



121
13

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**COMPARACION DE 3 METODOS PARA
DETERMINAR LAS ANORMALIDADES
ACROSOMICAS EN SEMEN CON-
GELADO DE CARNERO**

T E S I S

Que para obtener el título de:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Rosa María Ramos Gutiérrez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

INTRODUCCION	1
OBJETIVO	12
MATERIAL Y METODOS	13
RESULTADOS Y DISCUSION	16
CONCLUSIONES	32
ANEXO 1	33
ANEXO 2	35
LITERATURA CITADA	36

INTRODUCCION

El semen se compone de dos partes, los espermatozoides y el plasma seminal. Los dos componentes difieren en su origen así como en su función y composición química. Los espermatozoides se forman en los testículos y se almacenan en el epidídimo, el plasma seminal está formado por los líquidos segregados por las glándulas accesorias (13, 24, 27).

La célula masculina fué descubierta en 1677 por John Hamm, y es considerada como una de las células más diferenciadas del organismo y potencialmente móviles (13, 14, 21).

Los espermatozoides son originados mediante un proceso de diferenciación celular llamado espermatogénesis, que se refiere a una evolución a través del cual, las células del tronco espermatogónico originan a los espermatozoides (13, 14).

La espermatogénesis puede dividirse en 2 fases: la espermatocitogénesis y la espermiogénesis. La espermatocitogénesis es la fase proliferativa en la que las células germinales primitivas se multiplican por una serie de divisiones mitóticas seguidas por divisiones meióticas, que producen el estado haploide. La espermiogénesis o esperma-

teliosis, es la fase de diferenciación en que núcleo y citoplasma sufren cambios morfológicos para constituir la célula espermática (13,21).

La espermateliosis se ha estudiado intensamente, durante ésta ocurren una serie de reorganizaciones estructurales complejas, que dan como resultado la adquisición de la morfología característica del espermatozoide, la formación del manchete y del acrosoma además de la migración de las mitocondrias alrededor del flagelo y origen del flagelo (4,13,21).

La formación del sistema acrosomal empieza con la aparición de 2 ó 3 gránulos postacrosómicos dentro del complejo de Golgi en el citoplasma de las espermátides. Estos posteriormente coalescen para formar un gránulo acrosómico único, contenido en una vesícula acrosómica. La vesícula y el gránulo contenido se mueven hacia la parte anterior de la membrana nuclear. La vesícula acrosómica aplastada sobre el núcleo forman el capuchón cefálico que abarca el gránulo; este capuchón crece durante el ciclo epitelial seminífero hasta abarcar las 2/3 partes del núcleo en el morueco. El gránulo acrosómico experimenta modificaciones que dan lugar al acrosoma. La combinación del acrosoma y del capuchón cefálico forman el sistema acrosomal (9,33).

Courtens y Courot (7) hacen la sugerencia de que el desarrollo del acrosoma está bajo el control de los eventos endócrinos ocurriendo antes del comienzo de la espermiogénesis, posiblemente vía interacción células de Sertoli y células germinales.

El acrosoma consiste en una matriz de un material homogéneo dentro de un sistema de membranas que son: membrana acrosomal externa que se encuentra adjunta a la membrana plasmática y la membrana acrosomal interna que está junto a la envoltura nuclear. Esta compuesto de 2 partes desiguales: el segmento anterior y el ecuatorial. El segmento anterior es la porción principal que rodea como una funda marginal a la cabeza del espermatozoide. La depresión semilunar del segmento ecuatorial tiene una dimensión de $1/5$ del acrosoma entero en el carnero. La cubierta del acrosoma de poco más de $2/3$ partes en la misma especie. La región postacrosomal en el semen de carnero muestra una compleja morfología que exhibe depresiones dentadas y estriaciones. La matriz acrosomal contiene un número de enzimas hidrolíticas tales como: acrosina, hialuronidaza, enzima penetradora de la corona y varias hidrolazas ácidas (13,20,33).

Se puede suponer que las enzimas acrosomales son liberadas en una determinada secuencia, para una apropiada función durante la fertilización. Esto implica que

dentro del acrosoma, ellos no son dispuestos casualmente pero es probable que sí acorde en un orden particular (16).

El acrosoma y su contenido están involucrados en la penetración del espermatozoide a través de la corona radiada y la zona pelúcida del ovulo (1,8).

Hay aún algo de confusión en la literatura para la interpretación de la terminología usada, en este escrito - se describen varias regiones topográficamente del espermatozoide:

1. Segmento Apical: aquella parte del acrosoma la cual se extiende anteriormente más allá del núcleo.
2. Segmento Principal: la parte del acrosoma el cuál cubre la parte anterior del núcleo.
3. Espesura Marginal: el ensanchamiento local - sobre una cara del segmento apical en el acrosoma del carnero.
4. Borde anterior: región más distal del segmento apical (16).

La congelación del semen permite un máximo aprovechamiento del seminal, sin embargo los resultados obtenidos hasta ahora son inferiores a los que se logran con semen fresco. Ello se debe fundamentalmente al daño acro

sómico que sufre el espermatozoide de carnero durante el proceso de congelación y descongelación. Sin embargo, no se considera al daño acrosomal como el único factor que influye en la fertilidad en la inseminación artificial, sino que otro factor importante, es el sitio de deposición de una población de espermatozoides viables en la inseminación intrauterina en ovejas. No obstante se sabe que el daño acrosomal es más severo en el semen de carnero en comparación a otras especies después de la congelación profunda (6,19,32,31,28).

Al haber una correlación de 0.80 a 0.81 entre acrosomas intactos y la fertilidad, se considera que es una buena estimación de ésta actualmente. Pero la evaluación acrosómica de un número elevado de eyaculados sería una tarea bastante ardua, de modo que se prefiere valorar solamente la motilidad y en casos de duda se recurriría al estudio acrosómico (25).

La unión imperfecta de la *galea capitata* (acrosoma) es interpretada como el primer paso en la regresión por la edad o por el almacenamiento. El acrosoma se estropea en forma gradual y comienza con un ensanchamiento de la porción anterior que luego se deteriora y desprende. La presencia del borde apical es el criterio más utilizado para evaluar la integridad del acrosoma (3,20,22,25).

Las anomalías de la corona del acrosoma son clasificadas como anomalías primarias del espermatozoide y han sido demostradas por varios investigadores -- que están asociadas -- como ya antes se mencionó -- a baja -- fertilidad o completa esterilidad en los animales. Se sabe que algunas anomalías del acrosoma son heredables y varios estudios demuestran que el medio ambiente puede causar en forma irreversible cambios destructivos en el acrosoma. Se conoce que la teratospermia es causada por lo tanto también en forma accidental, y se puede -- en algunos casos -- inducir experimentalmente por una variedad de factores químicos y físicos. Se puede establecer uno o varios organelos espermáticos para el diagnóstico. Por lo que es importante conocer:

- Cuales son las tensiones medio ambientales, alimentos o aditivos en los alimentos, pesticidas, insecticidas, contaminantes, drogas, enfermedades, tratamientos o intervenciones quirúrgicas que causan teratospermia.
- Cuales especies y que respuesta producen en las diferentes especies los compuestos que causan una teratospermia.
- El patrón y dinámica seguida en las teratospermia.

Algunas causas que nos podrían dar anomalías en el acrosoma serían las siguientes:

El etileno dibromida (EDB), un fumigante de los granos, del cual se conoce que causa defectos en el esperma de carneros siendo su rasgo predominante el causarlos en el acrosoma, teniendo como dosis teratogena de 7.8 a 13.5 mg/kg por vía parenteral. En relación a su efecto sobre acrosoma, las anomalías reconocidas en la estructura vesicular del segmento principal demostrable en células suspendidas bajo un microscopio de contraste de fase. Estos cambios son indicativos de una inestabilidad y cantidad de anomalías y distribución de la matriz acrosomal y lesiones en la adhesión del acrosoma al núcleo. - Otros hallazgos causados por el EDB son la aplasia, hipoplasia o hiperplasia en la formación de la corona del acrosoma, inclusiones vesiculares de la matriz acrosómica (10, 17).

Otra causa de daño acrosomal en espermatozoides de carnero es el almacenamiento por largo tiempo. También cuando la muestra recibe un shock frío, se produce una ruptura del acrosoma de las células del plasma seminal (12,32).

Si bien la yema de huevo es benéfica solamente durante el enfriamiento y la congelación, la presencia del glicerol en el diluyente produce un incremento en la super

vivencia del espermatozoide. Pero un incremento de este en la concentración produce un significativo deterioro del acrosoma. (30).

El uso del microscopio de contraste de fase, de luz ultravioleta y electrónico han provisto detalles de importancia concernientes a la formación, estructura y función de importantes componentes del espermatozoide. Varios colorantes han sido empleados también rutinariamente por varios años para ayudar a la determinación de las características morfológicas del espermatozoide. Sin embargo pocos de estos colorantes dan una buena definición del acrosoma. El método a escoger depende de los requerimientos específicos del clínico o investigador y del material disponible (2,32).

Varios métodos de tinción están disponibles para frotis de fluido seminal. Así tenemos el acridina-naranja en conjunción con radiación ultravioleta, y el colorante de Giemsa que dan una buena definición del acrosoma, también la tinción modificada de Bryan/Leishman. Saake sugiere que el colorante de Giemsa puede ser usado para mostrar los defectos acrosomales en la corona. Y Watson lo propone como un método de evaluación rutinaria del semen, independientemente de la motilidad (31,2,32,25).

Se cuenta con otras pruebas para valorar el da-
ño que sufre el acrosoma en algún momento determinado al-
gunas de ellas serían de utilidad, de esta forma tenemos
la valoración de las proteínas acrosomales por medio de -
espectrofotometría y electroforésis, o el análisis de las
hidrolasas acrosomales, pero como una medida cuantitativa
de la integridad celular el método bioquímico exhibe un -
número de deficiencias o desventajas comparado con el mé-
todo de citoquímica o de otros estudios morfogénéticos.
Sin embargo, la complejidad de instrumentación o la exten-
sión en tiempo, o ambas son dificultades que limitan su -
utilidad en su mayor parte para investigaciones de labora-
torio. Para rutina el uso de productos comerciales harían
de la evaluación de las características acrosomales un -
procedimiento que podría ser realizado con microscopio de
luz convencional y es realmente adaptable al tiempo pro-
gramado al laboratorio (7,18,25, 29,32).

Una serie de estudios señalan la necesidad de
desarrollar un colorante diferencial del acrosoma para -
evaluar las características acrosomales. Para lo cual se
ha usado como ya se ha señalado el microscopio de contras-
te de fase o el microscopio electrónico de barrido o de -
transmisión (32).

En algunas ocasiones señalan los autores, que
el acrosoma da la apariencia de estar hinchado y al proce-

sar el material por técnicas distintas encuentran que presenta alguna anomalía (12,22,32).

Al usar las formulaciones de los diluyentes comunes en la práctica de la inseminación artificial en ovinos encontramos que no se ven diferencias entre los diluyentes en el microscopio óptico, por lo que se podrían comparar con el semen fresco. Sin embargo diferencias y cambios se pueden observar en las fotografías tomadas en el microscopio electrónico (12,22,32).

Aún entre los microscopios electrónicos se observan diferencias no solo en su procesamiento sino también en sus resultados. Esto es porque en la elaboración de las muestras puede haber sustancias que modifiquen bioquímicamente las estructuras y permitan su correcta observación de las muestras (7,8,19).

Es conveniente señalar que hay técnicas que permiten utilizar la misma muestra para el microscopio electrónico de barrido, el de transmisión y el compuesto (8).

Por lo que en los años pasados varios estudios con microscopio electrónico de barrido se han dedicado a los espermatozoides de los mamíferos y se han publicado. Ocasionalmente, han sido analizados aspectos fisiológicos

y morfológicos del gameto masculino usando el microscopio electrónico de barrido. Como una extensión a trabajos previos, se evalúan diferentes técnicas preparativas para espermatozoides. Las imágenes obtenidas por microscopio electrónico de barrido, se comparan con aquellas que se dan por microscopía de contraste de fase y con la tinción de Wells-Awa en el microscopio de luz, en orden para correlacionar estructuras observables por los 3 métodos y para proveer información para analizar el espermatozoide de los seminales para la inseminación artificial o espermatozoides sometidos a un tratamiento experimental.

OBJETIVO

Comparar dos métodos de rutina (observación en microscopio de contraste de fase y microscopio compuesto usando tinción de Wells-Awa) para evaluar anomalías del acrosoma y el daño observado al microscopio electrónico de barrido para estimar la eficiencia de éstos.

MATERIAL Y METODO

Durante el periodo comprendido de octubre de 1985 a junio de 1986 se realizó el presente trabajo utilizando las instalaciones y equipo de los laboratorios de Reproducción Animal y de Microscopía Electrónica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Realizándose 29 preparaciones para los Microscopios de Contraste de Fase y Compuesto, de las cuales se utilizaron 9 para procesarse para el Microscopio Electrónico de Barrido.

Se utilizaron pajillas con semen de carnero congeladas en diluyente tris-yema de huevo, que se descongelaron introduciéndose en agua que se mantuvo a una temperatura de 37° C, controlada termométricamente. Se procedió a cortarse dividiendo su contenido en tres, mismo que se diluyó con 3 soluciones distintas de acuerdo al tipo de microscopio utilizado.

MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE.

Se diluyó la muestra en 0.5 ml. de solución Hankcock, centrifugándose posteriormente por 20 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiental -con el fin de evitar la presencia del diluyente en la muestra-, el sobrenadante se descartó y el precipitado fué resuspendido en el mismo vo

lumen de dilución y lavado por lo menos 3 veces por centrifugación (5 min. a 1500 rpm). El último precipitado - fué resuspendido en sol. Hancock con formaldehído y se mantuvo el tubo de ensaye en el baño maría por 5 minutos, realizándose un conteo de 100 espermatozoides al azar en el microscopio de contraste de fase con el objetivo de - 100X tomando en consideración la siguiente clasificación: normales, hinchados, rotos y ausentes, refiriéndose éstas características al estado del acrosoma.

MICROSCOPIO OPTICO O COMPUESTO.

Se diluyó en 0.5 ml. de citrato de sodio al -- 2.9% realizándose el lavado por medio de centrifugación y resuspendiéndose en la misma solución. Después del -- cuarto lavado se dejó reposar por 5 minutos en el baño -- maría. Y se preparó un frotis a partir de una mezcla de una gota del colorante de Wells-Awa y una gota del semen diluido. Se observó el frotis con el microscopio compues to con el objetivo de 100X. Determinándose y contabili-- zando las anomalías de la misma forma que el ante--- rior.

MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO.

Se diluyó en 2 ml. de buffer de fosfatos, cen trifugándose a baja velocidad (1500 rpm) por 20 minutos,

repitiéndose la operación 2 veces más. Se retiró el sobrenadante y se fijó por 2 a 2.30 hrs. en buffer con glutaraldehído, (a partir de este momento se tuvo cuidado de tener todas las soluciones a 4° C). Posteriormente se realizaron 2 lavados con buffer de fosfatos y fué resuspendido en 2 ml. de tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% dejándose reposar por una hora obteniéndose así una postfixación. Después de este proceso se efectuaron dos lavados con buffer de fosfatos. Para la deshidratación de la muestra se utilizaron series de alcoholes (etanol), realizándose dos cambios por cada concentración, dejándose reposar de 5 a 10 minutos en cada paso y las concentraciones utilizadas fueron 60,70,80,90%. En etanol al 100% son 3 cambios por 5 a 10 minutos. Se eliminó el alcohol haciendo un cambio para acetona. Se secó la muestra a punto crítico para lo que se utilizó el aparato de Technisc, Springfield, y para cubrir con baño de oro el Fine Coat Ion sputter JFC-1100. Las muestras se observaron, clasificaron y contaron en un microscopio electrónico de barrido JSM-25 SII.

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza por mínimos cuadrados, utilizando la transformación al arcoseno de los valores en porcentaje (26).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro No. 1 se muestran los datos obtenidos en el uso de los microscopios de contraste de fase, compuesto y electrónico de barrido.

No encontrándose diferencia estadística significativa en la observación de acrosomas rotos e hinchados en ninguno de los tres microscopios ($p < .05$).

En la observación de acrosomas ausentes el -- que más detectó fué el microscopio electrónico de barrido y en orden decreciente el compuesto auxiliado por la tinción de Wells-Awa y finalmente el de contraste de fase, -- obteniendo diferencias significativas estadísticamente en los tres ($p < .01$).

Por consiguiente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los microscopios de -- contraste de fase y el compuesto contra el microscopio -- electrónico de barrido, encontrándose mayor número de espermatozoides con anomalías acrosómicas en el último -- ($p < .01$).

Los análisis de varianza se presentan en los cuadros 2 al 5.

Wells y Awa (54), trabajando con eyaculados de toros, encontraron que las células espermáticas con formas anormales en el acrosoma eran mucho más fáciles de detectar con el Microscopio de Contraste de Fase que aquellas células que habían perdido el acrosoma. No encontrándose dificultad cuando utilizaban su tinción en la detección de las dos situaciones anteriores. En el presente trabajo se observaron condiciones similares con el semen de los carneros, aclarando que fué más simple la observación de anomalías con el compuesto y la tinción de Wells y Awa, que con el de contraste de fase, debido principalmente a la dificultad que en algunas ocasiones presenta el ajuste de la definición.

A diferencia de lo que señalan Pane y Nicander (citados por Saack, 23), quienes encontraron en el Microscopio Electrónico de Barrido, que los acrosomas hinchados eran los más comunes, en este trabajo solo concuerda cuando se hizo uso de los Microscopios de Contraste de Fase, y el Compuesto, puesto que, utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido la anomalía más común fueron los rotos. Estos autores sugieren que los acrosomas hinchados pueden deberse a proyecciones quísticas acrosomales o es-

permas con vesícula acrosómica anterior (que son un punto débil), los cuales se doblan hacia atrás dando una apariencia de hinchado. Y esto también ha sido reportado por Eljack y Hrudka (10).

Fornusek et. al (12), al observar semen almacenado por largo tiempo y conservado en dos diluentes comúnmente usados en la inseminación artificial, no encontraron diferencias visibles en el Microscopio Compuesto, siendo la cantidad de defectos acrosomales ligeramente mayor que en el semen fresco, al observar en el Microscopio Electrónico se encontraron diferencias y cambios, dependiendo del diluyente en que fueron conservados. Por ejemplo en aquellos que tenían como base Lactosa-Yema de huevo fué de 44%, mientras que los tenían como base Tris-glu cosa-yema de huevo al 6% era tan alto como 59%. Estos autores atribuyen a que la mayoría de los defectos son causados durante la dilución y el equilibrio, siendo menor durante la congelación. Estos aspectos son importantes a considerar cuando se hace observación de semen con gelado.

Ott et. al reportan el caso de una carnero - Corridale, con antecedentes de infertilidad que presenta

ba 50% de acrosomas anormales, los resultados de este trabajo se acercan mucho a esta cifras existiendo coincidencia con los problemas de fertilidad.

López (19) y Courot (7,8) dicen que aún entre los Microscopios Electrónicos se observan diferencias no solo en su procesamiento, sino también en sus resultados. Esto es porque en la elaboración de la muestra puede haber sustancias que modifiquen bioquímicamente las estructuras y permitan la correcta observación de la muestra.

Durante las observaciones en el Microscopio Electrónico de Barrido, se detectaron en el presente trabajo en aumento 1000X algunos acrosomas ausentes, que al ser observados a mayor aumento y al incidir el haz de electrones en otra posición se pudo observar que el acrosoma se encontraba presente.

Por lo que se tendría que realizar una investigación para determinar la posible causa de las anomalías acrosómicas tales como: almacenamiento por períodos prolongados en las pajillas, mal procesamiento de la muestra para congelar, una alta concentración de glicerol, enfermedades, tratamientos o intervenciones quirúrgicas que afectaron al animal, etc. No siendo atribuible al manejo de la muestra para la observación en los diferentes microscopios, puesto que, el porcentaje de anomalías en los tres métodos es alto.

CUADRO No. 1

PORCENTAJE DE ANORMALIDADES DEL ACROSOMA EN SEMEN DE CARNERO (POST-CONGELADO) EN TRES DIFERENTES TIPOS DE MICROSCOPIO.

	MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE SOL. HANCOCK	MICROSCOPIO COMPUERTO SOL. CITRATO SODIO	MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO
NORMALES %	49.09 \pm 5.7 a	47.62 \pm 4.5 a	31.87 \pm 17.7 b
HINCHADOS %	31.82 \pm 8.2 a	34.75 \pm 6.7 a	27.67 \pm 7.7 a
ROTOS %	17.96 \pm 6.0 a	16.72 \pm 4.8 a	34.58 \pm 16.4 a
AUSENTE %	.31 \pm .54 a	.89 \pm .9 b	5.85 \pm 4.4 c

Letras diferentes en los renglones indican diferencias significativas ($p < 0.01$) ANOVA.

CUADRO No. 2

Análisis de varianza para el porcentaje de acrosomas normales en tres tipos de microscopios.

FUENTES DE VARIACION	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TRATAMIENTOS	2	1543.59	771.7	12.30	0.01
ERROR	62	3890.01	62.7		
TOTAL	64	5433.60			

CUADRO No. 3

Análisis de varianza para el porcentaje de acrosomas hinchados en tres tipos de microscopios.

FUENTES DE VARIACION	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TRATAMIENTOS	2	4575.18	2337.59	1.59	N.S.
ERROR	62	90720.04	1463.22		
TOTAL	64	95395.22			

CUADRO No. 4

Análisis de varianza para el porcentaje de acrosomas rotos en tres tipos de microscopios.

FUENTES DE VARIACION	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TRATAMIENTOS	2	130.65	65.32	0.83	N.S.
ERROR	62	5156.00	83.16		
TOTAL	64	5286.65			

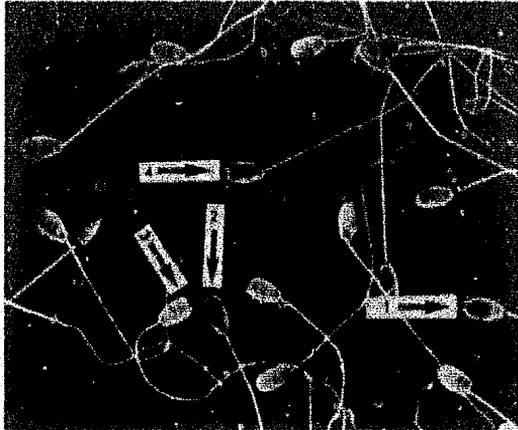
CUADRO No. 5

Análisis de varianza para el porcentaje de acrosomas ausentes en tres tipos de microscopios.

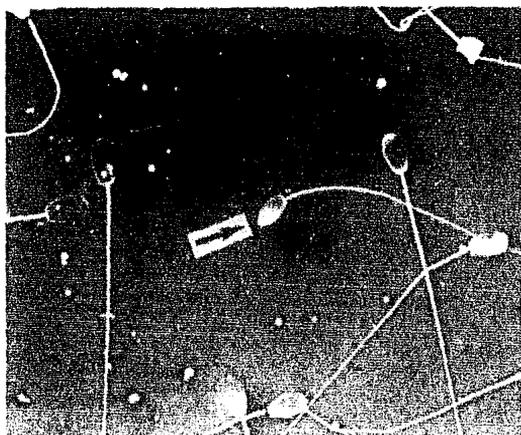
FUENTES DE VARIACION	G.L.	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F	P
TRATAMIENTOS	2	617.31	308	24.40	0.01
ERROR	62	782.64	12.62		
TOTAL	64	1399.95			



LAMINA No. 1



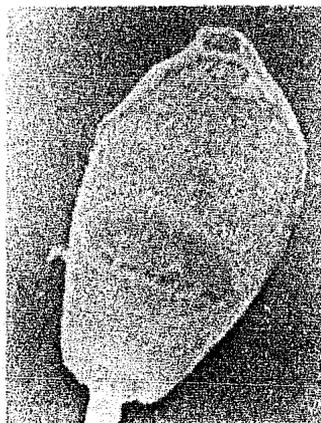
LAMINA No. 2



LAMINA No. 3



LAMINA No. 4



LAMINA No. 5



LAMINA No. 6



LAMINA No. 7



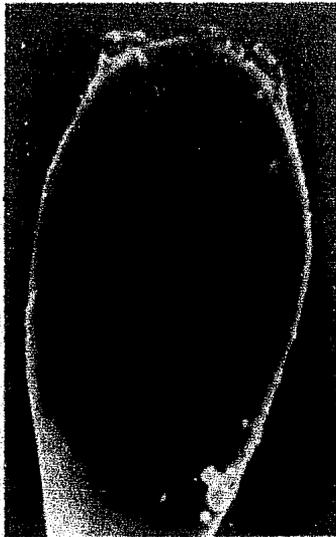
LAMINA No. 8



LAMINA No. 9



LAMINA No. 10



LAMINA No. 11



LAMINA No. 12



LAMINA No. 13



LAMINA No. 14



Lamina No. 15

Lámina No. 1 Es una fotografía tomada en el microscopio electrónico de barrido (M.E.B.) de semen fresco de carnero donde se puede apreciar las diferentes partes - de los espermatozoides sin que tengan alteración apreciable a un aumento de 1000X y 25 Kv.

Lámina No. 2 Microfotografía de semen descongelado - preparado conforme a la técnica descrita donde se encuentra señalado con la flecha No. 1 un espermatozoide con acrosoma roto; con el No. 2 un acrosoma que puede interpretarse como hinchado; con el No. 3 un espermatozoide con el acrosoma a este aumento normal; con el No. 4 un acrosoma hinchado. Estos tres últimos a mayor aumento se observan otras anomalías (láminas 6 y 8).

Lámina No. 3 En esta muestra (que es también de semen descongelado) a 1000X y 25 kv. se ve un espermatozoide con la cabeza denominada "punta de flecha" siendo tomada en el M.E.B.

Lámina No. 4 La fotografía muestra una cabeza de espermatozoide de carnero con acrosoma normal, donde además hay un leve desprendimiento de cola a un aumento de 7000X y 25 Kv. en el M.E.B.

Lámina No. 5 La fotografía muestra el sitio en el cual el acrosoma del espermatozoide está roto en el segmento apical que posiblemente en un microscopio compuesto o contraste de fase se cuantificaría como hinchado. (aumento de 10000X y 25 Kv., M.E.B.)

Lámina No. 6 Los espermatozoides señalados con las flechas 2 y 3 en la lámina No. 2 se observaron a 10000X y 25 Kv en el M.E.B. encontrándose que el señalado con el No. 2 no está hinchado sino que tiene un desprendimiento del acrosoma que se señala en esta lámina con el

No. 2 y por lo mismo en la parte señalada con el No. 1 está separado del núcleo del espermatozoide. La flecha No. 3 nos indica que el acrosoma que aparentemente era normal tiene una ruptura marcada y varias fisuras (M.E.B.)

Lámina No. 7 En un microscopio de Contraste de Fase o en el compuesto este espermatozoide se podría considerar normal porque el acrosoma está levemente hinchado - característica no distinguible a 1000X sin embargo a 7500X y 25 Kv. fué posible en el M.E.B. observar los pequeños pliegues formados en él y desprendimiento de la cola.

Lámina No. 8 Nos muestra el espermatozoide señalado con el No. 1 en la lámina No. 2, donde el acrosoma está roto a un aumento de 10000X y 25 Kv.

Lámina No. 9 Este espermatozoide a 1000X en el C.F. O C nos daría la apariencia de estar hinchado, aquí es posible observarlo a 10000X y 25 Kv con el M.E.B. notando se roto el acrosoma y desprendimiento de cola.

Lámina No. 10 Las lesiones del acrosoma son tan pequeñas que en los microscopios de C.F. o C no es posible detectarlo por lo que se podría considerar como normal si esto un error. Aquí se observa 15000X y 25 Kv. en el M.E.B.

Lámina No. 11 Es otro tipo de ruptura en el acrosoma que sí, es posible detectarla con los microscopios de C.F. o C a 1000X. En la fotografía se observa además el desprendimiento de la cola a 25 Kv y 10000X.

Lámina No. 12 En esta fotografía tomada a 15000X y 25 Kv. en el M.E.B. se observa el acrosoma roto de este espermatozoide.

Lámina No. 13 Se puede observar el espermatozoide de la lámina No. 3 señalado con la flecha a un aumento de 15000X y 25 Kv. en el M.E.B. característica encontrada solo dos veces en el total de las preparaciones para este microscopio

Lámina No. 14 Fotografía tomada en el microscopio de Contraste de Fase donde la flecha señala un acrosoma - roto a un aumento de 1000X

Lámina No. 15 Fotografía de un espermatozoide con el acrosoma hinchado a un aumento de 1000X

Lás láminas 7, 3 y 5 a 15 son fotografías de semen descongelado y procesado para el microscopio señalado al pie de cada fotografía de acuerdo a los métodos ya indicados.

CONCLUSIONES

Para realizar una medida cuantitativa de la integridad del acrosoma se realizaron las pruebas con los tres Microscopios (Compuesto, Contraste de Fase y Electrónico de Barrido), se puede utilizar como método de rutina tanto el Microscopio de Contraste de Fase como el Compuesto auxiliado con la tinción de Wells-Awa puesto que, no se encontraron diferencias entre hinchados y rotos, pero el Microscopio Compuesto logra ser mejor para la detección de acrosomas ausentes. Si bien el Microscopio Electrónico de Barrido fué el que exhibió una mayor resolución es un método laborioso, con una complejidad en instrumentación extenso en tiempo y costo, siendo éstas desventajas que limitan su utilidad.

ANEXO No. 1

PREPARACION DE BUFFER DE FOSFATOS.

Se elaboran dos soluciones de fosfatos, que se deben mantener separadas y en refrigeración hasta antes de trabajar.

SOLUCION A. 0.2 molar de fosfato monobásico de sodio. Para obtener esta molaridad se usan 27.8 gr. de fosfato monobásico en un litro de agua.

SOLUCION B. 0.2 molar de fosfato dibásico de sodio. Se debe tomar en cuenta la fórmula:

si es: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ debe contener 53.65 gr. de fosfato.

si es: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ debe contener 71.7 gr. de fosfato.

En el momento de trabajar se unen las dos soluciones en las siguientes proporciones:

Para 200 ml. de solución se usan 19 ml. de la solución A y 81 de la solución B, aforándose a 200 ml. con agua bidestilada.

Para 1 lt. se utilizan 95 ml. de solución A y 405 ml. de solución B aforándose aun litro con agua bidestilada.

En ambas medidas se debe de obtener un pH de - 7.4 (7.37 a 7.43) el cual se puede ajusta con NaOH o HCl.

ANEXO No. 2

PREPARACION DE TETRAOXIDO DE OSMIO

El frasco donde se va a conservar el tetraóxido de osmio debe llevar el siguiente procedimiento: debe ser frasco de 150 ml. color ambar con tapa de rosca, se debe lavar con jabon dextran y se enjuaga con agua corriente de 7 a 8 veces, se realiza un lavado con solución crómica, se enjuaga 7 u 8 veces con agua corriente, y 3 veces con agua destilada.

La ampollita se debe lavar con una gasa grande con acetona y para su secado utilizar una gasa estéril. La ampollita se debe marcar con cuidado de no romper con una "x" en cada extremo y un círculo en la parte media con el lápiz de diamante.

El frasco debe contener 50 ml. de agua bidestilada y se introduce la ampollita sin romper. Se agita hasta romperla dentro del frasco y se deja 24 hrs. a temperatura ambiente.

LITERATURA CITADA

1. BEDFORD J.M.
Sperm capacitation and fertilization in mammals.
Biol. Reprod. Suppl. 2; 128-158. 1974.
2. BELSEY, ELIASSEN, CALLEGOS, MOGHISSI, PAULSEN.
Manual de laboratorio para la evaluación de semen humano y la interacción con el moco cervical.
Press Concern Singapur
1980.
3. BLUM E.
Om Bedømmelsen Af Tyresperma A.S.
Carl Fr. Mortensen, København
1950.
4. BRAINERD L.
Developmental anatomy
Press of W.B. Saunders Company
6a. edition
Philadelphia
pp. 41-42
5. BUSTOS, OBREGON Y FLECHON
Estudio comparativo de microscopia electrónica de barrido en cerdo, toro y carnero.
Cell. Tiss. Research
161. 329-344 (1975)

6. COLAS G.
Suggest International standars for ram semen exchange.
Madrid, España. 1980
9th. Int. Congress Animal Reproduction A.I.
7. COURTENS J.L.; COUROT M.
Acrosomal and nuclear morphogenesis in ram -
spermatids on experimental study of hipofis-
sectomized and testosterone supplemented ani-
mals.
Anatomy Record. 1960. jun; 197(7) 143-152.
8. COURTENS J.L.; COUROT M. AND FLECHON
The perinuclear substance of boar, bull, ram
and rabbit spermatozoa.
Journal of Ultrastructure REsearch.
57, 54-64 (1976).
9. DUKES H.M. SWINSON M.J.
Fisiología de los animales domésticos.
Tomo 2
Ed. Aguilar
4a. edición. 1978.
10. ELJACK S.H. SNT HRUDKA F.
Pattern and dynamics of teratospermia indu-
ced in rams by parenteral treatment with -
ethilene dibromida.
Journal of Ultrastructural Research.
67,124-134; (1979)

11. FAWCETT DOM W., ANDERSON W.A. AND PHILLIPS D.M.
Morphogenetic factors influencing the shape
of the sperm head.
Developmental Biology
26,110-151 (1971)
12. FORNUSEK L. VETVICKA V. PETELIKOVA V.
Effect of diluents for long terms storage -
on the som
Vet. Med. (Praha)
1981, apr. 26 (4) 213-221.
13. GARNER Y HAFEZ E.
Reproduction in farm animals.
4th. edition
Lea Febiger
Philadelphia. 1980
14. HAM ARTHUR W.
Histología
Ed. Interamericana
7a edición
México. 1975
pag 842.
15. HARRISON R.A.; FLECHON J.E.
Immunocytochemical detection of acrosomal da
mage following cold shock; loss of acrosin -
from the acrosomal region of ram, bull and -
boar spermatozoa.
Reprod. Nutr. Dev.
1980; 20(6); 1801-10

16. HOLT W.V.
Desarrollo y maduración del acrosoma de los mamíferos.
Journal of Ultrastructure Research
68; 56-71 (1979).
17. HRUDKA F; ELJACK A.H.
The effect of EDB on differentiation of the acrosome, nucleus and transient appendages in ram spermatids.
Journal of ultrastructure Research
67, 135-151 (1979).
18. KAUR S.P. CHAUDRY P.; ANAND S.R.
Acrosomal hidrolases in buffalo spermatozoa.
Experientia
1976 apr. 15;32(4) 436-8
19. LOPEZ A.; PEREZ R.
Inseminación artificial en ovinos.
Memorias del curso "Bases de la cría ovina"
Toluca, Méx. 1980.
20. MEDWAY, PRIER, Y WILKINSON.
Patología Clínica Veterinaria.
Ed. U.T.E.H.A.
México, 1980.
pp 511
21. MC DONALD L.E.
Reproducción y Endocrinología Veterinaria
Ed. Interamericana, 2a. Ed.
México 1981
pp 189-192

- 22, OTT R.S., HEATH E.H.: BANE A.
Abnormal spermatozoa, testicular degeneration
and varicocele in a ram.
American Journal Veterinary Research
1992 Feb; 43(2) 241-5
23. SAACKE R.G.: AMANN R.P.: C.E. MARSHALL
Acrosomal cap abnormalitie of sperm subferti-
le bulls.
Journal Animal Sci
1968; 27; 1391
24. SEITZ H.M. BRACKE H.B.G. AND MASTROIANNI
Human Reproduction
Harper and Row Publishers
Unites States of American
p.p. 119-129
25. SORENSEN A.M.
Reproducción animal, principios y prácticas
Mc. Graw Hill.
México, 1982
pp.138-139
26. STEEL R.G. AND TORRIE J.H.
Principles and Procedures of Statistics.
A Biometrical approach.
Second edition
Mc. Graw Hill
New, York, 1960
27. SVENDENSEN, PER.
Introducción a la fisiología animal
Ed. Acribia
España 1976.

28. TASSERON F., AMIR D. AND SHCIDLER H.
Acrosome damage of ram spermatozoa during -
dilution, cooling and freezing.
Journal Reprod. Fert.
(1977) 51, 461-462.
29. TSEKIVAE E., PETROVA K., GRINKO M. GEORGIEV G.S.
Effect of ultra low temperatures on the acro-
somal proteins of bull, and ram spermatozoa.
Vet. Med. Nauki
1983, 20 (5-6) 105-109
30. WATSON P.F. AND MORTON I.C.A.
Comparison of changes in the acrosome of --
deep-frozen ram and bull spermatozoa.
Journal Reprod. Fert.
(1972) 28; 99-101
31. WATSON P.F.
Use of Giemsa stain to detect changes in --
acrosomes of frozen ram spermatozoa.
Veterinary Record
(1975) 97, 12-15.
32. WELLS AND AWA
New technique for assessing acrosomal charac-
teristics of spermatozoa.
Journal of Dairy Science
Vol. 53, No. 2, 227-232
33. YOSHIKASU M.
Ultrastructural study on human sinucleate -
spermatides.
Journal Ultrastruct. Research
34; 123-124.