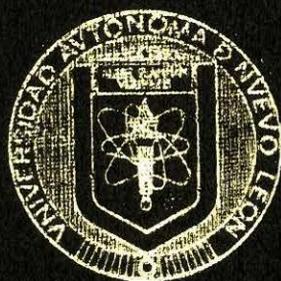


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



EXTRACCION, EVALUACION Y CONSERVACION
DE SEMEN DE GANADO CAPRINO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA

PRESENTA

MA. ELENA CONTRERAS MARTINEZ

MONTERREY, N. L.

ABRIL DE 1978

THE UNIVERSITY OF CHICAGO



1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

THE UNIVERSITY OF CHICAGO



1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

THE UNIVERSITY OF CHICAGO



1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

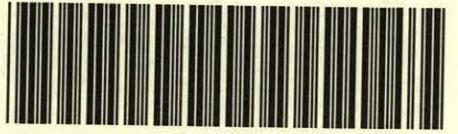
1961

1962

1963

1964

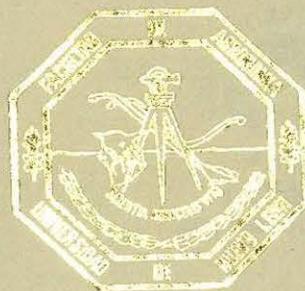
663
5
383



1080061146

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



EXTRACCION, EVALUACION Y CONSERVACION
DE SEMEN DE SANADO CAPRINO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA
PRESENTA

MA. ELENA CONTRERAS MARTINEZ

MONTERREY, N. L.

ABRIL DE 1978

T
SF383
-S
-MB
CFS

040.636
FA 4
1978


Biblioteca Central
Maana Solidaridad


BU Ragi Rangsi File
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

F. Tesis

A MI ESPOSO:

ING. VICTORIANO FCO. ALATORRE GONZALEZ

CON TODO MI AMOR

A MI HIJO:

VICTOR AZDRUBAL

CON CARÍÑO

A MIS PADRES:

PEDRO CONTRERAS MORENO

MA. LUISA MARTINEZ DE CONTRERAS

CON MI ETERNO CARIÑO Y AGRADECIMIENTO

A MIS HERMANOS:

PEDRO

ADRIANA

MARTIN

MI ESPECIAL GRATITUD Y SINCERO AGRADECIMIENTO A MI ASESOR
ING. ANGEL J. VALENZUELA MERAZ

EN IGUAL FORMA AGRADEZCO A
M.V.Z. SERGIO R. TEMBLADOR
ING. LUIS A. MENA
SU GRAN APOYO BRINDADO A LA REALIZA-
CION DE ESTE TRABAJO.

A MIS AMIGOS:

MARIA ELENA GARCIA GARCIA

DELFINA MARTINEZ GRACIA

Y EN ESPECIAL AL

ING. JAIME ARMENDARIZ MARTINEZ

POR LA AYUDA PRESTADA EN LA REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO

A MIS MAESTROS Y COMPAÑEROS

I N D I C E

| | P A G I N A |
|--|-------------|
| 1.- INTRODUCCION | 1 |
| 2.- LITERATURA REVISADA. | 3 |
| Esperma. | 3 |
| Espermatozoide | 4 |
| Calidad del Semen. | 6 |
| Extracción y Recolección de Semen. | 7 |
| Métodos para manipular el Semen. | 9 |
| Evaluación del Semen | 9 |
| Densidad y Concentración | 10 |
| Motilidad. | 11 |
| Color. | 14 |
| pH | 14 |
| Exámen Microscopico. | 14 |
| Diluyentes del Semen | 17 |
| Adición a los diluyentes de Sulfamidas y antibióticos | 19 |
| Acción de Glicocola y Glicerina en los - Diluyentes | 20 |
| Envasado del Semen | 22 |
| Congelación del Semen. | 23 |
| Descongelación del Semen | 24 |

| | P A G I N A |
|--|-------------|
| 3.- MATERIALES Y METODOS | 26 |
| Manejo de los Sementales | 26 |
| Metodología del Procesado. | 27 |
| Pruebas de Laboratorio | 28 |
| Glicerolización y equilibración. | 30 |
| Llenado y Sellado de las Ampolletas. | 31 |
| Congelación con Vapores de Nitrógeno | 32 |
| Evaluación | 32 |
| Descongelación | 32 |
| 4.- RESULTADOS Y DISCUSION | 34 |
| 5.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 44 |
| 6.- RESUMEN. | 45 |
| 7.- BIBLIOGRAFIA | 47 |

INDICE DEL APENDICE

P A G I N A

| | |
|--|----|
| 1.- TECNICA DEL HEMATOCITOMETRO PARA LA DETERMINA CION DE LA CONCENTRACION DE ESPERMATOZOIDES - POR CENTIMETRO CUBICO. | 52 |
| 2.- TECNICAS DE CONTEO | 52 |
| 3.- TECNICAS DE TINCION. | 53 |
| 4.- LISTA DE MATERIAL Y EQUIPO | 55 |
| 5.- RELACION ENTRE SEMENTAL Y TIEMPO | 57 |

INDICE DE TABLAS

| TABLA | | P A G I N A |
|-------|--|-------------|
| 1 | Porcientos de motilidad, fechas de <u>congelación</u> y descongelación de semen de ganado caprino. 1978. | 35 |
| 2 | Transformación de porcientos de motili <u>dad</u> a Angulos Bliss V <u>Arco sen. del - ángulo</u> . 1978. | 36 |
| 3 | Análisis de varianza para porcientos de motilidad en la evaluación y conservación de semen de ganado caprino. 1978. | 39 |
| 4 | Diferencias mínimas significativas para efectos del semental en la evaluación y conservación de semen de ganado caprino. 1978. | 40 |
| 5 | Diferencia mínima significativa para efectos de tiempo de congelado en la evaluación de semen de ganado caprino. 1978. | 41 |

| | | |
|---|--|----|
| 6 | Diferencia mínima significativa para comparación de efectos entre semental y tiempo de congelado en la evaluación y conservación de semen de ganado caprino. 1978. | 43 |
|---|--|----|

I N T R O D U C C I O N

La Ganadería en México, es una de las principales actividades de la Economía, tanto por su importancia social, como por la extensión de territorio en que se desarrolla, teniendo por lo tanto una gran responsabilidad en la alimentación de la población y deber siempre de tratar de aumentar su eficiencia en el aprovechamiento de los recursos disponibles.

En la reproducción animal, estriba uno de los factores más importantes para el éxito de la ganadería, esto es presionando la selección a partir de sementales que se utilizan como progenitores, con el objeto de un mejor aprovechamiento.

Para estas necesidades se requiere el máximo de tecnificación en las explotaciones pecuarias utilizando métodos más adecuados para así poder maximizar la producción. La obtención de estas metas durante un tiempo corto requiere el uso de técnicas tales como la mejor utilización de sementales, altamente seleccionados transmisores de caracteres deseables y la aplicación de la inseminación artificial.

La mejor utilización del semen de cualquier semental -- con características genéticas se obtiene siguiendo las técnicas de extracción, evaluación, procesado y congelado, siendo posible mantenerlo por tiempo indefinido y utilizarlo en - -

cualquier momento.

El objeto de éste trabajo fué probar el proceso de extracción, evaluación, dilución, envasado y congelado de semen de ganado caprino por medio de vapores de nitrógeno líquido y - su evaluación después de dicho proceso.

LITERATURA REVISADA

Debido a la continua actividad investigadora que se realiza en todos los campos de la fisiología, se han tomado en cuenta las siguientes revisiones:

Esperma.

Desde el punto de vista biológico, el esperma podría definirse como un conjunto de células vivas vehiculadas en un medio líquido en el cual son capaces de desarrollar procesos bioquímicos con intercambio de productos de naturaleza distinta, derivados de la propia actividad metabólica del zoospermo (cinesis espermática).

Desde el punto de vista fisiológico, la palabra esperma es sinónimo de eyaculado y, en tal caso, el eyaculado es la resultante de la mezcla de la secreción testicular con las secreciones correspondientes a las glándulas progenitales o anexas al aparato genital masculino en el momento de la eyaculación y previa erección, mientras que la polución es la evacuación involuntaria del material seminal, fenómeno que se diferencia de la eyaculación por no ir acompañado de erección.

En el aspecto bioquímico, el esperma debe entenderse no sólo como el producto de la secreción testicular, sino como la adición al mismo de secreciones glandulares encaminadas a resolver la anabiosis zoospermica existente antes de la eyaculación y mientras los espermatozoides se encuentran en los

reservorios naturales preeyaculatorios (epidídimo y ampollas de Henle). La eyaculación resulta, por tanto, un fenómeno -- previo a la siembra o gametización del material fecundante -- sobre el aparato genital, puesto que el referido fenómeno significa potenciación de la capacidad fecundante en los espermatozoides. (15).

Esperma (Semen).

Producto de la secreción testicular y de las glándulas anexas, eyaculado por los machos después de la madurez sexual. Líquido opaco, blanquizco o blanco amarillento, viscoso y de olor característico que varía según las especies. Su composición difiere en los distintos animales; contiene cerca del -- 90% de agua, proteínas (albúminas, globulinas, nucleoproteínas, mucina), calcio y ácido fosfórico, y su materia orgánica incluye además de los elementos celulares y algunos leucocitos, lípidos, ácido cítrico, glóbulos de grasa, etc. Los espermatozoides constituyen la parte sustancial del esperma; en una eyaculación normal, su número es de unos mil millones, cantidad que no varía mucho de una especie a otra, pero que disminuye con el servicio continuo y vuelve a ser normal después de un período de reposo sexual.

Espermatozoide (Espermatozoo, espermio).

Célula sexual del macho, elemento esencial del esperma formada en los tubos seminíferos de los testículos.

Consta de cabeza, cuerpo o pieza intermedia y cola o -- flagelo. La primera es un núcleo, y como tal, está constituida esencialmente de nucleoproteína; durante la fecundación se fusiona con el óvulo para formar el huevo o cigoto. La -- actividad de la cola determina la movilidad del espermatozoo, el cual es más activo a temperaturas orgánicas; las bajas temperaturas lo tornan inactivo y las altas lo destruyen. Para -- llegar al exterior, los espermatozoides recorren el siguiente trayecto: de los tubos seminíferos en que se originan, pasan a los tubos rectos que aquellos forman al reunirse, y de allí a la red de conductos aplanados, denominada rete testis, en la cual los tubos rectos se abren. Continúan por los conductillos eferentes que parten de la mencionada red y, fuera ya del testículo, se vierten en un conducto exterior común, el conducto epididimario a través del cual llegan al conducto deferente. Pasan luego al conducto eyaculador, que penetra en la próstata y se abre en la uretra, de donde los espermatozoides son -- expulsados durante la eyaculación. (17).

Calidad del Semen.

Los machos jóvenes eyaculan menos cantidad de semen que los machos adultos, el volúmen de la eyaculada varía de .25 a .5 ml. pero es usualmente su variación de 1 a 1.5 ml. la calidad tiende a descender cuando el volúmen de la eyaculada excede los 2 ml. (13), el semen normal debe ser de aspecto lechoso con partes incoloras. La coloración anormal puede deberse a contaminación por pus o por orina. La viscosidad varía en los diferentes individuos y también de acuerdo con el período en que se obtiene la muestra. Estas tienden a hacerse menos viscosas con el tiempo. Se clasifican arbitrariamente como espesa, normal y fluída. (7).

La concentración media por mililitro varía entre 2,000 y 3,300 x 10⁶ espermatozoides, el pH oscila alrededor de 6.6 y es esencial que el eyaculado contenga por lo menos del 60 al 80% de espermatozoides móviles. el por ciento de espermatozoides anormales no debe sobrepasar el 10%. (8).

En particular, el esperma de los pequeños rumiantes suele llevar impurezas que corresponden a descamación epitelial, etc. y, a veces, se trata de esmegma acumulado en el prepucio tras largos períodos de reposo sexual. Este fenómeno es más frecuente en el macho cabrío que en el morueco. (15)

Extracción y Recolección de Semen. -

Comunmente se emplean varios métodos para recoger el semen destinado al exámen de laboratorio o a la inseminación artificial. El procedimiento de elección es el de la vagina artificial puesto que con él se consigue recoger la totalidad del líquido eyaculado en la misma proporción que ocurre en forma natural y evita la contaminación accidental. (7)

El instrumento se llena con agua tibia para tener una temperatura interna de 43.5 a 44.5 grados centígrados. La cantidad de agua que llena la vagina se debe ajustar para permitir la inserción del pene erecto sin resistencia excesiva. La válvula de aire diseñada especialmente permite regular la presión interna bombeando o soplando aire. (21).

Otra de las técnicas de obtención de semen es la de recuperación, se le permite al macho montar a la hembra y el semen es recuperado por cuchareo o sifoneado de la vagina. Una esponja puede ser colocada en la vagina antes de la copulación y extraído inmediatamente después. Algunas veces se usa una cubierta de goma en el semental. El semen recuperado de la vagina es de menos calidad pero puede ser usado para evaluación. (19).

Uno de los métodos más comunmente usados es el del electroeyaculador, las primeras experiencias en torno a la elec-

troeyaculación en los mamíferos se deben a Batteli, en el --
año 1922. (15).

El principio de éste método se base en la estimulación eléctrica sobre los centros erectos y eyaculador. La exita--
ción sexual y la influencia de centros superiores inhibido--
res o excitadores, no tienen efecto sobre los resultados. De
este modo pueden obtenerse erección y eyaculación en sementa
les renuentes al contacto sexual. (21).

El Profesor Gunn, (15) de la Facultad de Veterinaria
de Sidney, empleó por vez primera la electroeyaculación en -
óvidos y cápridos. mediante una tecnología que, en síntesis,
consistía en hacer pasar una corriente alterna a través de -
dos electrodos (rectal y lumbar), colocados en las regiones
respectivas. El electrodo lumbar tenía forma de aguja y se -
colocaba en posición intramuscular; el segundo electrodo, que
era cilíndrico se introducía unos 10 cms. en el ano.

El electroeyaculador ha permitido obtener la erección y
colección de muestras representativas sin efectos secundarios
en la mayoría de los sementales. Pueden obtenerse la erección
a una frecuencia de 20 a 25 ciclos y corriente de 2 a 5 vol--
tios. Frecuencias de 25 a 30 ciclos con voltaje de 3 a 10 vol
tios son suficientes para la eyaculación. La estimulación se
hace intermitente usando descargas de medio a tres cuartos de

minuto a diferentes intervalos. (21).

Métodos para manipular el Semen.

Los espermatozoides son sensibles a los efectos de una gran variedad de factores ambientales que podrían modificar las características del semen y disminuir los índices de concepción. Durante la manipulación del semen deben observarse las siguientes precauciones generales:

- a) Proteger la muestra del shock térmico.
- b) No exponer el semen a productos químicos nocivos o al agua.
- c) Evitar la exposición al aire, a la luz solar y a otras radiaciones.
- d) No agitar la muestra.
- e) La vagina artificial u otros objetos de recolección deberán estar esterilizados.
- f) Es importante asear y secar el prepucio y el abdomen.
- g) Recortar los pelos largos del prepucio.
- h) Limpiar cuidadosamente el pene. (14)

Evaluación del Semen.-

Exámen macroscopico.

1.- Medición del volúmen del semen.- Este suele variar enormemente en los diferentes individuos y en distintas ocasiones en el mismo animal. Debe anotarse el volúmen total al comparar las concentraciones de espermatozoides para conocer su número total por eyaculación. (7). El eyaculado de óvidos y

cápridos, lo mismo que el de los rumiantes en general, está integrado por cuatro fracciones o emisiones líquidas, producto de las glándulas de Littre, vulvouretrales, próstata, ampollas de Henle y glándulas vesiculares. El mayor volúmen corresponde a las glándulas próstata y ampollas de Henle; de aquí que, en función de este fenómeno biológico, podamos admitir que el eyaculado de óvidos y cápridos sea de escaso volúmen y alta concentración zoospermica. (15).

El volúmen de un eyaculado en promedio es de 1.1 ml., -- con variación de 0.1 hasta 3.0 ml. (11)

2.- Densidad y Concentración.- La densidad depende y varía con la concentración de células espermáticas. Las determinaciones de la densidad por inspección visual está sujeta a variaciones subjetivas y por lo tanto sólo dan una idea aproximada de la concentración espermática. La densidad de las muestras obtenidas por electroeyaculación, es por lo general más baja que las muestras colectadas en vagina artificial. (21).

Por otra parte la densidad está relacionada con el contenido en electrolitos, mucinas y elementos formes (células de decamación). Como valor normal en el esperma recién colectado tenemos Densidad = 1,038. En el macho cabrío, la viscosidad del eyaculado es mayor que en el morueco y todavía se acentúa en las primeras horas de su conservación in vitro. En el ma--

cho cabrío puede considerarse como normal una densidad = 1,060, cuando se determina antes de transcurridas dos horas de la recogida. (15) .

La viscosidad del semen se puede clasificar arbitrariamente como espesa, normal y fluída. (7).

La concentración (Densidad) es el número de células - - usualmente dadas como espermatozoides por unidad de volúmen ó espermatozoides por eyaculación. Puede ser estimado visualmente con alguna frecuencia siguiendo prácticas extensivas ó conociendo -- concentraciones. (19) .

Se determina también haciendo una evaluación grossa ó a simple vista como:

- a) Pobre.- Acuoso, apariencia clara y delgada.
- b) Regular.- Algo nubloso como leche desnatada.
- c) Bueno.- Altamente concentrado, con opaquez.

Se puede determinar la concentración por medio de cuenta microscopica, esta se lleva a cabo con una pipeta de dilución y hematocitometro. (19).

3.- Motilidad.- La motilidad en el semen del macho cabrío es mayor que la motilidad que se presenta en los bovinos, así - es que hay estandares diferentes que deben adoptarse en la -

evaluación de tal semen. (13). La valoración de la motilidad masiva ofrece las mismas consideraciones y metodología que en el toro según Pérez y Pérez (15). La técnica más sencilla consiste en enfocar al microscopio una gota de ayaculado; la observación debe hacerse a pequeño aumento, a fin de obtener -- una impresión más amplia del material observado. Cuando sea - posible, debe trabajarse con platina calentable (termostática), dada la influencia que tiene la temperatura sobre la motilidad de los zoospermos, llegando a establecer el shock térmico en circunstancias extremas. La motilidad del eyaculado debe apreciarse lo antes posible después de la recogida del esperma.

Se procede a medir la motilidad en base a porcentaje de acuerdo a las siguientes relaciones:

Motilidad en Masa

| | |
|---------|---|
| + + + + | Formación rápida nebulosa. |
| + + + | Formación buena nebulosa. |
| + + | Flujo fuerte con algunos <u>en</u> cogimientos. |
| + | Flujo pobre. |
| - | No hay motilidad. |

Motilidad Individual

| | | |
|---------|----------|---|
| + + + + | 90-100 % | Buen movimiento hacia <u>ade</u> lante. |
|---------|----------|---|

| | | |
|--------------|---------|--|
| + + + + — | 80-90 % | Buena motilidad hacia adelante. |
| + + + | 70-80 % | Buena motilidad hacia adelante. |
| + + + | 60-70 % | Motilidad hacia adelante. |
| + + — | 40-60 % | Motilidad hacia adelante o en círculos. |
| | 60 % | De buena motilidad hacia <u>a</u> adelante. |
| + + — | 20-40 % | Buena motilidad ó |
| | 40-60 % | Motilidad regular hacia <u>ade</u> lante ó más de: |
| | 60 % | Motilidad satisfactoria. |
| + | 20 % | Buena motilidad hacia adelante ó |
| | 20-40 % | Motilidad regular |
| | 40-60 % | Motilidad satisfactoria. |
| — | | Poca o no motilidad.(13) |

El semen fresco bueno deberá tener de un 85-95% de es-
perma móvil. el semen con una motilidad de 50-60% puede ser
usado pero no deberá ser diluído. el aspecto de mayor signi-
ficancia acerca de la motilidad está en la persistencia de -
ésta, un buen semen retiene este grado de motilidad antes de
ser almacenado. (10)

4.- Color.- Los machos cabríos eyaculan semen de color blanco que varía hasta el color crema y un color limón. (13). Los eyaculados de tonos claros y verdosos son de escasa concentración, y por tanto, con pocas posibilidades fecundantes. (15).

5.- pH.- La concentración iónica del eyaculado en los pequeños rumiantes ofrece gran interés biológico, hay que tener en cuenta que el pH del eyaculado varía considerablemente después de la recogida; por ello, debe valorarse lo antes posible. Zalgami (15), en el año de 1939, demostró que la conservación in vitro del eyaculado a temperaturas inferiores a la orgánica - 30 grados centígrados, trae como consecuencia la disminución del pH.

La alcalinidad del eyaculado puede ser consecuencia del cansancio sexual. Se considera como normal el pH del morueco como 6.8 siendo este valor un poco superior en el macho cabrío.

En el macho cabrío se aprecia una particular tendencia a la alcalinidad a las 10-14 horas de recogido el esperma.

Exámen Microscópico.-

1.-Examen de semen no teñido.- Este incluye una prueba de motilidad, se observan particularmente las células espermáticas a fin de calcular el porcentaje total de células móviles en -

el eyaculado. (21).

2.- Exámen de semen teñido.-Coloración para determinación de vivos-muertos, los espermias muertos pueden absorber tintura y aparecen del mismo color del fondo, los espermias vivos resisten a la tintura y aparecen claros. (19).

3.- Morfología.- Bretschneiders (13), desarrollo una tabla que es aconsejable para el uso y el exámen de la morfología del esperma. Dussardier y Szumowski (13), reportaron 2.75% de anomalías morfológicas en el esperma del macho cabrío incluyendo un 2% con colas curvadas y .3% que presentaban -- pérdidas de colas.

Anormalidades en el semen de machos cabríos

- a) Pérdida de la capa de la cabeza.
- b) Capa de la cabeza anormal.
- c) Forma de la cabeza anormal.
- d) Pérdida de la cabeza anormal.
- e) Base de la cabeza anormal.
- f) Parte media anormal.
- g) Colas encorvadas
- h) Colas en espiral.
- i) Inserciones excentricas de la cola.
- j) Gota protoplásmica persistente en el cuello.
- k) Gota protoplásmica persistente en la parte media.

Concentración. -

En caprinos la concentración media por mililitro varía en tre 2,000 y 3,000 x 10⁶ espermatozoides. (8)

Las variaciones en la concentración del esperma del eyaculado en pequeños rumiantes han sido profusamente estudiadas, se admiten como valor normal, el de 8;800,00 con variaciones de 1 a 3 millones. La concentración del eyaculado del macho - cabrío es un poco menor que la del morrueco. En general puede considerarse normal 800,000 zoospermos por milímetro cúbico, si bien con frecuencia se obtienen concentraciones superiores. (15).

La determinación del número de espermas por mililitro - es conveniente que se haga en forma rápida. Es conveniente y en la actualidad se utiliza dosis de esperma diluido que van en 0.5 ml. de volúmen y cuya concentración estará en un rango aproximado de 150 x 10⁶ espermatozoides por ml. (6)

En un trabajo llevado a cabo por González Stagnaro (12), en las muestras seleccionadas por su óptima calidad se determino el índice de dilución, fijando una cantidad aproximada de 400-600 x 10⁶ espermatozoides/ml. al momento de la dilución - para obtener una posible concentración de 100-200 x 10⁶ espermatozoides mótiles por dosis (0.5 ml.) luego de la descongelación media (150 x 10⁶), lo que significaba en su caso trabajar

normalmente con una dilución entre 1:4 y 1:8.

Branton et al. (1953 a) y Old et al (1953) (13), presentaron evidencias de una declinación en la fertilidad cuando el número total de espermatozoides por inseminación fué disminuyendo de 12 a 8 millones.

El número de espermatozoides requeridos para inseminación de algunas especies está más o menos claramente definida, pero la mejor sugerencia estimada de esto es alrededor de 125 millones de espermatozoides móviles por oveja, dos billones por cerda y aproximadamente igual número por yegua. (20).

Diluyentes del Semen.-

Básicamente existen tres grupos de diluyentes para el semen y son:

- a) Constituidos fundamentalmente a base de Citrato sódico, de fosfatos y otros componentes salinos, pero con la adición de yema de huevo.
- b) Integrados por leche entera o descremada, y de otras substancias.
- c) Sintéticos, o de composición distinta de los anteriores. (4)

La investigación de muchos diluyentes apropiados para la

preservación del espermatozoide de macho ha fuertemente inspi rado por los trabajos realizados en vistas de mantener fecun didad de espermas en los bovinos. Los resultados obtenidos -- antes de la inseminación con la ayuda del esperma conservado con diferentes diluyentes salinos no ha sido del todo satis-- factorio (Gotze, Rosenberger, Dauzier, Ron y Aamdal). (6)

El ampliador utilizado por American Breeders Service, Inc. contiene citrato de sodio, yema de huevo fresca, glicerina y antibióticos. El semen una vez ampliado y coloreado está lis to para ser envasado. (1).

Las pruebas efectuadas en los diluyentes estandares a -- diferentes porcentajes de dilución variado desde 1:1 a 1:15 - se llevarón a cabo por varios investigadores(Hampel, Buhmann, Rosenwinkel, Blokhuis y Buhmann) (13), obtuvieron buenos re sultados con 3.5 por ciento de citrato de sodio más 5% de ye ma de huevo a un por ciento de dilución de 1:4 y con 4% de ci trato de sodio más 5% de yema de huevo a un por ciento de dilu ción de 1:6. Porcentajes de dilución mayor mostraban una reduc ción de la motilidad del esperma después de 72 horas bastante marcada.

El diluyente ideal deberá tener las siguientes caracte-- rísticas:

- a) Que tenga presión osmótica isotónica con la sangre y que sea capaz de conservar ésta presión durante el -

- almacenamiento.
- b) Que proporcione un equilibrio apropiado de elementos minerales esenciales para la vida de las células espermáticas.
 - c) Que proporcione nutrientes a las células espermáticas tanto en los procesos metabólicos aerobios como anaerobios.
 - d) Que brinde lipoproteínas, lecitinas o ambas para proteger a los espermatozoides contra el shock frío.
 - e) Que proporcione los medios químicos para amortiguar los productos terminales tóxicos del metabolismo de los espermatozoides.
 - f) Que proporcione una fuente de sustancias reductoras para proteger a las enzimas celulares que contienen sulfhidrilos.
 - g) Que no contenga sustancias, productos bacterianos, o microorganismos infecciosos patógenos para los espermatozoides, el aparato reproductor de la hembra, los procesos de fecundación, y la implantación y desarrollo del huevo fecundado. (14)

Adición a los diluyentes de Sulfamidas y Antibióticos.-

A pesar de todas las precauciones higiénicas tomadas durante la recolección y la manipulación que acompaña a la adición las muestras espermáticas contienen un tanto por cien

to de gérmenes contaminantes capaces de tener una participación desfavorable, sobre la contaminación del esperma o bien eventualmente sobre la fertilidad. Salibury y Knodt, Bratton y colaboradores (8), señalarón que la adición de sulfamida - al diluyente, en la proporción de 300 mgs/100 ml., aseguraba un mejor supervivencia de los espermatozoides.

Heller, Easterbrooks, Lieberman, Plastridge (5), trabajarón en éste tema y encontrarón efectos benéficos en la aplicación de antibióticos en el semen. El efecto de los antibióticos en la conservación del semen se ha estudiado tanto in vivo como in vitro. Así, Almquist y sus colaboradores (5) -- llegarón a la conclusión de que concentraciones de antibióticos superiores a 1,000 unidades/centímetro cúbico son perjudiciales in vitro. Tennaux y sus colaboradores (5), demostrarón que el semen puede guardarse durante largos períodos cuando la penicilina agregada no pasa de 1,000 unidades por centímetro cúbico.

Acción de Glicocola y Glicerina en los Diluyentes.-

Se debe añadir glicerina o glicerol al diluyente del semen para congelar ya que ésta tiene una acción protectora sobre los espermatozoides. Posiblemente la acción consista en - que la glicerina invade la célula para restituir parte de su agua libre y expulsar en cierta proporción a los electrolitos reduciendo así su concentración intracelular hasta un grado -

inocuo en el momento de la congelación.(16).

Roy y Bishop (8), han recomendado el medio de yema de huevo con glicocola y que responde a la siguiente composición: solución de glicocola al 4% e igual volúmen de yema de huevo. A 4 grados centígrados, éste medio asegura in vitro una supervivencia de duración más larga que la que se consigue con los medios de yema de huevo fosfatada o citratada. Lo mismo sucede con la glicerina cuando se adiciona a medios conservadores a 5 grados centígrados y empleados de inmediato.

En los laboratorios especializados se emplean diversas sustancias para tratar el semen antes de su congelación. - Corrientemente se diluye al 1:25 con sangre de vaca, yema de huevo y otros productos. Mas tarde, se añade una preparación tampon con glicerina para obtener un producto final diluido al 1:50 con un 10% de glicerina. (9).

Cuando Polge, Smith y Parker (14), anunciaron su descubrimiento de que el glicerol brinda plena protección a los - espermatozoides durante la congelación y el deshielo, se ampliaron intensamente las perspectivas para el mejoramiento - genético mediante inseminación artificial.

En un estudio realizado por González Stagnaro (12) como diluyente se utilizó el Laiciphos 271 sin adición de yema de

huevo ni antibióticos, derivados en dos fracciones, según la concentración del glicerol:

- a) (Laiciphos diluido 98%, glicerol 2%).
- b) (Laiciphos diluido 94%, y glicerol 6%).

Antes de su incorporación al glicerol se calentaba en baño maría a 55-60 grados centígrados, dando resultados favorables.

Envasado del Semen.-

Existen primordialmente tres formas de envasar el semen y son las siguientes:

- a) Ampolletas.- Son pequeños frascos de vidrio, de forma parecida a una botella y, generalmente está representada en dos tamaños: 1 ml. y 0.5 ml. El semen se envasa en la ampolleta y ésta se sella con una llama de acetileno, luego se congela siguiendo los pasos determinados.
- b) Pajilla.- Son tubos delgados de plástico, generalmente de 13.5 cms. de largo, que se fabrican en dos diámetros: 3 y 2 mm. en un extremo posee un tapón hecho de dos pequeños tapones fibrosos con una pequeña cantidad de polvo polivinílico que se gelifica, el otro extremo es sellado de la misma forma o por medio de calor.
- c) Pastillas (pellet).- Es una gotita congelada de se--

men, de un volúmen de ,1 ml. que se forma al dejar -
gotear el semen en un bloque de hielo seco, en peque-
ñas depresiones, colocado dentro del vapor de nitró-
geno. El pellet debe de ser reducido antes de ser uti-
lizado para inseminar. (2)

Congelación del Semen.-

La conservación de un esperma se encuentra asegurada,-
por una parte, por la adición de sustancias nutritivas al -
medio, y por otra, por un descenso progresivo de la tempera-
tura con el fin de reducir la actividad fundamental espermá-
tica hasta un límite a partir del cual aún pueda ser reversi-
ble. La anabiosis o adormecimiento del esperma es necesaria
para reducir los procesos catabólicos. Esta anabiosis es rea-
lizada por la refrigeración y la conservación a bajas tempe-
raturas. (8)

Wagner y Bonfert mencionados por (6), aconsejaban un -
tiempo de enfriamiento que iba de + 21 grados centígrados a
+ 5 grados centígrados en cinco horas. Esto era con el mejor
diluyente de esa época. Las temperaturas de conservación en
general para unos van de 0 a +5 grados centígrados en pocos
casos se aconseja de un 10 a 12 grados centígrados.

El semen diluido puede ser congelado siguiendo estos pa-
sos adicionales según Merck (3), mantener el semen diluido

a 5 grados centígrados durante 6 horas. Colocar el semen en ampolletas de 1 ml., colocar los viales cerrados en alcohol isopropílico o etílico a 5 grados centígrados y se disminuye la temperatura añadiendo pequeñas cantidades de nieve carbónica, la temperatura debe de reducirse 1 grado centígrado por minuto desde 5 grados hasta -15 grados centígrados, 5 grados centígrados por minuto desde -15 hasta -50 grados centígrados y 20 grados centígrados por minuto desde -50 hasta -79 -- grados centígrados. Posteriormente pasarlas a nitrógeno líquido hasta una temperatura de -195.8 grados centígrados.

Bonfert y Wettke mencionados por (6) obtuvieron resultados satisfactorios al agregar un diluyente de leche descremada que contenía el 7% de glicerol, los tiempos para llevar a cabo la equilibración fuerón de 4 horas aproximadamente. El diagrama de congelación se caracteriza por los siguientes comportamientos térmicos seguidos:

| | | |
|-------|-------|------------|
| + 5°C | -10°C | 1°C/minuto |
| -10°C | -17°C | 2°C/minuto |
| -17°C | -79°C | 4°C/minuto |

La temperatura de conservación fué de -79°C.

Descongelación del Semen.-

Según Corteel (6) antes de ser utilizados el esperma - diluído en cantidades que van de .7 ml. y congelado en un pe

queño tubo de vidrio y cuya parte superior está obstruida por un tapón de plástico, se inmergen en un baño de agua a 37 grados centígrados. Después de que el esperma del macho se ha diluido en el tubo, el operador termina la operación frotando ligeramente el tubo con la palma de la mano. Una vez obtenida la descongelación, se procede a colocar el semen en los genitales de la cabra.

Sin embargo, Mc. Donald (14) recomienda que es necesario descongelar el semen en un recipiente aislante que contenga medio litro de agua limpia, el semen de las ampolletas se descongela en unos 10 minutos y debe utilizarse en inseminación aproximadamente una hora después del deshielo.

González Stagnaro (1976) (12), realizó la descongelación sumergiendo la pajilla en agua caliente a 75°C. durante 10 segundos.



BIBLIOTECA
GRADUADOS

MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Inseminación Artificial del I.T.E.S.M. y en el corral del mismo. Su desarrollo se realizó en dos fases, la primera que consistió en la recolección del semen por medio del electroeyaculador en cuatro caprinos puros de la raza Nubia de 1.4 años de edad, la segunda fase fué de análisis y manejo de ese semen en el laboratorio.

Los pasos de recolección, evaluación, dilución y congelación se llevaron a cabo en un período comprendido del 28 de Febrero hasta el 31 de Marzo de 1978, en éste trabajo se utilizaron los eyaculados más favorables para ser procesados.

Los cuatro sementales fuerón seleccionados de un lote aproximadamente de 20 chivatos, se escogieron de acuerdo a las pruebas de fertilidad hechas con anterioridad en el Centro de Fomento Caprino San José de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L. de donde era su procedencia.

Manejo de los Sementales.-

A su llegada a los corrales del I.T.E.S.M., los chivos fueron desparasitados externa e internamente con Coumaphos y clorhidrato de Levamisol respectivamente de acuerdo a las recomendaciones del Laboratorio, así mismo, se vitaminaron con

Vitamina A (500,000 U.I./ml.), D₃ (175,000 U.I.), E (50 U.I.).
 La alimentación fué a base de concentrado con un contenido de 16% de proteína más alfalfa achicalada y avena en estado fresco, todos a libre acceso.

Materiales.- (Ver apendice)

Metodología del Procesado.-

Preparación del Diluyente:

Diluyente "A"

| Componentes | Cantidad/100 ml. |
|-----------------------|------------------|
| Citrato de sodio | 77 ml. |
| Yema de huevo fresco | 20 ml. |
| Glicerina | 3 ml. |
| Fructosa | 1.25 gr. |
| Penicilina Procaínica | .25 ml. |
| D.H. Estreptomina | .25 ml. |

Diluyente "B"

| Componentes | Cantidad/100 ml. |
|-----------------------|------------------|
| Citrato de sodio | 69 ml. |
| Yema de huevo fresco | 20 ml. |
| Glicerina | 11 ml. |
| Fructosa | 1.25 gr. |
| Penicilina procaínica | .25 ml. |
| D.H. Estreptomina | .25 ml. |

Primeramente en un matraz de aforación de un litro se -- aforaban 29 gr. de Citrato de sodio en agua bidestilada, el -- cuál se adicionaba a los diluyentes en las proporciones antes descritas.

El diluyente A una vez preparado era colocado a baño maría a 37.5 grados centígrados para que a la hora de adherirlo al semen tuvieran la misma temperatura, el diluyente B, se colocaba en el cuarto frío a una temperatura de 5°C.

Pruebas de Laboratorio.-

Una vez recolectado el semen, pasaba al laboratorio, era colocado a baño maría a una temperatura de 37.5 grados centígrados para que se mantuvieran a una temperatura corporal, de esa eyaculación se tomaba una gota y se colocaba en un portaobjetos para ser observados al microscopio y determinar su motilidad masal. En esa misma gota, se tomaba en cuenta su pH.

El siguiente paso era el determinar la concentración de espermatozoides/cm. cúbico, ésta determinación se hacía por -- medio de un Hematócitómetro ó cámara de Spencer y con una pipeta para glóbulos rojos.

Se tomaba otra gota de semen para mezclarla con tinta -- china y hacer la prueba de morfología (porcentaje de espermatozoides normales y anormales).

Se determinaba el volúmen total final y se anotaba con los demás datos de motilidad, pH y concentración para hacer la especificación del número de ampolletas que resultarían de esa muestra.

Esa determinación se tomaba de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de ampolletas} = \frac{\text{Concentración}/c^3 \times \% \text{ motilidad}}{\# \text{ de espermatozoides necesarios para 1 ml. de semen diluído.}} \times \text{Volúmen}$$

Se tomó como base el número de espermatozoides necesarios para 1 ml. de semen diluído de 100×10^6 .

Ejemplo:

| | |
|----------------------|--------------------|
| Concentración/ c^3 | 6430×10^6 |
| Volúmen | 1.4 |
| Motilidad | 10% |

$$\begin{array}{r} 6430 \times 10^6 \\ \times .8 \\ \hline 5144 \times 10^6 \% \quad 100 \times 10^6 \end{array}$$

| | |
|--------------|--------------------------|
| 51.44 | |
| $\times 2.4$ | |
| <hr/> | |
| 123.45 | Diluyente + semen |
| 2.4 | Semen |
| <hr/> | |
| 121.05 | Diluyente total (A + B) |

El diluyente se incorpora en dos fases, por lo tanto el diluyente total se dividía en dos.

$$121.05\% \div 2 = 60.52 \text{ ml.}$$

ó sea: 60.52 ml. Diluyente A

60.52 ml. Diluyente B

Inmediatamente después de determinada la cantidad de diluyente que llevaría la muestra, se le agregaba el diluyente A al semen y se guardaba en el cuarto frío, donde se el fué bajando la temperatura hasta 5°C.

La manera de bajar la temperatura fué la siguiente: se colocaba el matraz donde venía el semen con el diluyente en un vaso de precipitados con agua, éste se colocaba en el cuarto frío y se le iba bajando la temperatura a razón de 1/2°C/-minuto hasta llegar a 5°C. con hielo picado.

Glicerolización y equilibración.-

El semen diluído a la mitad de su dilución final y a una temperatura de +5°C., estaba listo para agregarle el diluyente B el cual se ponía en tres fases cada 15 minutos, el diluyente B estaba también a 5°C.

El diluyente B con la fracción de más glicercol era incorporado con una probeta graduada lentamente y gota a gota.

Al terminar la glicerolización o sea teniendo el semen ya completamente diluido se dejaba reposar por un espacio de tiempo de tres horas no más, estas tres horas eran necesarias para que los espermatozoides se equilibraran con el diluyente. Este proceso es llamado de equilibrio o estabilización.

Llenado y sellado de las Ampolletas.-

Inmediatamente después de la equilibración se procedía al llenado de las ampolletas de 1 ml. utilizando para esto una jeringa automática, el siguiente paso era sellar las ampolletas con un aparato especial para esto, que proveía una flama de gas natural y oxígeno, este paso debería hacerse lo más rápido posible y con cuidado para evitar el calentamiento de la ampolleta, todo esto se llevaba a cabo dentro del cuarto frío teniendo un cuidado especial que la temperatura se mantuviera a 5°C.

Ampolleta que iba siendo sellada, se checaba que estuviera en buenas condiciones de sellado. Siendo selladas se colocaban en un recipiente con hielo molido para que fueran bajando su temperatura hasta 0°C., posteriormente se colocaban en los bastones y éstos se colocaban en otra charola extendida con hielo molido.

Congelación con Vapores de Nitrógeno.-

Las ampolletas colocadas en los bastones eran introducidas en la canastilla del termo, la cual se metía a éste a una altura aproximadamente de 10 cm. para que los vapores superficiales fueran congelando las ampolletas, esto se hacía por un espacio de 5 minutos, se iba bajando lentamente hasta llegar a un tiempo de 10 minutos y se sumergía completamente la canastilla para que alcanzaran una temperatura de -196°C .

Evaluación.-

Se evaluaron cuatro muestras de cada procesado a diferentes intervalos de tiempo y únicamente determino su motilidad, el muestreo fué de la siguiente manera:

- Evaluación de 24 ampolletas de cada procesado.
- 4 ampolletas a la 1/2 hora después de congeladas.
- 4 ampolletas a las 2 horas después de congeladas.
- 4 ampolletas a las 12 horas después de congeladas.
- 4 ampolletas a las 24 horas después de congeladas.
- 4 ampolletas a los 6 días después de congeladas.
- 4 ampolletas a los 15 días después de congeladas.
- 24 ampolletas evaluadas por congelación en total.

Descongelación.-

La descongelación de las ampolletas a evaluar se llevó a cabo en hielo picado y agua por un lapso de 10 minutos, en recipientes que evitaran la luz directa (vasos de hielo seco).

Los análisis estadísticos realizados fueron completamente al azar, pruebas de Duncan para comparación de medias y bloques al azar



BIBLIOTECA
GRADUADOS

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del presente trabajo se presentan en tablas y figuras para su mejor interpretación.

Para la realización de los análisis estadísticos se llevó a cabo la transformación de las observaciones (Porcentajes) a Angulos Bliss $V \sqrt{\text{Arco sen. del ángulo}}$, de acuerdo a (18). Dicha transformación fué con el objeto de eliminar los porcentajes por no existir método estadístico apropiado. (Tabla 2).

Los datos recabados en porcentajes fueron los observados al microscopio haciendo la aclaración que en dichos datos se siguió el mismo criterio y efectuados por la misma persona. (Tabla 1).

De acuerdo a la clasificación por motilidad individual al momento de la extracción era en la forma siguiente:

| Sementales | Motilidad Individual |
|------------|----------------------|
| UNIK-47 | 80 % |
| UNIK-55 | 80 % |
| UNIK-58 | 80 % |
| UNIK-56 | 60 % |

Dicha motilidad está considerada por (13) como Buena en el caso de los tres primeros y Satisfactoria en el caso del último.

TABLA 1.- PORCIENTOS DE MOTILIDAD, FECHAS DE CONGELACION Y DESCONGELACION DE SEMEN DE GANADO CAPRINO. 1978.

| FECHA DE CONGELACION | Tiempo de Descongelación | | | | | |
|------------------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 1/2 Hora | 2 Horas | 12 Horas | 24 Horas | 6 Días | 15 Días |
| | % de Motilidad | % de Motilidad | % de Motilidad | % de Motilidad | % de Motilidad | % de Motilidad |
| 2 Marzo-78 Semental UNIK-47 | 70% 70% 70% 70% | 70% 70% 70% 70% | 60% 60% 60% 60% | 60% 60% 60% 60% | 60% 60% 60% 60% | 40% 40% 40% 40% |
| 11 Marzo-78 Semental UNIK-55 | 30% 30% 30% 30% | 40% 40% 40% 40% | 50% 50% 50% 50% | 40% 40% 40% 40% | 40% 40% 40% 40% | 20% 20% 10% 30% |
| 15 Marzo-78 Semental UNIK-58 | 40% 40% 40% 40% | 40% 40% 40% 40% | 40% 40% 40% 40% | 40% 40% 40% 40% | 40% 40% 40% 40% | 20% 30% 30% 10% |
| 16 Marzo-79 Semental UNIK-56 | 30% 30% 30% 30% | 20% 20% 20% 20% | 40% 40% 40% 40% | 30% 30% 30% 30% | 10% 20% 40% 40% | 10% 10% 30% 20% |

TABLA 2.- TRANSFORMACION DE PORCIENTOS DE MOTILIDAD A ANGULOS BLISS V ARCO sen. del ángulo. 1978

| | | | | | | |
|----------|-----------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| SEMENTAL | TIEMPO | 56.79 | 56.79 | 56.79 | 56.79 | 227.16 |
| | 1/2 Hora | | | | | |
| | 2 Horas | 56.79 | 56.79 | 56.79 | 56.79 | 227.16 |
| | 12 Horas | 50.77 | 50.77 | 50.77 | 50.77 | 203.08 |
| UNIK-47 | 24 Horas | 50.77 | 50.77 | 50.77 | 50.77 | 203.08 |
| | 6 Días | 50.77 | 50.77 | 50.77 | 50.77 | 203.08 |
| | 15 Días | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | | $\Sigma = 305.12$ | $\Sigma = 305.12$ | $\Sigma = 305.12$ | $\Sigma = 305.12$ | $\Sigma \Sigma = 1220.48$ |
| | 1/2 Hora | 33.21 | 33.21 | 33.21 | 33.21 | 132.84 |
| | 2 Horas | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | 12 Horas | 45.00 | 45.00 | 45.00 | 45.00 | 180.00 |
| UNIK-55 | 24 horas | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | 6 Días | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | 15 Días | 26.56 | 26.56 | 18.44 | 33.21 | 104.77 |
| | | $\Sigma = 222.46$ | $\Sigma = 222.46$ | $\Sigma = 214.34$ | $\Sigma = 229.11$ | $\Sigma \Sigma = 888.37$ |
| | 1/2 Horas | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | 2 Horas | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | 12 Horas | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| UNIK-58 | 24 Horas | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | 6 Días | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| | 15 Días | 26.56 | 33.21 | 33.21 | 18.44 | 111.42 |
| | | $\Sigma = 222.71$ | $\Sigma = 229.36$ | $\Sigma = 214.59$ | $\Sigma = 896.02$ | |
| | 1/2 hora | 33.21 | 33.21 | 33.21 | 33.21 | 132.84 |
| | 2 Horas | 26.56 | 26.56 | 26.56 | 26.56 | 106.24 |
| | 12 Horas | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 39.23 | 156.92 |
| UNIK-56 | 24 Horas | 33.21 | 33.21 | 33.21 | 33.21 | 132.84 |
| | 6 Días | 18.44 | 26.56 | 39.23 | 39.23 | 123.46 |
| | 15 Días | 18.44 | 18.44 | 33.21 | 26.56 | 96.65 |
| | | $\Sigma = 169.09$ | $\Sigma = 177.21$ | $\Sigma = 204.65$ | $\Sigma = 198.00$ | $\Sigma \Sigma = 748.95$ |

La determinación del número de espermatozoides/ml. se -- realizó en forma rápida como lo indica (6).

La concentración espermática del eyaculado fué de:

| Semental | Concentración/c ³ |
|----------|------------------------------|
| UNIK-47 | 3,860 x 10 ⁶ |
| UNIK_55 | 6,430 x 10 ⁶ |
| UNIK-58 | 3,700 x 10 ⁶ |
| UNIK-56 | 3,930 x 10 ⁶ |

Esta concentración sobrepasa la media mencionada por (8) que indica que para caprinos la concentración media varía entre 2,000 y 3,000 x 10⁶ espermatozoides/ml. Admitiéndose como valor normal el de 8;800,000 con variaciones de 1 a 3 millones (15).

El eyaculado en volúmen para los cuatro sementales fué de: 1.7, 2.4, 1.7 y 2.0 c.c. para el UNIK-47, 55, 58 y 56 respectivamente. Dicho volúmen concuerda con (11).

En los diferentes eyaculados el pH fué de 7 considerando se normal según (15).

La coloración del semen se consideró normal por la mencionada en (13) que debe de ser blanca con variaciones a crema de aspecto lechoso.

Los diluyentes empleados (A y B) son los que se utilizan para semen de bovino en el Centro de Reproducción e Inseminación Artificial de Ajuchitlán, Qro. No encontrando dificultad

en su uso. En la equilibración del semen diluído se tomó el criterio en forma personal, debido a no encontrar referencias en lo que respecta a ganado caprino.

La falta de experiencia para el sellado de las ampollitas implicó una pérdida de un 14% en los primeros procesos, reduciendo a un 6% en los últimos. Esto es que se presentaba defectuosa la ampolleta, ó bien mal sellada.

La congelación por medio de vapores de nitrógeno no presentó dificultad alguna, contando con un termo de boca ancha como en éste caso, ya que el número de bastones en una canastilla es mayor, lo que facilitó introducir todos al mismo -- tiempo.

La evaluación a los diferentes períodos de congelado se efectuó siguiendo el mismo sistema para todos, esto es, sacando 4 ampollitas del mismo baston; encontrandose en algunos casos variación de un tiempo a otro, o sea, que el porcentaje de motilidad fué menor, aumentando en el siguiente muestreo.

La Tabla 3 muestra el análisis estadístico de % de motilidad, el cual resulta altamente significativo, lo que indica que los tratamientos son diferentes.

TABLA 3. Análisis de varianza para % de motilidad en la evaluación y conservación de semen de ganado caprino, 1978.

| G L. | S. C. | C. M. | F. cal. | F. Teórica |
|-------------------------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------------------------|------------|
| Factor A a-1=3 | Ayy=4989.98 | $CMA = \frac{Ayy}{3} =$ 1663.3266 | $\frac{CMA}{CME(a)} =$ 108.4780** | 5.95 3.49 |
| Error (a) a(r-1)=12 | Eyy(a)=184.36 | $CME = \frac{Eyy}{12} =$ 15.3333 | | |
| Factor B b-1=5 | Byy=1951.67 | Byy/5 = 390.334 | $\frac{CMB}{CME(b)} =$ 8.1623** | 3.33 2.73 |
| A B (a-1)(b-1) = 15 | (AB)yy= 717.32 | (AB)yy/15= 47.8213 | $\frac{CM(AB)}{CME(b)} =$ 5.3236** | 2.35 1.83 |
| Error (B) a(b-1)(r-1) 4(5)(3)=60 | Eyy(b) = 538.97 | Eyy(b)/60 = 8.9828 | | |

** Altamente significativo.

Las pruebas de Duncan para comparar efectos del semental, resultaron ser que el semental UNIK-47 es el mejor, pero diferente a los demás, y que el UNIK-55 y 58 son iguales entre sí, y diferentes al UNIK-56. (Tabla 4).

Tabla 4.-Diferencias mínimas significativas para efectos del semental en la Evaluación y Conservación de semen de ganado caprino. 1978.

| | 2 | 3 | 4 |
|-----|-------|------|------|
| .05 | 2.46 | 2.58 | 2.66 |
| .01 | 3.452 | 3.63 | 3.70 |

Para probar efectos de tiempo de congelado, la prueba de Duncan resultó ser que a las 12 horas de congelado se encontró mayor % de motilidad al descongelarse, comparada con los demás tiempos; y que a la 1/2 hora, 2, 24 horas y 6 días eran iguales pero diferentes a 15 días. (Tabla 5)

Tabla 5.- Diferencia mínima significativa para efectos de tiempo de congelado en la Evaluación y Conservación de semen de ganado caprino. 1978.

| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----|------|------|------|------|------|
| .05 | 2.12 | 2.23 | 2.30 | 2.35 | 2.39 |
| .01 | 2.81 | 2.93 | 3.01 | 3.08 | 3.12 |

La comparación de efectos entre semental y tiempo de congelado se muestran en la Tabla 6.

Respecto a la relación entre semental y tiempo de congelación resulta ser que $a_1 b_1$, es igual que $a_1 b_2$ y diferente a todos los demás, $a_1 b_2$ es diferente a todos los demás, pero -- igual que $a_1 b_1$, y que $a_1 b_3$ es igual que $a_1 b_4$ y $a_1 b_5$ pero -- diferente que $a_1 b_6$ y a todos los demás; $a_1 b_4$ es igual que -- $a_1 b_5$ y $a_1 b_3$, pero diferente a todos los demás; $a_1 b_6$ es igual que $a_2 b_2$, $a_2 b_4$, $a_2 b_5$, $a_3 b_1$, $a_3 b_2$, $a_3 b_3$, $a_3 b_4$, $a_3 b_5$, -- $a_4 b_3$ y diferente a todos los demás; $a_2 b_2$ es igual que $a_2 b_4$, $a_1 b_6$, $a_2 b_5$, $a_3 b_1$, $a_3 b_2$, $a_3 b_3$, $a_3 b_4$, $a_3 b_5$, $a_4 b_3$ y diferente a todos los demás; $a_2 b_4$ es igual que $a_1 b_6$, $a_2 b_2$, $a_2 b_5$, $a_3 b_2$, $a_3 b_1$, $a_3 b_3$, $a_3 b_4$, $a_3 b_5$, $a_4 b_3$ y diferente a todos los demás; $a_2 b_5$ es igual que $a_1 b_6$, $a_2 b_2$, $a_2 b_4$, $a_2 b_5$, $a_3 b_1$, $a_3 b_2$, $a_3 b_3$, $a_3 b_4$, $a_3 b_5$, $a_4 b_3$ y diferente a todos los demás;

$a_3 b_1$ es igual que $a_1 b_6$, $a_2 b_2$, $a_2 b_4$, $a_2 b_5$, $a_3 b_2$, $a_3 b_3$, -
 $a_3 b_4$, $a_3 b_5$, $a_4 b_3$ y diferente a todos los demás; $a_3 b_2$ es -
 igual que $a_1 b_6$, $a_2 b_2$, $a_2 b_4$, $a_2 b_5$, $a_3 b_1$, $a_3 b_3$, $a_3 b_4$, $a_3 b_5$,
 $a_4 b_3$ y diferente a todos los demás; $a_3 b_3$ es igual que $a_1 b_6$,
 $a_2 b_2$, $a_2 b_4$, $a_2 b_5$, $a_3 b_1$, $a_3 b_2$, $a_3 b_4$, $a_3 b_5$, $a_4 b_3$ y dife-
 rente a todos los demás; $a_3 b_4$ es igual que $a_1 b_6$, $a_2 b_2$, $a_2 b_4$,
 $a_2 b_5$, $a_3 b_1$, $a_3 b_2$, $a_3 b_3$, $a_3 b_5$, $a_4 b_3$ y diferente a todos --
 los demás; $a_3 b_5$ es igual que $a_1 b_6$, $a_2 b_2$, $a_2 b_4$, $a_2 b_5$, $a_3 b_1$,
 $a_3 b_2$, $a_3 b_4$, $a_4 b_3$ y diferente a todos los demás; $a_4 b_3$ es i--
 gual que $a_1 b_6$, $a_2 b_2$, $a_2 b_4$, $a_2 b_5$, $a_3 b_1$, $a_3 b_2$, $a_3 b_4$, $a_3 b_5$
 y diferente a todos los demás. (Ver Apéndice).



BIBLIOTECA
GRADUADOS

TABLA 6.- Diferencia mínima significativa para comparación de efectos entre semental y tiempo de congelado en la evaluación y conservación de semen de ganado Caprino. 1978.

| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| .05 | 2.12 | 2.25 | 2.30 | 2.35 | 2.39 | 2.42 | 2.45 | 2.47 | 2.49 | 2.50 | 2.52 | 2.53 | 2.54 | 2.55 | 2.56 | 2.57 | 2.58 | 2.59 | 2.59 | 2.59 | 2.59 | 2.59 | 2.59 |
| .01 | 2.79 | 2.93 | 3.01 | 3.08 | 3.12 | 3.16 | 3.19 | 3.22 | 3.25 | 3.27 | 3.28 | 3.31 | 3.32 | 3.33 | 3.34 | 3.35 | 3.37 | 3.37 | 3.39 | 3.39 | 3.39 | 3.39 | 3.39 |

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- 1.- El análisis de varianza completamente al azar, resultó - altamente significativo.
- 2.- El mejor tiempo para la evaluación del porcentaje de moti lidad fué a las 12 Horas para todos los sementales.
- 3.- El mejor semental fué el UNIK-47.
- 4.- No hay ningún problema en el congelado de semen de ganado caprino.
- 5.- Se recomienda probar diferentes diluyentes.
- 6.- Se aconseja llevar a efecto pruebas prácticas de Insemina ción Artificial en cabras.

R E S U M E N

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Inseminación Artificial del I.T.E.S.M., iniciandose éste el 28 de Febrero al 31 de Marzo de 1978.

El objetivo fué probar el proceso de extracción, evaluación, dilución, envazado, congelado de semen de ganado caprino por medio de vapores de nitrógeno líquido y su evaluación después de dicho proceso.

Se utilizaron cuatro sementales de la raza Nubia propiedad del Centro de Fomento Caprino San José de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., de una edad aproximada de 1.4 años, los cuales fueron alimentados con concentrado (16%), alfalfa achicalada y avena en estado fresco, todos a libre acceso, los cuales fueron desparasitados externa e internamente y vitaminados antes de iniciar el trabajo,

Se utilizó el material y equipo requeridos previamente esterilizados.

El método de extracción fué empleando el electroeyeculador, el de motilidad fué observación al microscopio y el de concentración con la técnica del Hematocitómetro, el color a observación a simple vista y el pH. con papel indicador.

Los diluyentes estaban a base de citrato de sodio, yema de huevo, glicerina, fluctuosa y antibióticos.

El proceso de estandarización, envasado y congelado fué dentro del cuarto frío.

La descongelación se realizó con hielo picado y agua. - Las evaluaciones posteriores fueron a 1/2, 2, 12, 24 horas, 6 y 15 días de congelado, encontrándose que la mejor resultó ser la de 12 horas para todos los sementales. Encontrándose diferencia altamente significativa en el análisis estadístico realizado.

El mejor semental respecto a porcentaje de motilidad fué - el UNIK-47 no encontrándose problema en el congelado de semen de ganado caprino; recomendándose probar diferentes diluyentes y llevar a efecto pruebas prácticas de Inseminación Artificial en Cabras.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Anónimo.- Manual para Técnicos inseminadores. American - Breeders Service. p. 25.
- 2.- Anónimo 1976, Mejoramiento de la eficiencia reproductiva del ganado bovino para carne. Servicio de Extensión Agrícola de Texas, Departamento de Ciencia Animal, Ed. Hemisferio Sur. pp. 147-148.
- 3.- Anónimo 1970, El manual Merck de Veterinaria 1a. Edición Ed. por Merck & C.O. Inc. pp. 1185-1186.
- 4.- BONADONA T. 1962, Fisiología de la Reproducción y Fecundación Artificial Ganadera. Traducción al castellano de la 1a. Edición en Italiano por C.L. de la Cuenca. Ed. Salvat. pp. 388, 489, 497.
- 5.- CERCOS AUGUSTO P. 1957, Los antibióticos y sus aplicaciones Agropecuarias. Ed. Salvat. pp. 312-313.
- 6.- CORTELL J.M. La reproduction de l'espece caprine. Laboratoire de Physiologie de la reproduction. Bull Tech. - - pp. 16-17.

- 7.- COFFIN DAVID L. 1966, Laboratorio clínico en Medicina --
Veterinaria. Ed. La Prensa Médica Mexicana - -
pp. 291-292.
- 8.- DERIVAUX J. 1976, Reproducción de los animales domésticos
Ed. Acribia. pp. 188,192-195.
- 9.- DYKSTRA R.R. 1970, Higiene Animal y prevención de enferme-
dades. 1a. Edición, Ed. Labor, S.A. p. 360.
- 10.- EARL PETERSON WILLIAM.1950, Dairy Science. Editel by J.B.
Lippincott Company, U.S.A. p. 264.
- 11.- GALL CRISTIAN, L. MENA. 1976, Producción Caprina y Ovina
1a. Parte, I.T.E.S.M. p.19.
- 12.- GONZALEZ STAGNARO CARLOS. 1975, Inseminación Artificial -
con Semen Congelado. Centro Experimental de Pro-
ducción Animal. Facultad de Ciencias Veterina- -
rias, Universidad de Zulia Maracaibo. Ed. Gráfi-
cas Orbe. pp. 153-154.
- 13.- MAULE J.P. 1962, The semen of animals and artificial inse-
mination. Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux.
pp. 92, 252-257.

- 14.- Mc. DONALD L.E. 1969, Reproducción y Endocrinología Veterinaria. 1a. Edición. Ed. Interamericana, S.A. pp. 197, 291-292, 296-297.
- 15.- PEREZ Y PEREZ F. 1966, Reproducción en Inseminación Artificial Ganadera. Editorial Científica Médica. - pp. 79, 302-318.
- 16.- SALISBURY G.W., N.L. VANDEMARK. 1964, Fisiología de la Reproducción e Inseminación Artificial de los bóvidos. Traducción al Castellano por José V. Santiago Luque de la 1a. Edición en inglés. Ed. Acribia. pp. 344, 437, 454.
- 17.- SCHOPFLOCHER ROBERTO. 1967, Cría y aprovechamiento de los Animales. Enciclopedia Agropecuaria Práctica. -- Tomo II. Ed. Ateneo. pp. 140-141.
- 18.- SNEDECOR GEORGE W., G.W. COCKRAN. 1971, Métodos estadísticos. 1a. edición en español de la 6a. edición en inglés. Ed. Continental. pp. 683-685.
- 19.- SORENSEN A. M. 1975, Repro-Lab. A Laboratory Manual for animal reproduction. 3a. edition. Edited for Kendall/Hunt Publishing, Company Dubuque Iowa. - - pp. 48-59.

- 20.- SWENSON MELVIN J. D. 1977, Physiology of domestic animals
9a. edition. Ed. Comstock Publishing Associates,
a division of Cornell University. Press/Ithaca -
and London. p. 819.
- 21.- ZEMJANIS R. 1974, Reproducción Animal Diagnóstico y Técnicas
Terapéuticas. 2a. reimpresión. Ed. Limusa. -
pp. 158-166, 199-200.

A P E N D I C E

Técnica del hematocitómetro para la determinación de la concentración de espermatozoides por centímetro cúbico.

Material Necesario:

- a) Hematocitómetro (tal como el OA Spencer Bright Line con el rayado doble mejorado de Neubauer).
- b) Cubre-objetos para el hematocitómetro.
- c) Pipeta para glóbulos con tubos de succión adecuados.
- d) Microscopio.
- e) Alcohol para enjuagar las pipetas.
- f) Solución de suero fisiológico más alcohol.
- g) Gasa.

Técnicas de Conteo:

- a) Aspirar semen fresco hasta la graduación 0.5 con una pipeta para globulos rojos.
- b) Aspirar una cantidad suficiente de suero fisiológico más alcohol hasta la marca 101, para lograr una dilución de 1:200.

- c) Agitar la pipeta por espacio de dos minutos para que su contenido se mezcle.
- d) Dejar salir varias gotas del extremo capilar para -- crear una acción positiva en el interior de la cámara de la pipeta.
- e) Secar la punta de la pipeta con gasa y se deja fluir una gota bajo el cubre-objetos colocado en el hematocitómetro.
- f) Colocar al microscopio el hematocitómetro y contar - los espermatozoides comprendidos en los cuatro cuadros de las esquinas y el cuadro central. No se contarán las células que toquen o se encuentren en las líneas divisoras en la parte superior, inferior y laterales.
- g) Por último se multiplica el número de células contadas en los cinco cuadros por 10^7 , para expresar la - concentración por centímetro cúbico.

Técnica de Tinción para Estudios Morfológicos de Espermatozoides.

Tinción con tinta China.-

La tinta china se centrifuga y se mezcla en la propor--

ción de cuatro gotas por una de semen. La mezcla se consigue extendiendo el colorante y el semen a lo largo del porta-objetos con la ayuda de otro limpio, esta extensión se seca al -- aire, se coloca sobre ella un cubre-objetos y se examina al - microscopio por inmersión en aceite.

Lista de material y equipo necesario para la conservación del semen desde su extracción hasta la congelación.

Extracción:

Agua

Sal

Jeinga con sonda para poner la solución salina

Tijeras

Tubos de ensaye graduados de vidrio esterilizados

Mango recolector

Embudo conicos de goma para la recolección del semen

Electroeyaculador completo

Papel

Evaluación:

Tubos de ensaye graduados

Microscopio completo

Hematocitómetro completo

Porta-objetos

Cubre-objetos

Goteros

Pipetas

Probetas 5, 10 ml.

Tinta china

Papel pH

Dilución:

Huevos de gallina frescos

Glicerina

Citrato de sodio

Fructosa

Penicilina



BIBLIOTECA
GRADUADOS

Estreptomina

Gasa

Matraces con tapones de huelo esterilizados

Agitadores

Probetas de 250 ml.

Mechero

Pipetas

Agua bidestilada

Congelación:

Ampolletas de cristal de 1 c.c. esterilizadas

Aparato llenador o jeringa automática

Aparato sellador especial

Cuarto frío

Bastones de aluminio para las ampolletas

Termo con nitrógeno

Cajas de hielo seco

Hielo

Oxígeno

Gas natural

Equipo necesario para llevar a cabo estas actividades -
en el laboratorio.

Autoclave

Baño maría

Lámparas de luz roja

Lámparas de luz ultravioleta

Relación entre Semental y Tiempo

$$a_1 b_1 = \text{UNIK-47} \times 1/2 \text{ Hora.}$$

$$a_1 b_2 = \text{UNIK-47} \times 2 \text{ Horas.}$$

$$a_1 b_3 = \text{UNIK-47} \times 12 \text{ Horas.}$$

$$a_1 b_4 = \text{UNIK-47} \times 24 \text{ Horas.}$$

$$a_1 b_5 = \text{UNIK-47} \times 6 \text{ Días.}$$

$$a_1 b_6 = \text{UNIK-47} \times 15 \text{ Días.}$$

$$a_2 b_1 = \text{UNIK-55} \times 1/2 \text{ Hora.}$$

$$a_2 b_2 = \text{UNIK-55} \times 2 \text{ Horas.}$$

$$a_2 b_3 = \text{UNIK-55} \times 12 \text{ Horas.}$$

$$a_2 b_4 = \text{UNIK-55} \times 24 \text{ Horas.}$$

$$a_2 b_5 = \text{UNIK-55} \times 6 \text{ Días.}$$

$$a_2 b_6 = \text{UNIK-55} \times 15 \text{ Días.}$$

$$a_3 b_1 = \text{UNIK-58} \times 1/2 \text{ Hora,}$$

$$; b_2 = \text{UNIK-58} \times 2 \text{ Horas.}$$

$$; b_3 = \text{UNIL-58} \times 12 \text{ Horas.}$$

$$3 b_4 = \text{UNIL-58} \times 24 \text{ Horas.}$$

$$a_3 b_5 = \text{UNIK-58} \times 6 \text{ Días.}$$

$$a_3 b_6 = \text{UNIK-58} \times 15 \text{ Días.}$$

$$a_4 b_1 = \text{UNIK-56} \times 1/2 \text{ Hora.}$$

$$a_4 b_2 = \text{UNIK-56} \times 2 \text{ Horas.}$$

$$a_4 b_3 = \text{UNIK-56} \times 12 \text{ Horas.}$$

$$a_4 b_4 = \text{UNIK-56} \times 24 \text{ Horas.}$$

$$a_4 b_5 = \text{UNIK-56} \times 6 \text{ Días.}$$

$$a_4 b_6 = \text{UNIK-56} \times 15 \text{ Días.}$$

a = Semental

b = Tiempo

