 a	3.22±0.27 a	0.51±0.10 a

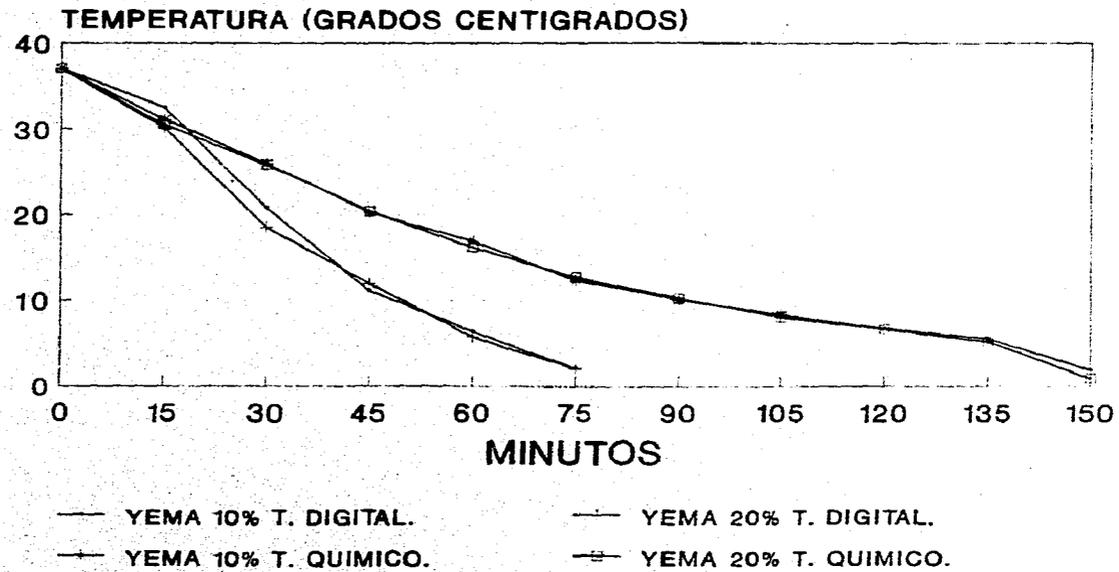
Letras diferentes en las columnas, representan diferencias significativas (P<0.05)

CUADRO 3.
EFFECTO DEL NIVEL DE YEMA DE HUEVO DURANTE LA REFRIGERACION DE 37°C A 5°C SOBRE LAS
CARACTERISTICAS ESPERMATICAS DE SEMEN CONGELADO DE OVINO. (MEDIA ± E.E.).

YEMA	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA	A C R O S O M A S.			
			NORMALES	HINCHADOS	ROTOS	AUSENTES
10%	22.28±1.73 b	28.75±2.17 b	89.88±0.78 a	7.21±0.55 a	3.26±0.29 a	0.53±0.10 a
20%	27.92±1.87 a	35.50±2.35 a	88.17±0.85 a	6.39±0.60 a	3.98±0.31 a	0.38±0.11 a

Letras diferentes en las columnas, representan diferencias significativas (P<0.05)

GRAFICA 1. RITMO DE ENFRIAMIENTO PARA SEMEN OVINO DILUIDO EN DOS NIVELES DE YEMA DE HUEVO.



Delgado, F.M. y Trejo, G.A., (1996).

V. DISCUSION

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cuadro 1, se observa que los efectos que afectaron la motilidad progresiva fueron la diferencia entre machos, la cuál esta documentada en la literatura (Gutiérrez y col., 1990). El tiempo de descenso de la temperatura afectó tanto la motilidad progresiva como la recuperación de la motilidad progresiva, esto quizá se debió a que el termómetro digital utilizado con rango de - 180 a 100°C es un instrumento muy sensible y el semen se colocó para su enfriamiento en un refrigerador con ventilador en la parte superior, muy cercana al sensor del termómetro y posiblemente se activó con el aire frío el sensor o bien la pajilla se enfrió directamente con el aire del ventilador, superando así el enfriamiento más lento en el baño María y no exactamente con la temperatura del semen al interior de la pajilla, por esta sensibilidad sería adecuado recomendar que éste tipo de termómetros aunque precisos no deben ser utilizados a nivel de campo en nuestro país, debido a que su alta sensibilidad puede estar monitoreando la temperatura ambiental y no la del semen. El porcentaje de yema también afectó tanto a la motilidad progresiva como a la recuperación de esta motilidad pos descongelado, siendo mejor el nivel de 20%, ésto coincide con trabajos similares realizados en ovinos y en caprinos (Barba y col., 1990; Anaya y Hernández, 1995), debido a la acción protectora de la yema de huevo, al aumentarse su nivel dentro del diluyente sin llegar a concentraciones tóxicas, favorece las cualidades espermáticas en semen de rumiantes (Valencia y col., 1994).

Hubo efectos interesantes de algunas covariables utilizadas

en el modelo estadístico, tanto para motilidad progresiva como para recuperación pos descongelado, hubo efecto del volumen del semen fresco, el semen fresco se diluyó en el presente trabajo en proporción 1:10 (v/v), por lo que al aumentarse el volumen seminal, se aumentó por ende el volumen del diluyente, lo cuál permitió que una superficie mayor del tubo de cristal estuviera en contacto con el fluido del semen:diluyente a 37°C, lo cuál posiblemente retardó la transmisión de calor del fluido al cristal ejerciendo una mejor acción protectora sobre los espermatozoides al reducirse más lentamente la temperatura.

La concentración espermática de la alícuota afectó tanto a la motilidad progresiva como a la recuperación de la motilidad progresiva, sin embargo la correlación entre estas dos características no fue significativa, lo que sugiere que el ajuste por covarianza se debió a un efecto óptico, siendo la prueba utilizada la observación directa de manera subjetiva, al aumentarse el número de células espermáticas que se observan por campo, es posible confundirse y estimar una motilidad mayor a la que realmente existe, por lo que sería recomendable asignar concentraciones iguales a cada pajilla con fines de evaluación comparativa.

Con relación a los acrosomas, Healey (1969) menciona que en las células con daño acrosomal no necesariamente se encuentra afectada la motilidad, pero si su fertilidad en aproximadamente el 68%, al estar distribuido este daño acrosomal al azar entre la población de células móviles. Debido a esto la evaluación de la motilidad nos da un margen poco confiable de la fertilidad del semen descongelado. De los efectos fijos la variabilidad entre sementales fue el único que afectó al daño acrosomal mostrando

acrosomas hinchados y acrosomas rotos, pero en las covariables de ajuste que se observa el daño acrosomal, se encuentra afectado el volumen del semen fresco por acrosomas normales e hinchados, el PH del semen fresco por acrosomas hinchados y el volumen de la alícuota por acrosomas rotos y acrosomas ausentes.

El volumen del semen fresco influyó sobre el porcentaje de acrosomas normales y acrosomas hinchados pero no sobre acrosomas rotos o ausentes, sin embargo no se encuentra alguna explicación biológica para este fenómeno, a no ser que en eyaculados con mayor volumen, que generalmente se presentan en los primeros eyaculados después de un período de reposo, existe una correlación entre volumen del semen fresco y acrosomas normales, aunque no fue significativa fue negativa lo que indica que a mayor volumen menos acrosomas normales, debido probablemente a que existen más espermatozoides en vías de eliminarse por el conducto deferente y son expulsados en el eyaculado. Por otro lado la correlación entre volumen del semen fresco y acrosomas hinchados, aunque no es significativa fue positiva por lo tanto al aumentarse el volumen de eyaculado se aumentan los acrosomas hinchados, este efecto contrario de una misma característica sobre acrosomas normales o hinchados, puede apoyar la teoría antes expuesta sobre períodos de descanso del semental y el volumen eyaculado.

El ajuste a pH del semen fresco fue significativo para acrosomas hinchados, existe alguna relación entre el pH del líquido seminal y su osmolaridad, lo que sugiere que a mayor pH posiblemente el medio fue hipotónico lo que propicia que la célula espermática absorba agua en cantidad suficiente para hincharla pero es escasa para causar su ruptura, por lo que acro-

somas rotos o ausentes no fueron afectados por esta covariable.

Los acrosomas rotos se vieron afectados por el volumen de la alícuota y la correlación fue negativa, por lo que a mayor volumen menos acrosomas rotos, éste fenómeno puede ser explicado igualmente porque a mayor volumen seminal y mayor volumen de diluyente a 37°C en el tubo, la pérdida de calor de la muestra suele ser menor y por lo tanto existe mayor amortiguación del choque frío.

Aunque en algunos trabajos no se encuentra correlación entre la motilidad progresiva y el daño acrosomal (Grajales y Trejo 1991; Anaya y Hernández, 1995), Bernabé y Tello (1985), observaron que si existió una correlación entre las anormalidades acrosómicas y la motilidad progresiva, pero estos autores se lo atribuyeron al tipo de diluyente, mientras que en este trabajo se utilizó el mismo diluyente con la variable de la proporción de yema de huevo.

El volumen de la alícuota, afectó el porcentaje de espermatozoides con acrosoma roto, siendo la correlación negativa por lo que a mayor volumen menor cantidad de acrosomas rotos pero a diferencia que en los acrosomas ausentes en este caso la correlación si fue significativa lo que apoya la teoría de a mayor volumen seminal - mayor volumen de diluyente - menor pérdida de calor de la muestra - menor efecto de un choque frío.

En este trabajo se obtuvo una mejor motilidad progresiva del semen descongelado de ovinos, con la dilución del 20 % con respecto a la dilución de yema al 10%, pero estos resultados son inferiores a los reportados por Tuli y col. (1994), los cuales obtuvieron 44.5% y 45.6% de motilidad progresiva post descongela-

ción, sin embargo Valencia y col.(1994), obtuvieron un rango de motilidad progresiva de 58.7 a 62.7% de motilidad progresiva del semen congelado y por Medrano (1993), que trabajó con una concentración de yema de huevo al 24% y reporta una motilidad progresiva del 50% post descongelación.

Roca y Martínez. (1993), mencionan que aunque existen variaciones en el plasma seminal, no se puede considerar que estos cambios afecten la calidad del semen, debido a que no se han encontrado diferencias significativas entre los parámetros que estudiaron; motilidad, morfología, e integridad acrosomal. Además que no se puede establecer una concentración de yema, determinada de manera individual para cada eyaculado con fines de dilución del semen ovino, debido a distintas variaciones que suelen presentar los machos entre si.

Para establecer el tiempo de enfriamiento adecuado en la sobrevivencia de los espermatozoides en congelación, al ser comparados los tiempos de descenso se observó que la motilidad progresiva del semen congelado fue mejor en el tiempo de descenso de 135 minutos, que mantuvo más tiempo el semen en refrigeración, obtuvo una motilidad progresiva de 38.0% y una recuperación de la motilidad progresiva la cual fue de 48.5% contra 12.2% de motilidad progresiva y 15.6% de la recuperación de la motilidad progresiva cuando la temperatura bajó en 60 minutos. Al comparar estos resultados con los de otros autores, Almquist y col. (1982), al enfriar el semen bovino en 3.5 horas de 28 a 5°C obtuvieron mayor porcentaje de acrosomas intactos (61%) utilizando una concentración del 20% por lo cual se puede comparar que en este trabajo se obtuvo un porcentaje mayor de acrosomas normales

el cual fue de 88.1%, para la refrigeración en 60 minutos y 89.8 para la velocidad de enfriamiento de 135 minutos. Por lo cual se concluye que el efecto de enfriamiento no afecta significativamente la integridad acrosomal. Dhani y Shani (1993), utilizando el diluyente TRIS como base y una concentración de yema al 10% obtuvieron un porcentaje de 40.8% de motilidad progresiva al descongelar y utilizar un enfriamiento de 30 a 50°C durante un período de dos horas lo cual fue similar a lo obtenido en este trabajo.

VI. CONCLUSIONES.

Después de haber analizado los resultados se concluye que el efecto de la concentración de yema de huevo del 20 % resultó con mejor protección que la de 10 % en relación con la motilidad progresiva y recuperación de la motilidad progresiva del semen descongelado.

El tiempo de enfriamiento más adecuado para la preservación y congelación del semen ovino fue el transcurrido en 135 minutos para cambiar de 37°C a 5°C. Contra 60 minutos para este cambio de temperatura.

Las proporciones del daño acrosomal no se vieron afectadas en este trabajo por las dos concentraciones de yema utilizadas ni por el tiempo de enfriamiento.

De acuerdo a las diferencias y alteraciones que se observaron en el presente trabajo, se recomienda seguir investigando en relación al tiempo de enfriamiento que pueda mantener la mejor viabilidad después de la congelación del semen de ovinos.

VII BIBLIOGRAFIA.

- Almqvist, J.O. Grube, K.E y Rosenberger, J.L. 1982. Effect of thawing time on fertility of bovine spermatozoa in french straws. *J. Dairy. Sci.* 65:824
- Anaya, G.J.L. y Hernández, G.M. 1995. Evaluación de tres concentraciones de yema de huevo sobre algunas características del espermatozoide caprino utilizando dos velocidades de enfriamiento durante dos horas antes de la congelación. Tesis de licenciatura F.E.S. Cuautitlán U.N.A.M. México
- Azawi, O.I., Al Dalash, S. y A. Y Juma, F.T. 1993. Effect of different diluents on Shanl goat semen. *Small Ruminant Research.* (9):343-52
- Barba, C.G.J. 1990. Efecto de la yema de huevo de gallinas Rhode Island Leghorn y del centrifugado sobre algunas características del semen caprino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma De México.
- Barrón, U.C., 1981. Colección y evaluación de semen de carnero e inseminación artificial. Memorias del curso de actualización y los aspectos de producción ovina: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-8
- Bearden y Fuquay, 1982. Reproducción Animal Aplicada. Editorial Manual Moderno S.A. México. D.F. 143 -185
- Bernabé, S.M. y Tello, A.B 1995 Correlación entre la motilidad progresiva y las anomalías acrosómicas en el semen de carnero fresco y congelado en pastillas en tres diferentes diluyentes. Tesis de licenciatura. F.E.S. Cuautitlán. U.N.A.M. México. 22
- Castro, M.P., y Peralta, L.M., 1986. Efecto del glicerolado lento y rápido sobre la motilidad progresiva y el daño acrosomal en espermatozoides congelados de carnero y macho caprino. Tesis de Licenciatura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. 1-8
- Corteel, J.M. 1981. Collection processing an artificial insemination of goat semen. Academic press Inc. London. 24:30-32
- De Lucas, T.J. 1986. Inseminación artificial y producción en caprinos en Arbizu A.S. Editorial S.A. México D.F.
- Deka, B. C. and Rao, A.R. 1986. Effect of storage at -196°C on quality of frozen goat semen with and without seminal plasma in TRIS based extender. 16:65-69.
- Dhami, A.J. and Sahni, K. L. 1993. Evaluation of different cooling rates equilibration period and diluents for effect on deep freezing enzyme leakage and fertility of taurine bull spermatozoa. *Indian. Vet. Institute Izatnagar Theriogenology.* 40:1269-1280
- Deshpande, S.B. and Mehta, V.M. 1991. Effect of dilutors and different glycerol levels on pre freeze and post freeze sperm motility and like sperm count in surti buck semen. *Indian. J. of Anim. Science.* 1093-1095
- Duanel, L. Garner y E.S.E Hafez. 1989. Espermatozoides y Plasma seminal. Editorial Interamericana. 5a ed.
- Durán Del Campo, A.C. 1980. Anatomía y Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial en ovinos. Editorial Agropecuaria. Hemisferio Sur S.R.L. Uruguay. 71:124-153

Esquivel, C.H. 1986. Comparación de cuatro técnicas para evaluar la morfología espermática en semen caprino fresco y congelado. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 2-8

Evans, G. y Maxwell, W.M.C. 1987. Salamon Artificial Insemination of sheep and goat. Butterworths Australia. 194

Fraser, A.F. 1962. A technique for freezing goat semen and results of small breeding, Trial the Canadian Veterinary Journal vol.3. 1-5

Faote, W.C. 1989. Breeding without check in Estrus: Artificial Insemination on a fixed time schedule. The quarterly magazine of dairy goat artificial insemination.

Gilbert, G.R. and Ahnquist, J.O. 1978. Effects of processing Procedures on post thaw acrosomal retention and motility of bovine spermatozoa packaged in 3- ml straws at room temperature. The Pennsylvania State University Park. Journal of Animal Science. 225-231

Gomes, W.R. 1977. Artificial Insemination. En. Reproduction in Domestic Animals. ED. Cole, H.H. y Cupps, P.T. Ed. Academic Press. U.S.A.: 257-284.

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

Gurpaul, S. Pangawkar, G.R. and Jagli, S. 1992. Influence of some sugar on buffalo bull spermatozoa at different stages of cryopreservation. Department of Veterinary Obstetrics and Gynecology Punjab Agriculture University. *Indian Vet.*, 69:808-810

Gutiérrez, T.P., Vallejo, O.E. y Trejo, G.A. 1990. Comparación entre sementales de la fertilidad del semen congelado en ovinos, Memorias del tercer congreso Nacional de Producción Ovina. AMTEO, Tlaxcala, México. 156-158.

Hancock, J.L. 1957. The morphology of boar spermatozoa. *J. Royal Microbiol. Soc.* 76:84-97

Hopkins, A. and Evans, G. 1989. Artificial Insemination, veterinary endocrinology and reproduction.

Jainuden, M.R. y Hafez, E.S.E. 1989. Inseminación Artificial En Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 5ª ed. editado por: Hafez E.S.E. Interamericana. México D.F. 497-520

Jondet. 1968. Rapid freezing of bull semen conditioned in straws. VIII International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination Assocation Trento Italy.

Ksubramanyam, A. Panduranga, M. Sriram, S.K. and Ramachan, L.M. 1991. Anote on microbial flora of buck semen. Department of Animal Reproduction College of Veterinary Science.

López, G.A.P.M., y Valencia. 1982. Técnica descriptiva de la colección, evaluación y congelación de semen de carnero Pellibuey. VIII. Congreso Nacional de Bularía. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias.

Lunca, N. 1965. The present state of artificial insemination in sheep and goat. *World Review of Animal Production.* 1(1):73-80

Medrano, H.J.A. 1993. Congelación de semen de carnero diluido en Tris y en leche, filtrado a través de borosilicato. Tesis de Maestría en producción animal (ovinos y caprinos). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. México

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

Noriega, N.L., 1984. La Inseminación Artificial en Caprinos. En revista ganadero. 9(5):70

Pérez, E.D.A. 1980. Reproducción Animal e Inseminación artificial y trasplante de embriones. Editorial Científica Médica. Barcelona. 228-239;396:404-407

Ritor, A.J. and Salamon, S. 1983. Fertility of fresh and frozen thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 38:49-59

Roca, J. y Martínez, E. 1993. Seasonal variation in fructose and citric acid in seminal plasma of Murciano Grandina goat. *Small Ruminant Research.* 10:219-964

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. 1994-1995. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim. Reprod. Sci.* 1-23

Singh, L.P. Meur, S.K. and Npurhey, L.N. 1992. Leakage of transaminases during preservation of buck semen. *Indian Vet. Research. Institute Izatnagar, Uttar Pradesh.*

Sorensen, A.M. 1982. Reproducción Animal. Principios y prácticas. Editorial McGraw Hill. México. 125-143

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1980). Principales procedures of statistics. A Biometrical Approach second edition. McGraw Hill. Inc.

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

Tuli, R.K. and Holtz, W. 1992. The effect of zwitterion buffers on the freezability of boer goat semen. Institute of Animal Husbandry and Genetic. University of Göttingen, Albrecht- thaeer-weg.

Visser, D. 1974 The effect of freezing. Method on the Survival of Ram Espermatozoa. *S. Afr. J. Animal. Sci.* 4:157-163.

Wells, M.E. y AWA, O.A. 1970. New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 53(2):227-232.

Zenjanis, R. 1985. Reproducción Animal. Diagnóstico y Técnicas terapéuticas. Limusa, México. 147

ANEXOS.

ANEXO 1.
COMPARACION ENTRE EL SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO PARA LOS EFECTOS DEL TERMOMETRO
SOBRE LAS CARACTERISTICAS ESPERMATICAS DE SEMEN CONGELADO DE OVINO (MEDIA ± E.E.)

TERMOMETROS	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA	A C R O S O M A S.			
			NORMALES	HINCHADOS	ROTOS	AUSENTES
DIGITAL FRESCO	77.9±0.99	100.0±0.00	90.9±1.0	3.7±0.39	4.90±0.77	0.31±0.0
DIGITAL DESCONGELADO	12.2±1.65	15.6±2.07	88.1±0.7	7.3±0.47	4.02±0.27	0.40±0.9
QUIMICO FRESCO	78.1±0.99	100.0±0.00	90.9±1.0	3.6±0.39	5.00±0.77	0.31±0.0
QUIMICO DESCONGELADO	38.0±1.65	48.5±2.08	89.8±0.7	6.2±0.47	3.22±0.27	0.51±0.10

ANEXO 2.
COMPARACION ENTRE EL SEMEN FRESCO Y DESCONGELADO PARA LOS EFECTOS DEL NIVEL DE YEMA DE HUEVO DURANTE LA REFRIGERACION DE 37°C A 5°C SOBRE LAS CARACTERISTICAS ESPERMATICAS DE SEMEN CONGELADO DE OVINO. (MEDIA ± E.E.).

YEMA	MOTILIDAD PROGRESIVA	RECUPERACION DE MOTILIDAD PROGRESIVA	A C R O S O M A S.			
			NORMALES	HINCHADOS	ROTOS	AUSENTES
10% FRESCO	78.09±0.95	100.00±0.00	90.76±1.02	4.93±0.37	4.11±0.74	0.19±0.07
10% DESCONGELADO	22.28±1.73	28.75±2.17	89.88±0.78	7.21±0.55	3.26±0.29	0.53±0.10
20% FRESCO	78.00±1.02	100.00±0.00	91.18±1.09	2.43±0.40	5.80±0.80	0.43±0.07
20% DESCONGELADO	27.92±1.87	35.50±2.35	88.17±0.85	6.39±0.60	3.98±0.31	0.38±0.11