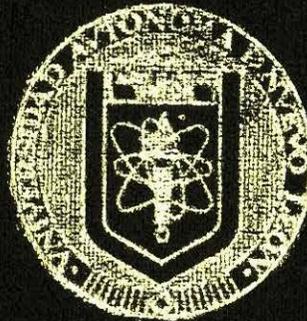


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE AGRONOMIA



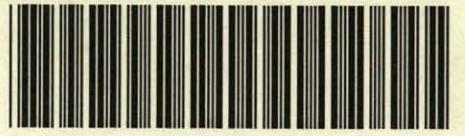
EVALUACION DE TIEMPO Y TEMPERATURA
DE DESCREMADO DE LECHE FRESCA DE
BOVINO QUE SE UTILIZARA COMO
DILUYENTE DE SEMEN CAPRINO

T E S I S A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA
PRESENTA:
LEONEL CRESPO RUIZ

MARIN, N. L.

JULIO DE 1986

T
SF383
.5
.M6
C74
C.1



1080061663

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



EVALUACION DE TIEMPO Y TEMPERATURA
DE DESCREMADO DE LECHE FRESCA DE
BOVINO QUE SE UTILIZARA COMO
DILUYENTE DE SEMEN CAPRINO

T E S I N A
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO ZOOTECNISTA
PRESENTA:
LEONEL CRESPO RUIZ

MARIN, N. L.

JULIO DE 1986

001793

T
SF383
.5
.M6
C74



040.636
FA14
1986
C.5

GRACIAS A EL QUE TODO LO PUEDE

A mis padres :

Sr. Juan M. Crespo Crespo

Sra. Regina Ruiz Tovas

Por su ayuda, comprensión y paciencia.

A mi novia :

Srita. Hilda Ruedas Soto

Por ser el centro de mi motivación, por su gran amor y comprensión.

A todos mis maestros y compañeros :

Por los conocimientos recibidos y la agradable compañía en una bella etapa de la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores :

Ph. D. Javier García Cantú

Ing. M. C. Ramiro Santos García

Con gran respeto y admiración, por la amistad,
confianza y conocimientos recibidos.

Al Ing. M. C. Raúl Braulio Rodríguez Peña

Por la calidad de su amistad.

Al personal del Proyecto de Desarrollo Caprino de la

Facultad de Agronomía de la U. A. N. L.

I N D I C E

	PAGINA
I N T R O D U C C I O N	1
REVISION DE LITERATURA	3
Características Reproductivas de la especie	
caprina	3
Inseminación Artificial	4
Semen	7
Métodos de Colección de Semen	8
Evaluación de Semen	10
Diluyentes de Semen	11
Diluyentes en base a leche	15
MATERIALES Y METODOS	19
Materiales	19
Tratamientos	21
Métodos	21
Diseño Experimental	25
R E S U L T A D O S	26
D I S C U S I O N	30
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
R E S U M E N	34
B I B L I O G R A F I A	36

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	Valores máximos y mínimos para los componentes de la leche (Enciclopedia de tecnología química, 1966)	16
II	Composición de la leche del ganado vacuno de raza pura (Enciclopedia de tecnología química, 1966).	17
III	Resultados de evaluación del semen utilizado	23
IV	Motilidades en porcentaje observadas durante la realización del presente trabajo	27
V	Resultados de la transformación de las motilidades observadas a grados Bliss.	27
VI	Análisis de varianza para las motilidades reportadas durante el trabajo experimental	28
VII	Comparación múltiple de medias por el método de Tukey para los 9 tratamientos	28

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

Debido a las características topográficas, edáficas, climáticas y de vegetación de la región noreste del país, la capricultura ocupa un renglón importante y un gran potencial dentro de la actividad pecuaria.

Una serie de problemas han venido impidiendo el desarrollo de la capricultura en su forma óptima, entre los que se pueden citar; problemas en la tenencia de la tierra, falta de créditos, excesivo intermediarismo entre el producto y el consumidor, bajos precios por los productos finales (leche y carne), falta de asistencia técnica, problemas con enfermedades fatales al negocio y baja producción lechera.

En lo que respecta a los dos últimos problemas anteriormente citados (sanitarios y baja producción). Surge la inseminación artificial como una alternativa de solución.

Por medio de la inseminación artificial se ejerce un control directo en la prevención y diseminación de enfermedades venereas, así como la introducción de material genético de alta calidad en cuanto a producción.

La inseminación artificial en la especie caprina no ha tenido el desarrollo que ha tenido en otras especies debido a que los caprinos no ocupan un lugar muy importante en los países científicamente desarrollados.

El primer paso a dar en investigación sobre procesamiento

de semen caprino es la búsqueda de diluyentes adecuados para el mismo.

La finalidad del presente trabajo consiste en evaluar - tres niveles de temperatura y tiempo al descremado de leche fresca de bovino a utilizarse como diluyente que proporcione - las mejores condiciones para sobrevivencia del esperma caprino.

REVISION DE LITERATURA

Características Reproductivas de la especie caprina.

Los équidos, las especies peleteras, la oveja y la cabra sólo se aparean en general, durante una determinada época del año, y se conocen como animales "poliestrales estacionales". Dentro de estas especies animales las de gestación corta se -- aparean, en general, al principio de la primavera, y las crías nacen durante el período de primavera-verano del mismo año. - Las que tienen una gestación de 5 a 6 meses (dentro de los que se encuentra la cabra) se aparean en otoño y el parto ocurre en primavera. (Yates, 1967).

Una serie de investigaciones han demostrado que la luz - diurna (la cual tienen variaciones estacionales) es el factor más importante, y que actúa a través de un complicado mecanismo en el que está implicado el ojo (Thomson, 1951), las vías nerviosas cerebrales (Clark et al., 1938), el hipotálamo y la hipófisis (Green y Harris, 1949). El resultado final es la regulación adecuada de la secreción de gonadotropinas, todos - ellos citados por Yates, (1967).

El primer empadre de las hembras puede realizarse entre los 6 y 7 meses de edad, con 30 y 35 kg. de peso vivo, cuando la alimentación y manejo son buenos. Se recomienda deshacerse de las hembras mayores de 6 y 7 años ya que a esa edad la fertilidad decrece. Las hembras presentan celo con intervalos de 18 a 21 días y una duración de 24 a 36 horas; las cabras de -

ciertas razas presentan celo durante todo el año, mientras que las hembras de otras razas solamente lo presentan durante una estación determinada, esto está relacionado con el origen de la raza y el número de horas luz por día.

La ovulación ocurre al final del estro, se recomienda realizar la monta a las 12 horas de haberse iniciado el celo. El primer celo después del parto se presenta a los 2 o 4 meses. Un 20 o 40% de las cabras no quedan gestantes después del primer servicio, en promedio se necesitan 1.5 servicios por preñez. La preñez normal dura entre 145 y 153 días.

Cuando el manejo es adecuado, los sementales pueden ser usados desde los 8 meses de edad, esporádicamente. Por ejemplo, para un grupo de 6 hembras a la vez. Cuando el macho tiene un año de edad puede servir a 15 cabras. Sin embargo algunos cabritos ya son fértiles desde los tres meses de edad (Koeslag, 1983).

Inseminación Artificial.

La acción de depositar el semen en los órganos genitales femeninos por medio artificiales, se le da el nombre de inseminación artificial (Sorensen, 1982).

En 1977, Johan Hamm, un estudiante, y Anton van Leeuwenhoek, su maestro, descubrieron los espermatozoides bajo un rustico microscopio. Las diminutas células espermáticas fueron descritas como "animalejos". 100 años más tarde, Lazzaro Spallanzani, un

fisiólogo Italiano, llevó a cabo experimentos con anfibios y subsecuentemente reportó un grupo de tres cachorros producto de la inseminación artificial de una perra.

Los primeros estudios serios sobre inseminación artificial fueron llevados a cavo en Rusia por Elías Ivanoff. Ivanoff extendió el trabajo a caballos y perros, y fue el primero en usar subsecuentemente la inseminación artificial en vacas y ovejas. Tan extensa fué la aplicación de la I.A. por Ivanoff y sus ayudantes que los rusos inseminaron cerca de 100,000 yeguas, - 1,200,000 vacas, y 15,000,000 de borregas en 1938, el año en el cual fué organizada la primera asociación de cria artificial en vacas en los Estados Unidos (Cole & Magnar, 1974).

El líquido fecundante recogido por un procedimiento especial, sufre una previa dilución apropiada y conveniente, de tal forma que el producto de una sola eyaculación es suficiente - para la inseminación de un número más elevado de hembras (Derivaux, 1976. Leroy, 1974).

Las ventajas de la inseminación artificial son muchas, - dentro de las principales tenemos :

- .- Incrementa el uso de reproductores de alta calidad genética.
- .- Es un medio adecuado para el control de enfermedades venereas.
- .- Se determina rápido el valor genético de los sementales.

- .- Es una solución a los problemas de consanguinidad.
- .- Reduce los costos y por lo tanto eleva las utilidades.
- .- Facilita el manejo de los registros.

(Herman, 1972; Acker, 1977; Derivaux, 1976).

Las desventajas para el uso de la I.A. son las siguientes:

- .- Es necesario personal capacitado.
- .- Si no se usan animales con calidad genética probada, pueden causar un deterioro en la producción de atajos de buena calidad.
- .- El descuido en el control de enfermedades de los sementales puede redundar en una propagación de éstas.
- .- El porcentaje de concepciones es menor que en monta - natural. (Derivaux, 1976; Ensminger, 1973).

La inseminación artificial en cabras no ha pasado aún de su fase experimental en los Estados Unidos (Perry, 1973).

Las técnicas usadas en la inseminación de cabras son similares a las técnicas usadas en vacas e idénticas a las de ovejas. Resultados con semen líquido indican que del 65 al 75 % de las cabras quedan inseminadas al primer servicio, los resultados para semen congelado son similares (Herman, 1972).

Altas fertilidades con inseminación artificial en cabras han sido reportadas, con tasas de concepción en un rango de 92 a 97% (Rosenberger, 1944; Wagner, 1949; Schmidt et al., 1950).

del mismo modo Blokhuis (1957) obtuvo 48 a 51 % de preñez con una sola inseminación Guha et al. (1951) obtuvo 78 % de preñez a la primera inseminación. Setinski (1956) obtuvo una tasa de concepción de 55.5% a la primera inseminación y un total de 76.1 %. En el Centro de Inseminación Artificial de Rouille, - Francia, 700 cabras fueron servidas artificialmente en 1961 y 1962 con una tasa de concepción del 65 % (Dzuik, 1962). Todos ellos citados por ; (Perry, 1973).

Semen.

El semen consiste esencialmente de espermatozoides suspendidos en un líquido semigelatinoso o medio conocido como plasma seminal. El esperma se produce en el testículo pero el plasma es la mezcla de las secreciones de las glándulas sexuales accesorias.

El plasma seminal tiene un PH alrededor de 7.0 y una presión osmótica similar a la sangre (equivalente a 0.9% de cloruro de sodio). El semen contiene algo de buffers de citrato y bicarbonato pero no son suficientes para mantener un PH por la gran formación de ácido láctico el cual se forma de la utilización de la fructuosa del plasma por el espermatozoide.

El plasma seminal tiene un gran interés bioquímico por sus inusuales componentes orgánicos (por ejemplo, fructuosa, ácido cítrico, sorbitol, inositol, glicerilfosforilcolina y ergotionina). Mucoproteínas, peptidos, aminoácidos libres, lípidos, ácidos grasos, vitaminas y variedad de enzimas pueden es-

tar presentes en el plasma seminal de algunas especies.

La velocidad del esperma varia con el medio y la temperatura pero es del orden de 100μ . por segundo a 37°C . La motilidad del esperma probablemente juega un papel importante en el encuentro final de los gametos, y en general, existe una buena correlación entre la motilidad y la capacidad fertilizante (Hafez, 1974).

Las propiedades físicas y químicas del diluyente, el grado de dilución y factores como la temperatura y la luz son importantes en el manejo y almacenaje del semen porque afectan la sobrevivencia del esperma "in vitro" (Parkes, 1960; Mann, 1964), citados por (Hafez, 1974).

El rango del semen eyaculado por un chivo varía de 0.5 a 2.0 ml.. El promedio es alrededor de 1.0 ml.. El número de espermatozoides por mililitro varia mucho en rango de 1.0 a 3.0 billones. El semen de chivo es blanco, cremoso ó color limon. La viscosidad varia de delgado a grueso, dependiendo por regla de el número de espermatozoides presente. El espermatozoide de chivo tiene una gran motilidad (Herman, 1974).

Dentro de los factores que influyen en la cantidad y calidad del semen se encuentran; la estación, la edad, la raza y diferencias individuales (Gall, 1981).

Métodos de colección de semen.

El semen puede ser obtenido por cualquiera de estos tres

métodos; vagina artificial, estimulación eléctrica, colección de la vagina de una cabra servida naturalmente. De los tres métodos antes mencionados, la vagina artificial es el método más recomendado para el uso rutinario de semen a procesarse por obtenerse éste sin contaminar y de el modo más parecido al natural.

El semen obtenido por estimulación eléctrica es usualmente más bajo en número de espermatozoides y más delgado que el obtenido por vagina artificial. El aparato para estimulación eléctrica es incómodo y requiere destreza en su uso y casi está restringido a laboratorio y programas de investigación (Herman, 1974).

Recientes avances en anatomía (Richter, 1959; Calislar, 1966; Wrobel, 1969, 1970, 1971; Starflinger, 1972) y fisiología (Becket et al., 1972, 1975; Igboeli, 1974) de el tracto reproductivo del macho han hecho a las técnicas electroeyaculatorias más adaptadas a la anatomía y fisiología específica del macho caprino (Gall, 1981)

El semen obtenido por medio del electroeyaculador contiene una mayor cantidad de plasma seminal, lo cual reduce la resistencia de los espermatozoides al choque térmico, a la vez que disminuye la tasa de sobrevivencia después del descongelado (Quinn et al., 1968; Entwistle y Martin, 1972).

Las tasas de concepción al primer servicio son 17% más altas cuando el semen es colectado usando vagina artificial y

que éste tienen una densidad doble que el obtenido por electroeyaculación. El volumen y la motilidad eran los mismo por ambos metodos (Salomon y Morrat, 1963). En contraposición a lo anterior Lapwood et al., (1972), no establecen una diferencia en fertilidad entre semen colectado por vagina artificial y - electroeyaculador.

Los principales inconvenientes de la vagina artificial - radican en el hecho de que los machos a utilizarse deben ser previamente entrenados desde la pubertad y de que también es un método que esta condicionado a la lóbido de los animales - (Gall, 1981).

El intervalo entre colectadas de semen se recomienda que sea de 24 horas de preferencia no más de dos veces el mismo dia. Machos Alpinos eyaculando una vez al dia durante la época de apareamiento tuvieron una producción semanal de aproxima-- damente 25 billones de espermatozoides (Cortell, 1968) en (Gall, 1981).

Evaluación de Semen.

El método más utilizado, y probablemente el mejor, para juzgar la calidad de un semen consiste en medir su motilidad observando al microscopio una gota de la muestra sin diluir - colocada en un portaobjetos calentado a 37°c. Los productos - de alta calidad muestran una intensa turbulencia; los esperma-- tozoides son indistinguibles individualmente (objetivo 10x), pero se observan "ondas" de actividad que se suceden con ra-

pidez. Los grados inferiores de calidad se caracterizan por sucesivas disminuciones de la frecuencia e intensidad de las ondas, hasta llegar a la ausencia de ondas, pero con movimientos individuales de la células espermáticas, y finalmente a la ausencia de todo movimiento. (Yates, 1967).

Podemos agrupar los métodos de evaluación de semen en; macroscópicos y microscópicos. Dentro de los primeros se encuentran: volumen, color, apariencia, consistencia o viscosidad y pH., en cuanto a los microscópicos los más comunes son: Motilidad de masa ó general, movimiento rectilíneo progresivo ó motilidad individual, concentración y % de espermatozoides anormales. Otras pruebas más sofisticadas de la calidad del semen comprenden; prueba de tinción diferencial entre espermatozoides vivos y muertos, choque frío, tazas de reacción, reducción de azul de metileno y prueba de incubación (Herman, 1974).

La estimación de la motilidad es subjetiva, y esta influenciada por algunos factores como la temperatura y la densidad de la preparación. También por lo mismo no pueden compararse los resultados de un técnico a otro. Infortunadamente, pruebas más objetivas, tales como tinción diferencial vivos-muertos y pruebas bioquímicas son demasiado complicadas y consumidoras de tiempo para ser prácticas hoy en día. (Perry, 1973).

Diluyentes de semen.

El esperma eyaculado no puede sobrevivir por largo períodos a menos que ciertos agentes le sean añadidos. Los agentes

que constituyen un buen medio de extensión, tienen las siguientes funciones : (a) proveer nutrientes como una fuente de energía; (b) proteger contra los peligrosos efectos del rápido enfriamiento; (c) proporcionar una acción buffer que proteja de los cambios de pH; (d) mantener la propia presión ósmótica y el balance de electrolitos; (e) inhibir el crecimiento bacteriano; (f) incrementar el volumen inicial del semen de tal manera que pueda ser utilizado en múltiples inseminaciones; y (g) proteger las células espermáticas durante el enfriamiento (Hafez, 1974).

El semen tiene la misma presión ósmótica que los fluidos y secreciones del cuerpo como el plasma sanguíneo y la leche. Los diluyentes deben ser formulados de tal manera que sean isotónicos con el semen. Para inhibir el crecimiento de micro organismos en el semen, penicilina, estreptomocina, polimixina B u otras combinaciones de antibióticos con amplio espectro son añadidos.

El glicerol usualmente es añadido para proteger los espermatozoides contra los efectos letales del congelado (Perry, 1973).

Ningún otro aspecto de la inseminación artificial ha sido tan intensamente estudiado como la formulación de diluyentes para preservar el esperma y prolongar su fertilidad (Salisbury y Rufener, 1972; Terrill, 1972) citados por (Hafez, 1974).

Los diluyentes para semen congelado de borrego, cerdo y caballo están a nivel experimental (Hafez, 1974).

Panysevan (1940) citado por (Perry, 1973) estableció una correlación directa entre el número de espermias introducidos y la tasa de concepción ($r = 0.8483 \pm 0.0777$).

Los tipos de diluyentes más utilizados son : (a) citrato disminuido, (b) fosfato disminuido, (c) citrato-huevo y (d) diluyente de leche (Torres, 1983).

En areas donde la refrigeración es poco viable, el semen puede ser almacenado a temperatura ambiental por un período de tiempo limitado. En Nueva Zelanda un diluyente llamado Caprogen (Shannon, 1968) es muy usado para diluir semen de toro durante la época de monta. El cual consiste de citrato de sodio, glucosa, glicina, glicerol, ácido caproico y agentes antibacterianos y es gaseado con nitrogeno antes de su uso. Un diluyente carbonato-yema (IVT) y leche de coco han dado fertilidades satisfactorias con semen almacenado a moderadas temperaturas ambientales (Hafez, 1974).

Yoshioka et al. (1951) usando dos diluyentes para semen de borrego y chivo, cada uno de los cuales incrementó las tasas de concepción de 56 a 65 %. Un diluyente consiste de dos partes de 2 % de ácido bórico (H_3BO_3) por volumen con una parte de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) al 1 %. Este fue añadido al semen en la taza de 1:3. El otro diluyente consiste de volúmenes iguales de 0.3 % de sulfamerazina de sodio y 0.2 % de homosulfamina. Este fue disuelto en una solución de 5 % de citrato de sodio y la solución fue añadida al semen en la taza de

1.1. Con semen caprino, Blokhuis (1962) establece en una prueba práctica que las mejores tazas de concepción las consiguió con citrato de sodio al 3.5 % con 5% de yema de huevo, citados por (Perry, 1973).

Los diluyentes conteniendo yema de huevo han dado resultados muy irregulares en cuanto a fertilidad, porcentajes de concepción después de una sola inseminación en un rango de 5 al 85% y los resultados reportados nunca han podido ser repetidos. La muy pobre fertilidad de los resultados obtenidos por inseminación de semen caprino preservado en un medio contenido yema de huevo puede ser atribuido a las altas concentraciones de Isolecitas, en el medio en que se encuentran las células espermáticas. Estas altas concentraciones son tóxicas al espermatozoide.

Las Isolecitas resultan de la hidrólisis de las lecitinas de la yema de huevo a Isolecitas y ácidos grasos, la hidrólisis parece ser llevada a cabo por una enzima secretada en grandes cantidades por las glándulas bulbouretrales del macho caprino (Corteel, 1981) en (Gall, 1981).

Si el semen caprino es diluido con diluyente de yema de huevo, el espermatozoide se inmoviliza después de un corto período de tiempo (Roy, 1957). Un efecto similar es observado si se le añaden Isolecitas a el semen de chivo y se ha obtenido la conclusión de que esta sustancia es tóxica al espermatozoide caprino, y la cual es formada cuando el semen caprino es almacenado en

un diluyente conteniendo yema de huevo (Amadal, 1957) citados por (Cole & Cupps, 1977).

Diluyentes en base a leche.

Los funcionarios del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos definen la leche como "...la secreción láctea completa y fresca, obtenida por el ordeño completo de una o varias vacas sanas, excluyendo la obtenida 15 días antes y 5 días después del parto o el tiempo más largo que se considera necesario para que la leche esté casi exenta de calostro".

La raza es el factor más importante para el contenido de grasa de la leche. Otros factores influyen en la composición de la leche. Entre ellos citaremos la constitución propia de la vaca, la edad, la fase del período de lactación, el pienso, el estado de la vaca al parir, que la leche proceda del ordeño de la mañana o de la tarde, el intervalo entre los ordeños, las variaciones durante el ordeño, el celo o estro y la excitación del animal (Enciclopedia de tecnología química, 1966).

El punto de fusión de las grasas lácteas varía entre 28 y 35°C. El tamaño de los glóbulos de grasa varía en las diferentes leches. La leche de las vacas Holstein y Ayrshire tienen los glóbulos de la grasa más pequeños que los de las vacas Jersey y Guernesey. Los glóbulos de grasa están rodeados por una membrana formada por un lípido, en gran parte lecitina, y una proteína diferente de las otras proteínas de la leche (Campbell & Marshall, 1975).

Tabla I. Valores máximos y mínimos para los componentes de la leche *

Componente	Mínimo	Máximo
Grasa	2.60	8.37
Proteínas	2.44	6.48
Lactosa	2.41	6.11
Cenizas	0.560	0.936
Total de sólidos	10.56	17.90
Sólidos no grasos	7.20	11.90
Densidad	1.0231	1.03

* Enciclopedia de tecnología química (1966).

La leche contiene tres proteínas principales; caseína - (3%), lactalbúmina (0.5%), y lactoglobulina (0.05%). La caseína es una fosfoproteína; la lactalbúmina y la lactoglobulina son proteínas simples.

La lactosa, el azúcar de la leche es sintetizada en la glándula mamaria. Es un disacárido compuesto de glucosa y galactosa.

Los componentes minerales de la leche varían entre 0.6 y 0.8 % de la leche. En general, las cenizas de la leche se caracterizan por su contenido elevado de calcio, potasio y fósforo (Enc. Tec. Química, 1966).

Las enzimas presentes en la leche comprenden; fosfatasas, esterases, proteasas, catalasa, peroxidasa (lactoperoxidasa), xantina oxidasa y otras como la alfa-amilasa, aldolasa y la an-

Tabla II. Composición de la leche del ganado vacuno de raza pura *

Raza	Grasa	Proteínas	Lactosa	Cenizas	Total de sólidos.
Holstein	3.40	3.32	4.87	0.68	12.26

*Enciclopedia de tecnología química (1966).

hidrasa carbonica.

Dentro de las propiedades físicas de la leche tenemos - que su pH a temperatura de cuarto es entre 6.5 y 6.7, su densidad 1.032, viscosidad 1.5 a 2.0 centipoises a 20^oc, punto de congelamiento entre -0.530 y -0.550^o c. y su punto de ebullición a 100.5^oc (Campbell & Marshall, 1975).

El procedimiento para la preparación del diluyente a base de leche propuesto por Thacker y Alquist (1953) requiere un adecuado calentamiento de la leche para destruir un factor, la lactenina, la cual es tóxica al esperma. La leche puede ser; fresca, pasteurizada, homogenizada y leche desnatada.

Durante el procesado se calienta la leche en baño maria de 92 a 95^oc por un tiempo de 10 minutos, se retira la nata, se deja enfriar a temperatura de cuarto y se le añade el nivel adecuado de antibióticos (Perry, 1973).

Melrose (1962) citado por (Perry, 1973) llevando a cabo varios experimentos sobre la fertilidad en toros en la tazas de concepción establece que la leche homogenizada resultó - igual ó mejor que el citrato-yema. La leche fresca desnatada

fue igual al citrato-yema. Para toros los cuales su semen era relativamente bajo en fertilidad cuando era diluido en citrato-yema (Dreher y Webb, 1953) y (Almquist, 1954) establecieron que la fertilidad fue mejor al usar diluyentes de leche, todos ellos citados por (Perry, 1973).

La leche y tris-diluyentes con menos modificaciones han sido usados para almacenar semen de otras especies a 5°C y aun para congelarlo. En el método de congelamiento en pellets los diluyentes con un alto contenido de azúcar son utilizados, la lactosa generalmente es sustituida por rafinosa (Hafez, 1974).

El uso de diluyentes preparados con leche desnatada de vaca nunca ha resultado en baja fertilidad en semen caprino (Cogteel, 1981) en (Gall, 1981).

El exitoso congelado de semen caprino y una deseable tasa de concepción obtenida fué reportada a principios de 1962 por el Dr. C.A.V. Barker y sus colaboradores en el colegio de veterinaria de Ontario, Guelph, Ontario Canada (Herman, 1972).

MATERIALES Y METODOS

Materiales.

El material utilizado durante el trabajo experimental puede agruparse del modo siguiente:

a) Material de preparación del diluyente.

- .- 1 lto. de leche fresca de bovino (raza Hólestéin).
- .- parrilla eléctrica.
- .- 2 vasos de precipitado de 1000 ml., uno de 200 ml. y 9 de 100 ml.
- .- antibiótico (mezcla de penicilina y estreptomícina).
- .- jeringa de 1 ml. y aguja.
- .- termómetro para líquidos.

b) Material de extracción de semen.

- .- 1 semental raza la mancha de cuatro años de edad, con un peso de 55 kg.
- .- electroeyaculador.
- .- jalea lubricante.
- .- gasa.
- .- tijeras.
- .- agua tibia.
- .- papel secante.
- .- termómetro para líquidos.
- .- termo con agua a 37°C
- .- tubo de ensaye cónicos graduados de 15 ml. (tubos colectores).
- .- parrilla eléctrica.

c) Material de evaluación de semen.

- .- microscopio.
- .- porta objetos y cubre objetos.
- .- pipetas.
- .- hematocitómetro.
- .- pipeta de dilución para glóbulos rojos.
- .- papel PH.
- .- tintura de rosa de bengala.

d) Material de dilución y almacenaje del semen.

- .- termo con agua a 37^oc (conteniendo el semen colectado)
- .- termómetro para líquidos.
- .- micropipeta.
- .- 9 tubos de ensaye cónicos graduados cubiertos con papel secante y cinta adhesiva.
- .- 3 vasos de precipitado de 1000 ml.
- .- 4 ml. de cada uno de los 9 tratamientos del diluyente.
- .- ampolletas.
- .- gradilla para ampolletas.
- .- refrigerador de tipo casero.

e) Material de evaluación para obtención de resultados.

- .- microscopio.
- .- portaobjetos y cubreobjetos.
- .- recipiente termico con agua a 35^oc.
- .- pipetas
- .- ampolletas con el semen diluido de cada uno de los tratamientos.

Tratamientos

Los tratamientos generados por los 3 niveles de temperatura y los 3 niveles del tiempo al descremado de la leche fueron los siguientes :

T 1,1 : descremado a 90^oc durante 5 minutos.

T 1,2 : descremado a 90^oc durante 10 minutos.

T 1,3 : descremado a 90^oc durante 15 minutos.

T 2,1 : descremado a 92.5^oc durante 5 minutos.

T 2,2 : descremado a 92.5^oc durante 10 minutos.

T 2,3 : descremado a 92.5^oc durante 15 minutos.

T 3,1 : descremado a 95^oc durante 5 minutos.

T 3,2 : descremado a 95^oc durante 10 minutos.

T 3,3 : descremado a 95^oc durante 15 minutos.

Metodos

El material de cristal a utilizarse fué previamente lavado con detergente y enjuagado para posteriormente esterilizarse - en agua destilada hirviendo durante 15 minutos, se enjuagó con agua destilada, se escurrió y se secó con papel secante.

La leche a ser procesada se extrajo al azar de los tanques de leche del establo de bovinos, ordeñada con media hora de anticipación, se colocó en un vaso de precipitado de 1000 ml. y se trasladó al laboratorio.

Utilizando una parilla eléctrica se procedió a poner en - baño maria para descremar la leche a 90^oc, con un vaso de pre-

precipitado de 1000 ml. y uno de 200 ml.. De aquí se extrajeron 50 ml. de leche a los 5, 10 y 15 minutos (removiendo la nata que se formaba en cada uno de estos tiempos) y se colocaron en vasos de precipitado de 100 ml. cada uno de ellos. Se procedió del mismo modo para el descremado a 92.5°C y 95°C.

Ya que se obtuvieron los nueve tratamientos de la leche se les añadió antibiótico; una mezcla de estreptomicina y penicilina a una dosis de 500 U.I. de penicilina y 1 mg. de estreptomicina por mililitro de diluyente preparado.

Inmediatamente se procedió a coleccionar el semen, el método utilizado fué por medio del electroeyaculador, el semen fué extraído de un semental raza la mancha de 4 años de edad y un peso de 55 kg., el tubo colector se cubrió previamente con papel secante y cinta adhesiva para evitar el contacto directo del semen con la luz solar y se colocó en el termo con agua a 37°C para que fuera adquiriendo la misma temperatura que el semen al momento de coleccionarlo con la finalidad de evitarle un choque termico.

Una vez coleccionado el semen en el tubo colector, se depositó inmediatamente en el termo con agua a 37°C. y se trasladó al laboratorio donde se le hicieron las siguientes evaluaciones; volumen, color, apariencia, PH, motilidad general, motilidad individual, concentración y % de espermatozoides normales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.

TABLA III. Resultados de la evaluación del semen utilizado.

Volumen	: 1.3 ml.	Motilidad gral.	: 3*	% Anormales	: 4 %
Color	: blanco	Motilidad ind.	: 3*	PH	: 7.0
Aspecto	: cremoso	Concentración	: 4,000 millones/ml. de semen.		

*Rango 0-4

Una vez evaluado el semen y habiendolo encontrado apto para el procesado se comenzó a diluirlo del modo siguiente; de cada tratamiento se depositarón por medio de una pipeta 4 ml. de diluyente en su respectivo tubo de ensaye de 15 ml. y se colocaron los 9 tubos de ensaye con cada uno de los tratamientos en el termo a 37°C para uniformar la temperatura a la que estaba el semen. Alrededor de los 5 minutos se procedió a fraccionar la muestra de tal manera que todos los tratamientos tuvieran la misma concentración, como la muestra tenia un volumen de 1 ml. a cada tratamiento le correspondió 0.11 ml. de semen y tomando en cuenta que la concentración del semen fué de 4,000 millones de espermatozoides/ml., por lo tanto a cada tratamiento le correspondieron 444.44 millones de espermatozoides que al ser diluidos en los 4 ml. de cada uno de los tratamientos obtubieron una concentración final de 108.13 millones de espermatozoides /ml. de semen diluido.

Por medio de una micropipeta se depositó la cantidad de semen correspondiente a cada uno de los tubos de ensaye y se mezcló por suave inversión del tubo.

Los tubos de ensaye conteniendo cada uno de los tratamien-

tos , estaban cubiertos con papel y cinta adhesiva para evitar la incidencia directa de los rayos de luz al semen diluido, inmediatamente se colocaron en vasos de precipitado de 1000 ml. con agua a 37°C para regular el lento descenso de la temperatura al ser colocado en el refrigerador a 5°C , evitando así un choque térmico.

Al termino de 3.5 horas el semen adquirió una temperatura de 5°C (la cual se tomaba colocando el termómetro para líquidos en el baño de agua). En este momento se procedió al llenado de las 4 ampollitas (repeticiones) para cada tratamiento, el llenado se hizo a mano con pipeta y sin sacar los tubos ni las ampollitas del refrigerador.

Las 4 ampollitas de cada tratamiento fueron colocadas en una gradilla la cual se mantuvo en el refrigerador a una temperatura de 5°C durante todo el experimento.

La obtención de resultados se llevó a cabo cada 24 horas durante 4 días utilizando como parámetro la motilidad general, expresado en porcentaje de 0 a 100 %.

Para activar el movimiento de los espermias diluidos, se colocaban las ampollitas en baño de agua a 35°C por 10 minutos y se procedía a la evaluación.

Debido a que con la utilización de diluyentes a base de leche es muy difícil observar los espermatozoides, la motilidad general se evaluó en base a la cantidad y fuerza del movimiento.

miento de los glóbulos de grasa de la leche.

Diseño experimental

Para llevar a cabo el análisis estadístico se hizo necesario la transformación de las motilidades en porcentaje a ángulos Bliss (Chun, 1977). El trabajo se analizó con un diseño en bloques al azar con arreglo factorial 3^2 , con 4 repeticiones para cada tratamiento. Las comparaciones de medias se hicieron por el método de Tukey.

El modelo estadístico utilizado fue :

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + T^0_j + T_k + (T^0 \times T)_{jk} + E_{ijk}$$

$$i = 1, 2, 3, 4,$$

$$j = 1, 2, 3,$$

$$k = 1, 2, 3,$$

donde :

Y_{ijk} = Valor de la i, j, k-esima observación

μ = efecto de la media

B_i = efecto de i-esimo bloque (dia de observación).

T^0_j = efecto de la j-esima temperatura.

T_k = efecto del k-esimo tiempo.

$(T^0 \times T)_{jk}$ = efecto de la interacción.

E_{ijk} = error experimental.

R E S U L T A D O S

La tabla IV. nos muestra las motilidades que fueron repogtado las repeticiones de cada uno de los tratamientos durante el tiempo que duró el presente trabajo. Como puede apreciarse, a las 24 horas que se llevó a cabo la primera observación, los tratamientos en los cuales la leche fué sometida a 10 y 15 minutos de descremado (independientemente de su temperatura) obtuvieron un ligero descenso en su motilidad mientras que los - tratamientos a los cuales se les descremó durante 5 minutos (independientemente de su temperatura) cesaron su motilidad por completo.

De esta observación (24 hrs.) en adelante, la tendencia - muy similar de los 6 tratamientos que aún se encontraban móviles (los sometidos a descremado durante 10 y 15 minutos inde--pendientemente de su temperatura) fue a disminuir su motilidad en un 20 % cada 24 hrs.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de éste traba-jo se hizo necesario la transformación de las motilidades en porcentaje a grados Bliss (tabla V).

Los cálculos estadísticos realizados bajo un diseño en bloques al azar con arreglo factorial 3^2 arrojaron diferencias altamente significativas entre bloques (tabla VI). En cuanto a tratamientos se encontraron diferencias altamente significa-tivas, siendo los mejores y sin diferencia estadística entre ellos los tratamientos (2,2), (3,3), (1,2), (1,3), (2,3),(3,2)

Tabla I/. Motilidades en porcentaje observadas durante la realización de el presente trabajo.

Trat.	B L O Q U E S			
	(Observaciones (%))			
	I	II	III	IV
	24 Hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.
1,1	0	0	0	0
1,2	60	50	20	10
1,3	60	50	20	10
2,1	0	0	0	0
2,2	70	50	30	10
2,3	60	50	20	10
3,1	0	0	0	0
3,2	60	50	20	10
3,3	70	50	20	10

Tabla V. Resultados de la transformación de la motilidades observadas a grados Bliss.

Trat.	B L O Q U E S			
	(Observaciones)			
	I	II	III	IV
	24 hrs.	48 hrs.	72 hrs.	96 hrs.
1,1	0	0	0	0
1,2	50.77	45	26.56	18.44
1,3	50.77	45	26.56	18.44
2,1	0	0	0	0
2,2	56.79	45	33.21	18.44
2,3	50.77	45	26.56	18.44
3,1	0	0	0	0
3,2	50.77	45	26.56	18.44
3,3	56.79	45	26.56	18.44

Tabla VI. Análisis de varianza para las motilidades reportadas durante el trabajo experimental.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.Cal.
Bloques	3	2,960.89	986.96	15.48**
Tratamientos	8	10,384.62	1,298.07	20.36**
Temperatura	2	6.697	3.348	0.052 ^{ns}
Tiempo	2	10,353.29	5,176.64	81.20**
(Temp. x Tiempo)	4	24.633	6.158	0.096
Error	24	1,530.04	63.75	
Total	35	14,875.55		

** Efecto altamente significativo ($p < .01$) CV = 33.295
 * Efecto significativo ($p < .05$)
 ns Efecto no significativo ($p > .05$)

Tabla VII. Comparación múltiple de medias por el método de Tukey para los 9 tratamientos.

$\bar{Y}_{2,2} = 38.36$	a
$\bar{Y}_{3,3} = 36.39$	
$\bar{Y}_{1,2} = 35.19$	
$\bar{Y}_{1,3} = 35.19$	
$\bar{Y}_{2,3} = 35.19$	
$\bar{Y}_{3,2} = 35.19$	

$\bar{Y}_{1,1} = 0$	b
$\bar{Y}_{2,1} = 0$	
$\bar{Y}_{3,1} = 0$	

Medias con diferentes letra son estadísticamente diferentes ($p \leq .05$)

pero diferentes estadísticamente de los tratamientos (1,1), (2,1) y (3,1) según las comparaciones de medias por el método de Tukey (tabla VII).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la temperatura de descremado.

Para los niveles del factor tiempo de descremado se encontraron diferencias altamente significativas. Resultando ser los mejores según la comparación de medias por el método de Tukey y sin diferencia estadística entre ellos, los descremados durante 10 y 15 minutos. Pero estadísticamente diferentes a descremar durante 5 minutos.

No hubo efecto de interacción entre el factor tiempo y temperatura del descremado.

El coeficiente de variación resultó ser alto (33.295 %) para ser un trabajo a nivel laboratorio.

D I S C U S I O N

Afortunadamente se puede asegurar que durante la realización de este trabajo, sobre evaluación de diferentes tiempos y temperatura al descremado de leche fresca de bovino para utilizarse como diluyente de semen caprino, no hubo factores externos que afectaran los resultados.

Cabe mencionar que las motilidades obtenidas durante éste trabajo parecen un poco bajas, si consideramos que otras pruebas en blanco que se realizaron arrojaban motilidades aproximadas al 80% a las 24 hrs., 65% a las 48 hrs. y en general un poco más altas que éste trabajo. Esto es debido a las diferencias individuales de cada semental, pero es de suponerse que la tendencia general de los factores probados en el diluyente es idéntica en semen de buena, mediana y mala calidad.

Existe una diferencia palpable en los resultados obtenidos entre las horas de observación.

El tiempo al descremado resultó ser el factor de mayor importancia ya que independientemente de las temperaturas utilizadas (90°C , 92.5°C y 95°C) al descremar durante 5 minutos resulta insuficiente para inactivar el factor inhibidor para el espermatozoide contenido en la leche, mientras que al descremar durante 10 ó 15 minutos este factor inhibidor queda anulado.

En cuanto a temperatura se observa que da el mismo resultado desnatando a 90°C , 92.5°C ó 95°C para la sobrevivencia del es-

perma caprino.

De los resultados obtenidos se observa claramente que el descremado durante un tiempo de 5 minutos resulta insuficiente para inactivar el factor inhibidor mientras que se descrema durante 10 ó 15 minutos a una temperatura comprendida entre 90°c y 95°c este factor tóxico queda inactivado dejando a la leche apta para utilizarse como diluyente de semen caprino.

Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Almquist y Thucker (1953) citados por Perry (1973) los cuales trabajando con leche fresca de bovino para diluyente de esperma bovino concluyeron que el descremado se hicieron en baño maria a una temperatura entre 92°c y 95°c por un tiempo de 10 minutos.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De la prueba llevada a cabo sobre la evaluación de diferentes tiempos y temperatura de descremado de leche fresca de bovino para utilizarse como diluyente de semen caprino, se concluye lo siguiente :

- 1.- Existe una diferencia estadística altamente significativa entre las observaciones a 24, 48, 72 y 96 horas.
- 2.- Existe una diferencia estadística altamente significativa entre los tratamientos comparados.
- 3.- No existe diferencia en cuanto a efecto sobre la viabilidad de semen caprino entre desnatar la leche fresca de bovino a 90°C , 92.5°C ó 95°C , para ser utilizada como diluyente.
- 4.- Existe una diferencia significativa entre descremar la leche fresca de bovino, para utilizarse como diluyente de semen caprino, durante 5 o 10 y 15 minutos. Siendo inútil el tratamiento de la leche durante 5 minutos y funcionando perfectamente durante 10 y 15 minutos.
- 5.- La tendencia en los resultados debida al factor temperatura del descremado de la leche fresca no se ve modificada por la presencia del factor tiempo de descremado y viceversa.

Se sugiere se sigan realizando trabajos similares para lo cual se hacen las siguientes recomendaciones :

- .- Debido a que el coeficiente de variación resultó bas-

tante alto, se recomienda que en subsiguientes trabajos de esta índole se tomen medidas para disminuirlo.

- .- Poner especial cuidado en utilizar sementales "probados" (en cuanto a calidad del semen) en esta clase de trabajos, para evitar llegar a falsas conclusiones debidas al uso de un semen de mala calidad.
- .- Hacer una mezcla de el semen de varios sementales, en esta clase de pruebas para obtener resultados representativos.
- .- Se recomienda se lleven a cabo trabajos con este diluyente con miras a utilizarse en el congelamiento de semen caprino.

R E S U M E N

La presente prueba se realizó en el laboratorio de Fisiología de la Reproducción, de la Facultad de Agronomía de la U.A. N.L. ubicada en la carretera Zuazua-Marín km. 17, municipio de Marín, N.L., teniendo una duración de 6 meses, iniciándose el 10 de agosto de 1985. y terminándose el 10 de enero de 1986.

Los objetivos de este trabajo fueron los de probar el efecto que tienen la temperatura y el tiempo al descremado de la leche fresca de bovino, sobre la viabilidad de semen caprino diluido en ella.

Se utilizó un semental raza la Mancha para la extracción del semen, empleándose un diseño estadístico en bloques al azar con arreglo factorial 3^2 , obteniéndose nueve tratamientos con cuatro repeticiones cada uno.

Se bloqueó en cuanto a hora de observación de obtención - de resultados (24,48,72 y 96 hrs.) y se hallaron diferencias - altamente significativas entre bloques.

Los tratamientos comparados fuerón ; $T_{1,1}$ (descremado a 90°C durante 5 minutos), $T_{1,2}$ (descremado a 90°C durante 10 minutos), $T_{1,3}$ (descremado a 90°C durante 15 minutos), $T_{2,1}$ - (descremado a 92.5°C durante 5 minutos), $T_{2,2}$ (descremado a 92.5°C durante 10 minutos), $T_{2,3}$, (descremado a 92.5°C durante 15 minutos), $T_{3,1}$ (descremado a 95°C durante 5 minutos), $T_{3,2}$ (descremado a 95°C durante 10 minutos) y $T_{3,3}$ (descremado a -

95°c durante 15 minutos). La recolección de datos fueron las -
observaciones al microscopio de una de las ampolletas de cada
tratamiento a las 24, 48, 72 y 96 hrs.

La variable a medir fué la motilidad general de cada una -
de las ampolletas de los tratamientos.

Se encontró una diferencia altamente significativa entre -
los tratamientos. Resultando ser los mejores y sin diferencia
estadística entre ellos los tratamientos; T (2,2), T (3,3), -
T (1,2), T (1,3), T (2,3) y T (3,2) pero diferentes estadística_
mente a los tratamientos; T (1,1), T (2,1) y T (3,1).

Se recomienda seguir haciendo más estudios tendiendo a la
utilización del diluyente en base a leche de bovino con miras
a utilizarse en el congelado de semen caprino.

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

- Acker, D. 1977. Zootecnia e Industria Ganadera. Ia. Ed. Editorial Diana México.
- Campbell John R. y Marshall Robert 1975. The Science of Providing. Milk For man. MC. Grow Hill Book Company. New York E.U.A.
- Chun Ching Li. 1977. Introducción a la Estadística Experimental. Ia. Ed. en español. Ediciones Omega. Barcelona. España.
- Cole H.H. y Cupps P.T. 1977. Reproduction in Domestic Animals. 3a. Ed. Academic Press. N.Y. E.U.A.
- Derivaux J. 1976. Reproducción de los Animales Domésticos. -- 2a. Ed. Editorial Acribia Zaragoza, España.
- Enciclopedia de Tecnología Química. 1966. Tomo X 1a. Ed. Editorial Uteha México.
- Ensminger, M.E. 1973. Manual del Ganadero. 4a. Ed. "El Ateneo" Pedro García, S.A. Librería Editorial e Inmobiliaria.
- Entwistle, K.W.E.; I.C.A. Martin. 1972. Effect of composition of diferent metod of addition of glycerol. Freezing rate and storage temperature on the revival of ram spermatozoa after deeprezing. Aust. J. Biol. Sci. 25: 379-386.
- Gall C. 1981. Goat Production. Ed. Academic Press. N.Y. E.U.A.

- Hafez E.S.E. 1974. Reproduction in Farm Animals. 3a. Ed. Editorial Lea & Febiger. Philadelphia. E.U.A.
- Herman, H.A. 1972. The Artificial Insemination of Dairy Goats. Ed. Columbia Missouri. E.U.A.
- Herman H.A. 1974. The Artificial Insemination of Dairy and - Beef Cattle with techniques for Goats, Sheep and swine. Ed. Columbia Missouri. E.U.A.
- Koeslag Johan H. 1982. Cabras. 1a. Ed. Ed. Trillas. México.
- Lapwood, K.R.; I.C.A. Martin y K.W. Entwistle. 1972. Diferentia- tility of merino ewes artificialaly inseminated with semen diluted in-solution based on skim milk, glucose or ribose. Aust. J. Agric. Res. 23: 457-466.
- Perry Enos J. 1973. The Artificial Insemination of Farm Ani-- mals. 4a. Ed. Rutgers University Press. New Jersey. E.U.A.
- Quinn, P.J.; Salomon and J.G. White. 1968. The effect of cold shock and deep freesing of Ram Spermatozoa colected by - electrical Eyaculation and by artificial vagina. Aust. J. Agi. Sci. 19:119.
- Salomon, S. and A.J. Marrant. 1963. A Comparison of two -- metods artificial breeding in sheep. Aust. J. Exp. Agri. Anim. Husb. 3: 72-77.
- Sorensen, A.M. 1982. Reproducción Animal: Principios y Prácti-

cas. 1a. Ed. Editorial Mc. Graw-Hill. México.

Torres, G.G.E. 1983. Recolección, Evaluación, Dilución y Preservación de semen caprino y evaluación Post. Descongelado en diferentes etapas de Almacenamiento utilizando dos métodos de descongelado. I.T.E.S.M.

Yeates, N.T.M. 1967. Avances en Zootecnia. Ed. Acribia. Zaragoza, España.

FE DE ERRATAS

PAG.	PARRAFO	RENGLON	DICE	DEBE DECIR.
4	4	2	medio	medios
4	5	7	1977	1677
5	2	2	cavo	cabo
6	4	4	inseminadas	preñadas
10	3	5	Cortell,1968	Cortell,1981
23	1	14	obtubieron	obtuvieron

CITAS FALTANTES

Cole H.H. and Magnar Ronning(1974),Animal Agriculture, Ed.

W. H. Freeman, San Fco., Calif. E.U.A.

Leroy Andre. M. (1974),Cría Racional del ganado, Zooqecnia
general, 3^a Ed., Ed. GEA, Barcelona España.

ENCUADERNACIONE
 "GAMA"
 SERIA No 861 OTE. (510. CON ARISTA)
 1982

