

39
rej



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán



COMPARACION DE CUATRO TINCIONES PARA EVALUAR LA MORFOLOGIA ESPERMATICA EN SEMEN CAPRINO FRESCO Y CONGELADO

T E S I S

Que para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a :

Heriberto Armando Esquivel Colín

Asesor: M.V.Z. ARTURO TREJO GONZALEZ



V N A M

Cuautitlán Izcalli, Edo. 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:	No. de Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	10
MATERIAL Y METODOS	11
RESULTADOS Y DISCUSION	16
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	24
BIBLIOGRAFIA	25

RESUMEN

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de re producción de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en donde se compararon cuatro tinciones para evaluar la morfolo gía espermática en semen caprino fresco y congelado.

Se utilizaron dos tinciones, Eosina Nigrosina y Rojo Congo-Verde Rápido para detectar espermatozoides vivos y muertos en semen fresco y semen congelado, contando 100 espermatozoides por muestra, evaluando 30 muestras para cada tipo de semen.

Otras dos tinciones, Wells Awa y Giemsa se utilizaron para ver la morfología del acrosoma de los espermatozoides (normal, hinchado, roto, ausente), en 30 muestras de semen fresco para la tinción de Wells Awa y con Giemsa 11 muestras, y 30 mues-- tras para semen congelado para ambos colorantes, observándose 100 células por muestra.

El colorante Rojo Congo-Verde Rápido tiñó la menor cantidad de espermatozoides 70.83% y 72.36% en semen congelado y fresco respectivamente, mientras que la Eosina Nigrosina aumentó los porcentajes a 81.06% y 96.93% en semen congelado y fresco res rectivamente.

Para el caso del daño acrosomal el colorante de Giemsa per mitió observar menos cambios en el acrosoma bajo el Microscopio óptico sin contraste de fase, por lo que pudo considerarse que el colorante Wells Awa tuvo mayor resolución en el semen - congelado. Para el semen fresco el colorante Giemsa demostró tener mayor efectividad para detectar cambios en el acrosoma.

INTRODUCCION

En la planificación reproductiva de una explotación de ganado caprino puede ser recomendable utilizar los métodos más modernos y los últimos avances realizados en reproducción, como la aplicación de la inseminación artificial colocando el semen por medios mecánicos en el tracto reproductor de la hembra (4).

La inseminación artificial es la técnica más importante creada para el mejoramiento genético de los animales. Esto es posible porque con unos pocos machos altamente seleccionados, se producen suficientes espermatozoides para inseminar a miles de hembras al año (11,18).

La inseminación artificial se inició con la utilización de semen fresco y posteriormente con semen congelado, lo que ha permitido un avance genético en diversas especies particularmente en los bovinos. Sin embargo en la especie caprina, no ha dado resultados tan satisfactorios como en los bovinos, ya que la fertilidad alcanzada ha sido relativamente baja (27,28).

Existen factores que pueden provocar problemas en el uso de la inseminación artificial como son:

La calidad del semen que depende del macho, estación del año al momento de la recolección del semen, método de recolección y manejo apropiado del semen que incluye dilución, tasa de enfriamiento, congelado y técnica de descongelado (8,16).

Existen diferencias entre la calidad del semen dentro de diferentes razas y entre machos de una misma raza, presentando además diferentes porcentajes de fertilidad ya que el semen reacciona en diferente forma, a los procesos de refrigerado y

congelamiento (11,22).

La estación del año durante la cual el semen es recolectado afecta la calidad del semen; el semen colectado fuera de la estación de cría tiene un mayor número de espermatozoides anormales y estos no pueden sobrevivir a procesos de congelación tan bien como los obtenidos durante la estación de cría (7).

El semen puede ser obtenido por varios métodos siendo los más comunes la vagina artificial y la electroeyaculación. Una desventaja del segundo, es que el volumen de semen es más grande y la concentración de espermatozoides es menor, además los machos parecen ser traumatizados por el electroeyaculador (5, 16,18).

El semen es normalmente evaluado por concentración, motilidad y morfología, tomando en cuenta estas características, se decide cual semen es adecuado para refrigerarse y/o congelarse (18,22).

El semen fresco diluido puede ser refrigerado y conservado a 4°C; a esta temperatura el semen conserva su poder fecundante entre 10-12 hrs. por lo cual debe ser usado el mismo día que se colecta (9,18).

Otra posibilidad es utilizar semen congelado, generalmente el envase utilizado es la pajilla de 0.25 ó 0.50 ml que contiene de 70-150x10⁶ espermatozoides por dosis. Las pajillas son congeladas en tanques con nitrógeno líquido a -196°C, con esta técnica la capacidad fecundante disminuye de un 22 a un 60% (9, 13,22,24,26,29).

Los factores que influyen en la fertilidad con el uso de la inseminación artificial son: la fertilidad de los machos utilizados para la producción de semen, el cuidado con el que el semen se colecta, la habilidad del técnico inseminador, el manejo

de las hembras, alta calidad del semen, técnica adecuada de des congelamiento e inseminación al momento adecuado del ciclo es tral (11).

Dentro de las ventajas del uso de la inseminación artificial se encuentran las siguientes: mejoramiento genético, se reduce el riesgo potencial de transmitir enfermedades, disponibilidad de registros de apareamiento exactos, necesarios para un buen manejo del hato, servicios económicos con alto valor genético (11).

Dentro de las desventajas del uso de la inseminación artificial se encuentran las siguientes: uso de personal suficiente-- mente bien entrenado para proporcionar un servicio adecuado como es el conocimiento de la Anatomía y Fisiología de la hembra, tener instalaciones adecuadas para encorralar a las hembras a fin de detectar el estro, preparar y manejar machos marcadores, manejo adecuado del semen, ya que se presentan variables que no ocurren en la monta natural (11).

Entre las posibles causas en los bajos resultados obtenidos con semen congelado, se señala el daño acrosomal por dilución y congelación del semen (34), ocasionado por falta de protección de los diluyentes ordinarios a las células espermáticas durante la congelación (32); esto mismo ocurre en el segmento del apara to genital de la hembra en donde es depositado el semen (1,22).

En el semen de carnero se daña una proporción mayor de esper matozoides que en el semen de toro durante el congelamiento y descongelamiento (28). Pero si comparamos el uso de semen congelado entre cabras y borregos, tendremos que en las primeras -- los resultados son más exitosos (1).

Otro de los factores que afectan la fertilidad del semen en la inseminación artificial es la cantidad de espermatozoides -- que se introducen en el tracto genital femenino (13,29).

En la inseminación artificial se han empleado diversos tipos de diluyentes como gelatina, yema de huevo, leche descremada, y otros; con el propósito de aumentar el volumen del eyaculado y de proveer al espermatozoide de un medio que llene sus requerimientos fisiológicos y le permita sobrevivir y conservar su capacidad fecundante. Pese a la congelación los resultados obtenidos con los diferentes diluyentes son similares en cuanto a recuperación de motilidad y fertilidad, por lo que es posible emplearlos indistintamente (2,22,35,36).

Muchas células tienen alta recuperación solo si un crioprotector está presente en el medio que la suspende durante el enfriamiento. Estos compuestos se han clasificado en: a) penetrantes como el glicerol y el dimetil sulfóxido (DMSO) (23,31) y b) no penetrantes como el polyvinylpyrrolidone (PVP) y polymer hydroxyethyl starch (HES) (20,21). La protección de estos compuestos se basa en la restricción de la congelación intracelular y reducción al mínimo del daño celular debido a los solutos concentrados en el medio durante el enfriamiento.

La no fecundación es la causa principal de fertilidad disminuida después de un prolongado almacenamiento del semen. Con el envejecimiento normal o la lesión, el capuchón acrosómico del espermatozoide bovino, sufre una serie de alteraciones que lleva a la formación de un segmento ecuatorial y a la pérdida del acrosoma anterior. La frecuencia de alteración depende de los toros, de los eyaculados y de los procedimientos para manejar el semen y se correlaciona bien con las frecuencias de concepción (11).

En investigaciones más recientes no se ha mostrado disminución en la fertilidad del semen almacenado a -196°C por varios años en el caso del carnero (28), siempre y cuando no haya fluctuaciones en la temperatura de almacenaje.

Ocurren cambios acrosómicos similares dentro de los espermatozoides en el almacenamiento in vitro, con una disminución subsecuente de la fertilidad y aumento de la mortalidad embrionaria, en bovinos, cerdos y ovinos (11).

El semen de la mayoría de los machos contiene algunos espermatozoides con defectos de conformación. Esto por lo general, no se asocia con fertilidades más bajas, hasta que la proporción de anormales excede el 20%. Frecuentemente cuando el semen de un macho muestra un elevado porcentaje de células anormales presenta a la vez baja concentración de espermatozoides y escasa motilidad. El semen fresco observado al microscopio con objetivo de inmersión (100x), proporciona solamente una idea del número de espermatozoides anormales. Como consecuencia de la alta concentración, resulta a menudo difícil obtener una cifra aproximada de células anómalas en una muestra sin diluir (11,16).

Esta demostrado que el semen que contiene un alto porcentaje de espermatozoides anormales posee baja capacidad fertilizante.

Se ha comprobado que las vacas fecundadas por toros con porcentaje de espermatozoides defectuosos superior a la media normal muestran con mayor frecuencia muerte temprana de los embriones, ya que el pasaje del espermatozoide a través de la superficie ovular (penetración) involucra el cumplimiento de importantes y fundamentales pasos preliminares: a) reacción acrosómica del espermatozoide, b) penetración de cada una de las cubiertas ovulares, c) unión del espermatozoide a la membrana del óvulo, por lo cual cuando un óvulo es rodeado por abundantes espermatozoides anormales cuenta con pocas o nulas posibilidades de ser fecundado (16).

Las anomalías morfológicas de los espermatozoides pueden ser primarias o secundarias. Las anomalías primarias están causadas por aberraciones en la espermatogénesis, mientras que las anomalías secundarias se deben a alteraciones en etapas

posteriores de la maduración espermática. Con frecuencia, las anomalías secundarias obedecen a eyaculaciones defectuosas o incompletas, desequilibrios térmicos, enfermedades genitales o manipulación deficiente del semen una vez recogido. En general, la fertilidad potencial es baja, cuando un elevado porcentaje de espermatozoides tienen anomalías primarias o secundarias (16).

En la práctica de la inseminación artificial, como en general en el examen de los eyaculados, para establecer la actividad de la línea germinal es necesario conocer la proporción existente entre los elementos espermáticos morfológicamente -- anormales y los que no lo son. Además es preciso definir el porcentaje de espermatozoides que se pueden considerar vivos en el campo de la investigación y por lo tanto probablemente fecundantes (3).

Para conocer el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos el colorante más comúnmente usado es la eosina combinada -- con la nigrosina, la primera sería incorporada inmediatamente sólo por los espermatozoides ya muertos en el momento de la mezcla y la segunda dará una coloración de contraste facilitando así el recuento de los espermatozoides (3,16,30).

El semen de carnero al ser descongelado llega a tener una motilidad espermática arriba del 60-70%, sin embargo el acrosoma de dichos espermatozoides se ve dañado por el proceso de descongelación, por lo que se han utilizado tinciones para observar dicha alteración, como Giemsa y Wells Awa y conocer el estado del acrosoma para poder predecir el grado de fertilidad de los espermatozoides en el proceso de la inseminación artificial -- (33,37).

Se ha observado en el toro que una alta motilidad es más importante que la alta densidad espermática para la concepción

(19). En células con daño acrosomal, no necesariamente se encuentra afectada la motilidad, pero si su fertilidad (15).

El 68% del daño acrosomal está distribuido al azar entre la población de células móviles e inmóviles (15). Debido a esto, la evaluación de motilidad no da un margen confiable de la fertilidad del semen; sin embargo, esta prueba ha sido empleada - comúnmente para evaluar los resultados de la congelación del semen (16,31,32).

Para determinar el daño acrosomal se han hecho diferentes - trabajos, Tasseron et al., (32) investigaron el daño acrosomal ocasionado por el proceso de congelación.

Jone (17) al congelar semen de carnero, encontró que el daño celular en espermatozoides congelados con glicerol, fué mayor que el producido con dimetil sulfoxido (DMSO), pero no fué diferente al encontrado cuando se empleo la combinación de estos compuestos, de esto se deduce que el DMSO solo confiere -- cierta protección a la célula durante la congelación.

Watson y Martin (34) observaron que el acrosoma del espermatozoide de carnero es más susceptible al daño por congelación que el de bovino durante este proceso. Estos autores encontraron menos espermatozoides normales que los observados por --- otros investigadores (17,32).

Entwistle (10) encontró que en frotis teñidos con Rojo Congo-Verde Rápido, daban un porcentaje más significativo en relación a espermatozoides vivos y muertos en semen de carnero.

En relación a la fertilidad con semen congelado Salamon y Visser (27) han observado que la inseminación artificial en -- ovinos no ha dado resultados tan satisfactorios como en los bovinos, ya que los índices de fertilidad alcanzados con semen - congelado han sido muy bajos.

Colas (6), obtuvo índices de concepción similares en ovinos al utilizar semen fresco con glicerol; sin embargo Tasseron et al., (32) como resultado colateral de su trabajo obtuvieron un índice de concepción mucho más bajo en ovinos, atribuyendo sus pobres resultados al número reducido de espermatozoides utilizados en la inseminación artificial y al lugar de su aplicación, más que a la técnica empleada para congelar.

OBJETIVOS

- 1) Correlacionar la motilidad progresiva del semen fresco y descongelado con el porcentaje de células coloreadas con dos tinciones vitales.
- 2) Correlacionar la motilidad progresiva del semen fresco y descongelado con el porcentaje de espermatozoides con daño acrosomal.
- 3) Determinar las características de cada tinción para su uso en forma rutinaria en el laboratorio.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán ubicada en Cuautitlán Izcalli, Estado de México localizada a 2450 metros sobre el nivel del mar y a $19^{\circ} 43'$ latitud Norte y $99^{\circ} 14'$ de longitud Poniente (14).

Se llevó a cabo durante los meses de Junio a Noviembre de 1985, se obtuvieron 30 muestras de semen fresco de machos caprinos adultos de las razas Saanen, Nubia, Toggenburg y Alpina por medio de vagina artificial y en forma aleatoria. Cada una de las muestras ocupó un volumen de 0.5 a 2.0 ml, tomándose de cada una 0.1 ml el cual se diluyó y tiñó, y 0.05 ml de semen fresco para congelarse y trabajarse posteriormente desechándose el sobrante.

Las vaginas utilizadas consistían de un tubo rígido de material plástico, una funda y un cono de polietileno, el tubo colector (tubo de centrifuga con graduación) con su correspondiente protector contra la luz.

Para la obtención del semen, la vagina artificial se llenó con agua caliente a temperatura de $40-50^{\circ} \text{C}$ y a una presión adecuada en su interior, la cual se calculó tomando en cuenta el tamaño del pene, de tal manera que al introducirse este dentro de la vagina artificial se pudiera llevar a cabo la eyacuación y así poder medir el volumen del semen, el cual posteriormente se conservó a una temperatura de 37°C en baño maría.

Para el caso del semen fresco, posteriormente se realizó una dilución del semen 1:100 a la temperatura promedio de $37-38^{\circ} \text{C}$ proporcionada por el baño maría. Se tomó una pequeña cantidad, usando una pipeta Pasteur que se colocó en un portaobjetos para observar la motilidad progresiva de los espermatozoides, median

te el uso de un Microscopio Compuesto con el objetivo de 10x, expresando el valor en porcentaje, para lo cual se toma en cuenta la cantidad de células que se mueven en relación con las que no se mueven vistas en el campo del Microscopio y a criterio se da un valor de motilidad por muestra. Para sacar el promedio de motilidad del total de las muestras, se suman las motilidades de cada una y se divide este entre el número total de ellas (3).

Para teñir el semen diluido se tomaron cuatro alicuotas para cada uno de los colorantes: Eosina Nigrosina (Herrick y Self, 1965), Rojo Congo-Verde Rápido (Entwistle, 1972), Wells Awa (Wells y Awa, 1968), y Giemsa (Watson, 1975).

Para la preparación ver Anexo No. 1.

Las tinciones se realizaron con todo el material de cristalería y los colorantes a temperatura controlada (37°C), efectuando cada tinción en la forma siguiente:

Eosina Nigrosina

Se toma una pequeña cantidad de la dilución del semen por medio de una pipeta Pasteur, la cual se deposita en una placa de porcelana con concavidades y se le añade una gota del colorante dejándose reposar durante 5 minutos y posteriormente se procede a tomar la mezcla con otra pipeta Pasteur, para colocar una gota sobre un portaobjetos y realizar un frotis.

Rojo Congo-Verde Rápido

A una parte de semen diluido se le añadió una gota del preparado de colorantes antes de hacer un frotis y se dejó reposar - la mezcla durante 3 minutos.

Wells Awa

A una pequeña cantidad de la dilución del semen se le añadió una gota del colorante, se dejó reposar durante 1 minuto antes de realizar el frotis correspondiente.

Giemsa

La mezcla de semen colorante se dejó reposar durante 30 minutos y posteriormente se procede a realizar un frotis.

Nota: Los tiempos de reposo para cada colorante se establecieron de acuerdo al autor que propuso cada técnica originalmente.

Los frotis de cada alicuota se dejaron secar dentro de una estufa a 37°C.

Para determinar las características de los espermatozoides se contaron en cada uno de los frotis 100 gametos bajo un Microscopio Compuesto utilizando el objetivo de inmersión (100x) (3).

Cuando se usaron los dos primeros colorantes se contaron los espermatozoides teñidos y los espermatozoides no teñidos (vivos y muertos) respectivamente (10,16), así como las anomalías de tipo primario y secundario. Con los otros dos colorantes -- que son específicos para acrosoma se observó esta estructura para encontrar alteraciones de acuerdo a la clasificación de Watson (33) y Wells and Awa (37), que incluye acrosomas hinchados, rotos y ausentes.

Para el caso del semen congelado se preparó un diluyente a base de TRIS-yema de huevo (Fukui, 1979) (Anexo No. 2), el cual -- una vez preparado, se puso en baño maría a una temperatura de 37°C para que al momento de obtener la muestra del semen (dilu-

ción 1:4 v/v), se trasladó al refrigerador para iniciar su acondicionamiento, dejándolo reposar durante un mínimo de 2 horas. Después se llenaron las pajillas de 0.25 ml sellándolas - con alcohol polivinílico y se dejaron dentro del termo recibiendo los vapores del nitrógeno líquido durante 15 minutos, para - posteriormente introducir las directamente al nitrógeno líquido y así dejarlas almacenadas.

Después de una semana se llevó a cabo la descongelación y se hicieron las mismas tinciones que para el semen fresco.

La descongelación del semen se llevó a cabo de la siguiente forma:

a) Después de sacar una pajilla del nitrógeno líquido se colocó esta en baño maría a 37°C y se dejó sumergida durante - 30 segundos.

b) El contenido se colocó en un tubo de ensaye el cual -- contenía una solución de Citrato de sodio al 2.9% (0.8 ml), dejerándose reposar a 37°C durante 5 minutos.

c) Del tubo de ensaye se tomó con una pipeta Pasteur una pequeña cantidad del semen diluido y se colocó en un portaobjetos calentado para observar la motilidad progresiva en forma - similar al semen fresco.

d) Posteriormente se centrifugó la muestra a 5000 r.p.m. durante 5 minutos para después retirar el sobrenadante, pues el diluyente forma artefactos que impiden una tinción adecuada (37).

e) Se vuelve a añadir con una pipeta 0.8 ml de la solución de Citrato de sodio al 2.9%.

f) Se hacen las tinciones: Eosina Nigrosina, Rojo Congo-Verde Rápido, Wells Awa, Giemsa, revisándose de manera semejante que con el semen fresco.

Los datos se evaluaron estadísticamente mediante análisis de varianza, con arreglo factorial 2x2, y análisis de regresión y correlación lineal simple y múltiple. Todos los valo

res de porcentaje fueron transformados al arcoseno antes de analizarlos (Reyes, 1978).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el cuadro No. 1 se aprecia el porcentaje de espermatozoides teñidos con dos diferentes tinciones. El Rojo Congo-Verde Rápido (RV), tiñó la menor cantidad de espermatozoides 70.83% y 72.36% en semen congelado y fresco respectivamente, mientras que la Eosina Nigrosina (EN) marcó altos porcentajes 81.06% y 96.93% en semen congelado y fresco respectivamente siendo la diferencia estadísticamente significativa.

Como se puede apreciar en el cuadro No. 2 existieron diferencias significativas entre la tinción y el tipo de almacenamiento existiendo interacción por lo que se puede considerar al colorante Rojo Congo-Verde Rápido (RV) como el que presentó una mejor correlación con motilidad progresiva lo que coincide con lo reportado por Entwistle (10). Pero analizando el cuadro No. 4 se constató que no existe correlación entre el RV y la motilidad progresiva cuyos valores son 29.66 ± 7.64 y 69.33 ± 11.12 para semen congelado y fresco respectivamente, por lo que su uso como tinción supravital no es muy confiable. En el mismo cuadro No. 4 se aprecia que la EN si presenta una correlación positiva con la motilidad progresiva, siendo el coeficiente de correlación $r = -0.37$ por lo que su aplicación es muy limitada. Además se apreció sin cuantificar, que los gametos se observan con mayor claridad bajo el Microscopio con RV.

Con respecto al daño acrosomal se observa en los cuadros No. 1 y No. 3 que fué diferente para cada tratamiento existiendo efectos significativos ($P < 0.01$) para la tinción, el tipo de semen y una interacción entre ambos, por lo que el daño acrosomal se manifiesta más claramente en el semen congelado (Fukui (12); Watson y Martin (34)).

El colorante Giemsa (G) permitió observar menos cambios en el acrosoma bajo el Microscopio óptico sin contraste de fase

por lo que pudo considerarse que el colorante Wells Awa (WA) tiene mayor resolución (Wells y Awa (37)). Para el semen fresco el colorante Giemsa demostró mayor efectividad para detectar cambios en el acrosoma, pero en este tipo de semen la importancia del daño acrosomal es menor ya que son escasas las alteraciones del acrosoma en relación a lo que sucede en el semen congelado al momento de la descongelación, en el cuadro No. 1 se aprecia 95.27% de acrosomas normales y 83.10% con G y WA respectivamente.

En el cuadro No. 4 se aprecia que las correlaciones fueron positivas entre la motilidad progresiva y los acrosomas normales para el Giemsa, siendo los coeficientes de correlación -0.37 para el semen congelado y -0.55 para el semen fresco, pero una limitante para el uso del Giemsa es la dificultad de su preparación (Watson (33)).

En el cuadro No. 5 se muestra que los coeficientes de correlación aumentan si se analizan más de dos variables en ecuaciones de regresión múltiple. Así la calidad del semen teñido con Wells Awa y Giemsa puede apreciarse mejor considerando el total de acrosomas normales y el total de acrosomas hinchados que es la alteración más frecuente (Tasseron y Amir (32)).

Se debe de tomar en cuenta que existen factores que pueden dar resultados diferentes a los esperados como son: acción tóxica y mortificante de los colorantes sobre los espermatozoides, determinadas variaciones de composición y bioquímica del material espermático examinado para lo cual no hubo diseño ya que se usaron pocos machos y además no parece haber efecto, edad de las células espermáticas presentes o de la sensibilidad cromática o de permeabilidad de las mismas o, más propiamente de su capuchón cefálico, artificios de técnica que modifican la sensibilidad citológica, diferente temperatura al momento de la tinción entre semen y colorante, variación del pH al momento de la coloración, tiempo de exposición del espermatozoide al coloran-

te, concentración del colorante. Los resultados presentados en el cuadro No. 4 sobre las tinciones supravitales sugieren que - no forzosamente se tiñen únicamente espermatozoides muertos, lo que indica el poco valor de las tinciones supravitales, coincidiendo con las interrogantes de Bonadona (3).

Cuadro No. 1 Promedios para Espermatozoides Teñidos utilizando dos tinciones vitales y Acrosomas Normales con dos tinciones específicas en semen caprino fresco y congelado.

Característica	Semen Fresco		Semen Congelado	
	EN	RV	EN	RV
Espermatozoides Teñidos %	96.93 \pm 4.35 a	72.36 \pm 19.19 b	81.06 \pm 11.82 b	70.83 \pm 11.76 b
Acrosomas Normales %	WA	G	WA	G
	83.10 \pm 6.07 a	95.27 \pm 06.27 b	40.40 \pm 13.07 c	60.66 \pm 09.56 d
Motilidad Progresiva %	69.33 \pm 11.12 b		29.66 \pm 07.64 a	

EN --- Tinción Eosina Nigrosina

RV --- Tinción Rojo Congo-Verde Rápido

WA --- Tinción Wells Awa

G --- Tinción Giemsa

Letras diferentes en los renglones representan diferencias significativas (P < 0.01) (ANOVA - Duncan)

Cuadro No. 2 Análisis de Varianza con Arreglo Factorial para Espermatozoides Teñidos con dos tinciones vitales en semen caprino fresco y congelado.

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	119	23958.1	201.3	
Tratamientos	3	11825.8	3941.9	37.7**
Tinción (T)	1	7471.0	7471.0	71.4**
Almacenamiento (A)	1	2713.8	2713.8	25.9**
T x A	1	1641.0	1641.0	15.7**
Error	116	12132.3	104.5	

GL = Grados de Libertad

** Estadísticamente significativos ($P < 0.01$)

Cuadro No. 3 Análisis de Varianza con Arreglo Factorial para Acrosomas -
 Normales con dos tinciones específicas en semen caprino fresco
 y congelado.

Fuentes de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F
Total	100	23240.66	232.40	
Tratamientos	3	19013.40	6337.80	145.40**
Tinción (T)	1	971.32	971.32	22.20**
Almacenamiento (A)	1	14980.04	14980.04	343.73**
T x A	1	3062.04	3062.04	70.26**
Error	97	4227.26	43.58	

GL = Grados de Libertad

** Estadísticamente significativos ($P < 0.01$)

Cuadro No. 4 Correlaciones entre la Motilidad Progresiva y algunas características espermáticas observadas en frotis de semen caprino con cuatro diferentes tinciones.

Característica	Tinción	Tipo de Semen	Coefficiente de Correlación (2)	Significancia Estadística	Ecuación de Regresión
Espermatozoides Teñidos	EN	Fresco	-0.25 (30)	NS	Y= 50.46-0.25x
		Congelado	-0.37 (30)	0.05	
	RV	Fresco	-0.11 (30)	NS	
		Congelado	-0.13 (30)	NS	
Acrosomas Hinchados	WA	Fresco	-0.18 (30)	NS	
		Congelado	-0.04 (30)	NS	
	G	Fresco	-0.55 (11)	0.05	Y= 70.00-0.98x
		Congelado	-0.37 (30)	0.05	Y= 32.95-0.31x
Acrosomas Rotos	WA	Fresco	0.36 (30)	0.05	No se estimó (1)
		Congelado	-0.26 (30)	NS	
	G	Fresco	-0.24 (11)	NS	
		Congelado	-0.14 (30)	NS	
Acrosomas Ausentes	WA	Fresco	-0.05 (30)	NS	
		Congelado	-0.13 (30)	NS	

(1) No se estimó porque los valores de x variaron solamente de 0-3 y no se puede explicar una correlación positiva.

(2) Números entre parentésis = Número de observaciones

Ecuación de Regresión $Y = b_0 + b_1x$ donde: b_0 = intersección con el eje "y"
 b_1 = pendiente de la recta

EN = Tinción Eosina Nigrosina
 RV = Tinción Rojo Congo-Verde Rápido
 WA = Tinción Wells Awa
 G = Tinción Giemsa

Cuadro No. 5 Correlaciones Lineales Múltiples entre la Motilidad Progresiva y algunas características espermáticas observadas en frotis de semen caprino con cuatro diferentes tinciones.

Características	Tinción	Tipo de Semen	Coefficiente de Determinación	Coefficiente de Correlación	Ecuación de Regresión
Espermatozoides Teñidos + Anormalidades secundarias	Eosina Nigrosina	Fresco	0.19	0.44	
		Congelado	0.19	0.44	
Acrosomas Normales + Acrosomas Hinchados	Wells Awa	Fresco	0.36	0.60*	$Z = 99.53 - 2.42(x) + 1.26(y)$
		Congelado	0.40	0.63*	$Z = 6.84 + 0.25(x) + 0.56(y)$
	Giemsa	Fresco	0.90	0.94**	$Z = 80.44 - 0.01(x) - 1.82(y)$
		Congelado	0.26	0.51	

Nota: Para la tinción Rojo Congo-Verde Rápido no se pudieron observar anomalías secundarias, por lo cual no se muestra en el presente cuadro.

Significancia Estadística * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.01$)

Ecuación de Regresión $Z = A_0 + A_1(x) + A_2(y)$

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La tinción Eosina Nigrosina (EN) presentó una correlación positiva con la motilidad progresiva del semen, pero con un coeficiente de correlación muy bajo, por lo que su aplicación es muy limitada como tinción supravital. En el caso de la tinción Rojo Congo-Verde Rápido (RV) al no existir correlación entre el colorante y la motilidad progresiva no se puede usar como tinción supravital ya que no es muy confiable.

La tinción RV ofrece mayor claridad en la observación de los frotis ya que permite una mejor diferenciación entre células teñidas y células no teñidas.

Para el caso del daño acrosomal la tinción Wells Awa (WA) resultó mejor en cuanto a resolución óptica que la tinción de Giemsa (G) en lo referente al semen congelado, sucediendo lo contrario para el semen fresco.

Por lo tanto en base a los resultados aquí presentados se recomienda WA como la mejor tinción de rutina tanto para morfología general como para daño acrosomal.

Por último se sugiere se ahonden los experimentos, con respecto a la predicción de la fertilidad del semen relacionada con la morfología celular, requiriéndose para esto un estudio más a fondo del presente trabajo sobre el índice de concepción el cual es la prueba más precisa para determinar la capacidad fecundante del semen.

Sin embargo, su evaluación requiere tiempo y recursos para hacer el diagnóstico de gestación y observar los resultados, por lo cual no se llevó a cabo en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Anderson, V.K., J. Aamdal and J.A. Fougner. (1973). ---
Intrauterine and deep cervical insemination
with frozen semen in sheep. Zuchthyg 8:115.
- 2) Blackshaw, A.W. (1960). The effect of milk diluents on the
viability of ram spermatozoa and
their revival after freezing. Aust.
Vet. J. 36: 432-435.
- 3) Bonadona, T. (1962). Fisiopatología de la Reproducción y
de la Fecundación Artificial de los
Animales Dómesticos. Tomo 1. Editorial
Salvat. 1^a Edición. Barcelona, España.
- 4) Bretzlaff, K. (1983). A/I for beginners. Dairy goat J. 61
(5): 89-92.
- 5) Cameron, R.D.A. (1977). Semen collection and evaluation
in the ram. Aust. Vet. J. 53:380-383.
- 6) Colas, G. (1975). Effect of initial freezing temperature,
addition of glycerol and dilution on the
survival and fertilizing ability of deep
frozen ram semen. J. Reprod. Fertil. 42:
277.
- 7) Colas, G. (1984). Factors affecting the quality of ram
semen. En: Sheep production. Ed. Buheworths.
- 8) Colas, G. y Y. Guerin. (1981). A new method for thawing
frozen ram semen. Theriogenology 16 (6): 623-
629.

- 9) Dziuk, P.J. (1972). Comparison between natural service and Artificial Insemination with fresh or frozen sperm at an appointed time in the ewe. *J. Anim. Sc.* 35 (3): 572-575.
- 10) Entwistle, K.W. (1972). Congo Red-Fast Green FCF as a supravital stain for ram and bull spermatozoa. *Aust. Vet. J.* 48 : 515-519.
- 11) Foote, R.H. (1980). Inseminación Artificial. EN. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 4^a Edición. Editorial Interamericana. México, D.F.
- 12) Fukui Y. (1979). Effects of different diluents, thawing temperatures and material of thawing --- container on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Japan J. Animal Reprod.* 25: 160-169.
- 13) Fulkerson, J.W., A.L. Synnot and D.R. Lindsay. (1982). - Numbers of spermatozoa required to effect a normal rate of conception in naturally mated Merino ewes. *J. Reprod. Fert.* 66: 129-132.
- 14) García, E. (1973). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopen. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 15) Healey, P. (1969). Effect of freezing on the ultrastructure of spermatozoa of some domestic animals. *J. Reprod. Fert.* 18: 21-27.

- 16) Herrick, J.B. and H.L. Self. (1965). Evaluación de la Fertilidad del toro y del verraco. Editorial. Acricia. Zaragoza, España.
- 17) Jone, R. (1965). The use of Dimethyl sulfoxide, glicerol and reconstituted skim milk for the -- preservation of ram spermatozoa. Aust. J. Biol. Sci. 18: 887-900.
- 18) Langford, G.A., G.J. Marcus., A.J. Hackett., L. Ainsworth., M.S. Wolynetz and H.F. Peters. (1979). A comparison of --- fresh and frozen semen in the insemination of confined sheep. J. Anim. Sci. 59: 685-691.
- 19) Linford, E., F.A. Clover., C. Bishop and D.L. Stewart. --- (1976). Relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. J. Reprod. Fert. 47: 283-291.
- 20) Locksley, E.M. (1978). Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. Cryobiology 15: 382-390.
- 21) Meryman, H.T. (1971). Cryoprotective agents. Cryobiology 8: 173-183.
- 22) Olafsson, T. (1980). Insemination of sheep with frozen semen. Zuchthg. 15: 50-59.
- 23) Page, R.D., M.R. Gembauer., H.W. Snedeker and W.S. Gaunya. (1968). Dimethyl sulfoxide as a freezing - additive for bovine semen. J. Dairy Sci. 51: 949-950.
- 24) Restall, B.J. (1961). Artificial Insemination of sheep. --- Aust. Vet. J. 37: 70-72.

- 25) Reyes, C.P. (1978). Diseño de experimentos agrícolas. Edit. Trillas. México, D.F.
- 26) Sahni, K.L. and A. Roy. (1972). A note on the effect of the storage temperatures on the keeping quality of sheep and goat semen in different diluent. Jour. Sci. 42 (8): 580-583.
- 27) Salamon, S. and D. Visser. (1974). Recent advances in the deep-freezing of ram semen. J. Sci. 4: 275-288.
- 28) Salamon, S. and D. Visser. (1974). Fertility of ram --- spermatozoa frozen-stored for 5 years. J. Reprod. Fert. 37: 433-435.
- 29) Schindler, H. and D. Amir. (1973). The conception rate of ewes in relation to sperm dose and time of insemination. J. Reprod. Fert. 34:191-196.
- 30) Schoenfeld, C., D.M. Richard., D. Lawrence and A. Susanna. (1981). A new staining technique for the rapid determination of the morphologic characteristics of sperm. Fertility on Infertility 6 (3): 408-410.
- 31) Snedeker, W.H. and W.S. Gaunya. (1970). Dimethyl sulfoxide as a cryoprotective agent for freezing bovine semen. J. Anim. Sci. 30: 953-956.
- 32) Tasseron, F., D. Amir and H. Shindler. (1977). Acrosome -- damage of ram spermatozoa during dilution, cooling and freezing. J. Reprod. Fert. 51 : 461-462.

- 33) Watson, P.F. (1975). Use of a Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 97: 12-15.
- 34) Watson, P.F. and I.C.A. Martin. (1972). A comparison of changes in the acrosomes of deep-frozen ram and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 28: 99-101.
- 35) Watson, P.F. and I.C.A. Martin. (1973). The response of ram spermatozoa to preparations of egg yolk in semen diluents during storage at 5^o or -196^oC. *Aust. J. Biolog. Sci.* 26: 927-935.
- 36) Watson, P.F. and I.C.A. Martin. (1976). Artificial -- Insemination of sheep. The fertility of semen extevided in diluents containing egg yolk and inseminated soon after dilution or stored at 5^oC for 24 or 48 hours. *Theriogenology.* 6 (5): 553-558.
- 37) Wells, M.E. and O.A. Awa. (1968). New technique for - assessing acrosomal characteristics of --- spermatozoa. *J. of Dairy Sci.* 53 (2): 227-232.

Eosina Nigrosina

- a) 4% Eosina
- b) 10% Nigrosina

En una solución de Citrato de sodio a 980 mM

Rojo Congo-Verde Rápido

- a) 3% Rojo Congo
- b) 2% Verde Rápido FCF

En una solución de TRIS - Hidroximetil
Amino - Metano
(THMAM)

Calentar a 92°C en baño maría durante 10 minutos.

Wells Awa

- a) Floxina 1% ----- 1 parte
- b) Verde Rápido FCF 1% ----- 1 parte
- c) Alcohol Etilico ----- 1.7 partes

Giemsa

- a) Agua Destilada 47%
- b) Metanol Absoluto 25.5%
- c) Giemsa 0.52%

ANEXO No. 2

Diluyente para semen congelado
(Para preparar 100 ml)

Sustancia	Cantidad
a) TRIS - Hidroximetil Amino - Metano (THMAM)	269 mM
b) Fructuosa	74 mM
c) Acido cítrico	18%
d) Yema de huevo	20%
e) Glicerol	7%