

56
25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

EFFECTO DE LA SEPARACION DE
ESPERMATOZOIDES A TRAVES DE GRADIENTES
DE PERCOLL ANTES Y DESPUES DE LA
CONGELACION. SOBRE LA MOTILIDAD
PROGRESIVA Y LA MORFOLOGIA ESPERMATICA
DE SEMEN CAPRINO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A N :

JOSE LUIS ORTIZ RIOS

SERGIO REYES MALDONADO

0279521

ASESOR: MVZ. M. EN C. ARTURO ANGEL TREJO GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO.

1999

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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



U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

~~"Efecto de la separación de espermatozoides a través de gradientes de
percoli antes y después de la congelación, sobre la motilidad progresiva
y la morfología espermática de semen caprino"~~

que presenta el pasante: José Luis Ordaz Ríos
con número de cuenta: 8842455-2 para obtener el TITULO de:

Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de Marzo de 1999

PRESIDENTE

MVZ Carlos Manuel Appendini Taxer

VOCAL

MVZ Fernando Viniestra Rodríguez

SECRETARIO

H.C. Arturo Trejo González

PRIMER SUPLENTE

MVZ Wilson F. Medina Barrero

SEGUNDO SUPLENTE

MVZ Luis Alejandro Vázquez López

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

U. N. A. M.
ASUNTO: VOTO APROBATORIO
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

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

"Efecto de la separación de espermatozoides a través de gradientes de mercol antes y después de la congelación, sobre la motilidad progresiva y la morfología espermática de semen canino"

que presenta el pasante: Sergio Reyes Maldonado
con número de cuenta: 9256773-3 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 16 de Marzo de 1999

PRESIDENTE MVZ. Carlos Manuel Appendini Tazzer

VOCAL MVZ. Fernando Viniegra Rodríguez

SECRETARIO M.C. Arturo Trejo González

PRIMER SUPLENTE MVZ. Wilson F. Medina Barrera

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Luis Alejandro Vázquez López

AGRADECIMIENTOS:

A Dios y a la vida, por darme la oportunidad de existir hoy.

A mis padres, por lo que me han dado, ya que aún en la adversidad hemos salido adelante y no hemos caído, con cariño y respeto.

A mis hermanos Oli, Mary y Alex, por compartir momentos de su vida con la mía y seguir juntos.

A Laura, al estar presente en todo momento y en todo lugar, así como en mi corazón.

A la Fam. Hernández García, por sus consejos y amistad ofrecida, como a su ayuda personal.

Al Doc Arturo Trejo por su asesoría, paciencia y ayuda en la elaboración de este trabajo, así como a los sinodales del jurado por su atención y gentileza.

A los amigos y compañeros de escuela de la FES-C, que me brindaron de manera incondicional su amistad, consejos, buenos y malos momentos, experiencias y más.

A la Fam. García González, como a Ricardo por ofreceme su amistad desde hace muchos años y depositar en ocasiones en mis manos a sus pequeños.

A los seres que sirvieron de material biológico (chivos: Toluco, Copetes y al X), para la realización del trabajo que gozaron hasta el final.

Así como a los que sin querer hemos usado para la formación académica, como a los que hasta hoy, no pude salvar.

Como a las personas que ya no me acompañan y me brindaron oportunidades y ayuda, como alegrías.

Bueno en general, una serie de buenos deseos para todos ustedes que han creído en mí, de antemano, MIL GRACIAS.

A mis padres y hermanos por el apoyo y confianza brindada para la realización y culminación de mi carrera profesional.

Al M. en C. Arturo Angel Trejo González por el apoyo, paciencia y enseñanzas brindadas durante la realización de esta tesis.

Con todo cariño y respeto:

Sergio Reyes Maldonado

Este trabajo se realizo en el laboratorio de reproducción ,
bajo la dirección del MVZ M. en C. Arturo Angel Trejo
González a quien hacemos patente nuestro más profundo
agradecimiento.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVO.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	23
DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	28
LITERATURA CITADA.....	29

RESUMEN

El percoll, es un producto que se ha usado desde hace tiempo para la separación física de virus, como de células, entre ellos a los espermatozoides; esto de acuerdo a su densidad, por medio de la formación de gradientes a diversos porcentajes, como por la centrifugación aplicada a estos a diferentes velocidades moderadas. El objetivo del trabajo fue la evaluación de la motilidad espermática y la integridad del acrosoma en espermatozoides caprinos, separados en gradientes de percoll antes y después de congelar.

Se utilizaron 3 machos caprinos adultos de un peso corporal en promedio de 50 kg, así como el uso de dos cabras adultas de 35 kg de peso en promedio. Con ello, se obtuvieron eyaculados por medio de una vagina artificial, donde se recolectaron doce muestras, las cuales fueron sometidas a pruebas: volumen, motilidad progresiva, concentración y morfología espermática; así como la adición de gradientes de percoll, sujetas todas estas muestras a tres tratamientos antes y después de congelar.

Donde se observaron significancias en la motilidad progresiva al descongelar ($P < 0.05$), recuperación de la motilidad progresiva ($P < 0.05$), así como porcentaje de acrosomas normales fue mejor después de congelar como de la misma forma como en los acrosomas rotos ($P < 0.05$). De tal modo los acrosomas hinchados se mejoraron en el percoll, tanto antes como después de congelar. Por lo que, el uso de percoll nos indica en este trabajo, utilizarlo después del descongelamiento para obtener buenos resultados.

INTRODUCCION

En México, el ganado caprino fue introducido por los españoles después de la conquista (Máyen, 1989), con ello se establece una aceptación por los productos caprinos en gran parte del país, como son: Barbacoa, chito, birria, mixiote, cabrito al pastor, quesos y dulces (Arbiza, 1986; Jaramillo, 1997). Otro producto de gran demanda es la piel, la cual tiene una variedad de usos, principalmente en la industria peletera y del calzado (Castillo, 1988).

Sin embargo, la distribución de esta población no es homogénea y una buena parte de la misma (53.5%) se ubica en la zona norte del país, abarcando zonas áridas y semiáridas (Parada y Olguin, 1990), cuyo destino primordial es la producción de carne, estimándose en el año de 1995 en 37,677 toneladas. Los principales estados productores son: San Luis Potosí, Coahuila, Oaxaca, Puebla y Guerrero (Jaramillo, 1997).

Las ventajas que ofrece esta especie son de prestarse una atención especial, ya que ocupan un espacio muy reducido, son fáciles de manejar, requieren de una relativamente baja inversión (Devendra, 1986), se crían en sistemas tradicionales y modernos con aplicación de alguna tecnología, así también son sedentarios y móviles; ya sea en potreros cercados así como una mayoría en traspatio. Por lo regular los rebaños son pequeños, pastoreados en terreno irregular, con escasez de recursos tanto de vegetales como de agua (Arbiza, 1988).

Por lo que su alimentación casi es dependiente de la producción de la vegetación nativa (Parada y Olguin, 1990), además que requieren de una alimentación menor comparado con el ganado bovino, así mismo, la leche tiene la ventaja de ofrecer mayor digestibilidad, mayor valor nutricional entre otras muchas cualidades (Devendra, 1986).

Pero el mayor problema que enfrenta la caprinocultura es que no existe suficiente ganado caprino de buena calidad genética, por lo que es necesario de iniciar una explotación con pie de cría, utilizando la inseminación artificial para producir poco a poco un hato de cabras propio y dejar de ser la cabra, la vaca del pobre (Jaramillo, 1997).

La inseminación artificial es una técnica útil para lograr avances genéticos, facilitando la cruce heterocigótica entre razas aumentando el vigor híbrido y permite la absorción de cabras criollas con razas mejoradas (Evans y Maxwell, 1990; Trejo, 1991).

Las ventajas de la inseminación artificial en la producción animal, se ven incrementadas por la utilidad de la preservación del semen por largo tiempo; ya que la industria de la inseminación artificial esta limitada por un 40 a 50% de pérdida de espermatozoides fértiles después del proceso de criopreservación, porque hay una disminución de la motilidad de los espermatozoides y una morfología anormal del acrosoma (Bailey y Buhr,

1994), ya que son efectos que deterioran a las células normales que hacen que se reduzca la fertilidad (Bailey y Buhr, 1994; Valcárcel et al, 1996), por lo que, con la congelación y descongelación de los espermatozoides de algunas especies, la disminución del porcentaje de células móviles y daños a la estructura de la membrana, resultan en una vida media más corta de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino al ser introducidos en éste (Valcárcel et al, 1996).

Entre otras ventajas están el mejoramiento genético, control de enfermedades venéreas, disponibilidad de registros de apareamiento necesarios para un buen manejo del hato, servicios económicos y seguridad a través de la eliminación de machos peligrosos en el hato entre otros (Barba, 1990). Una desventaja es que requiere de personal especializado, ya que si el semen no se maneja con cuidado provoca una disminución en la fertilidad (Máyen, 1989).

Recolección del semen.

La recolección se puede hacer de dos maneras, por vagina artificial y por electroeyaculador. La vagina artificial es el mejor procedimiento para la recolección del semen (Barba, 1990), consta de un tubo rígido de aproximadamente 10 cm de largo, y de un tubo flexible que se coloca al interior del cuerpo y doblado sobre éste, donde se forma una cámara en el

que se introduce agua a una temperatura entre 40-44°C y teniendo ésta una presión ligera para simular los estímulos naturales de la vagina (Trejo, 1991).

Esta se une a un tubo colector por medio de un cono flexible, el tubo debe de estar a una temperatura entre 30-37°C y cubierto con material aislante, para conservar la temperatura y que sirva de protección contra golpes y de la radiación solar; obteniéndose semen de calidad similar al eyaculado en la vagina natural (Trejo, 1991). El problema de la vagina artificial es que depende de la libido del macho (Barba, 1990).

Evaluación del semen.

La evaluación permite que se procesen, utilicen y almacenen los eyaculados con alta probabilidad de fecundar (Trejo, 1991); la evaluación es tanto macroscópica (volumen, color, olor, viscosidad, pH, etc.) como microscópicamente (concentración de espermatozoides, morfología, normales, amorfos) así como la motilidad progresiva de este (Hafez, 1989). Siendo las siguientes las más usadas:

Volumen de eyaculado

Este se mide de un tubo graduado. Se puede considerar como 0.5 ml el volumen mínimo aceptable para utilizar un eyaculado para inseminación

artificial (Trejo, 1991). Sin embargo, durante éste y todos los procedimientos siguientes de la evaluación, el semen y los utensilios que están en contacto con él deben mantenerse a 37°C (Laing, 1988).

Color.

El color del eyaculado puede dar una idea aproximada de la concentración espermática, por lo que un eyaculado de buena calidad debe tener un color cremoso y/o lechoso, por lo que se deben desechar los eyaculados de color opalescente y acuoso, ya que tienen una baja concentración espermática (Trejo, 1991).

Motilidad espermática.

Las estimaciones de motilidad se realizan al microscopio con el semen diluido y en ocasiones no diluido (Laing, 1988), siendo el diluyente más utilizado el citrato de sodio al 2.9% (Trejo, 1991), ya que es un diluyente isotónico para valorar el movimiento individual de los espermatozoides (Laing, 1988).

Concentración espermática.

La concentración es muy importante, ya que es factor que tiene mayor influencia sobre el número de dosis que puede obtenerse de un eyaculado

(Trejo, 1991). De tal modo, existen diferentes formas para estimar la concentración, como es el hematocitómetro y el método de densidad óptica ó espectrofotómetro (Hafez, 1989).

Morfología espermática.

La evaluación intenta determinar si la muestra está fuera del intervalo normal para la especie, ya que algunos espermatozoides de cada eyaculado son morfológicamente anormales. Estas anomalías pueden ser primarias, secundarias y terciarias (Hafez, 1989).

Las primarias se deben a fallas de la espermatogénesis, localizadas en el testículo; en tanto las anomalías secundarias ocurren por el paso de los espermatozoides por el epidídimo, y las producidas durante la eyaculación como después de está, así como por el manejo se conocen como anomalías terciarias (Laing, 1988, Trejo, 1991).

La estimación de la morfología es importante, ya que el porcentaje de espermatozoides normales tiene alta correlación con la fertilidad (Trejo, 1991), por lo que las anomalías se relacionan con índices de fertilidad bajos, siendo en una proporción del 20% (Hafez, 1989). La observación se hace con los espermatozoides muertos, utilizando un buen fijador como es el caso de la solución de Hancock y tiñendo a estos con la tinción de Wells-Awa. Siendo de

suma importancia diferenciar las anomalías primarias y secundarias, ya que las anomalías primarias implican generalmente a la cabeza y/o pieza media del espermatozoide, teniendo una mínima frecuencia no mayor al 10%, para obtener una buena fertilidad.

Las anomalías secundarias por su parte, su frecuencia sumada a las primarias no debe rebasar el 25% (Trejo, 1991).

Sin embargo, dado que el semen es una suspensión de células activas, estas son sumamente sensibles a cambios ambientales, por lo que se debe proteger de los siguientes factores: Cambios bruscos de temperatura, radiación y agua (Trejo, 1991). Además de estas variables también pueden alterar la calidad del semen las siguientes: Edad del donante, frecuencia de eyaculaciones previas, enfermedades concurrentes y/o materiales extraños presentes en el semen (Laing, 1988), así como la raza, condición física, método de recolección, alimentación, época del año, siendo mayor en otoño e invierno y menor en el verano (Máyen, 1989, Trejo, 1991).

Por otra parte, toda técnica de preparación espermática no solamente debe separar espermatozoides buenos de espermatozoides viejos y muertos, sino que también debe remover leucocitos, células de línea germinal, masas de residuos citoplasmáticos y plasma seminal. Un método ideal de separación es el que permite los más grandes números y mayor funcionalidad de los

espermatozoides competentes (por ejemplo estos deben ser capaces de fertilizar al ovocito) al ser recolectados (Moohan y Lindsay, 1995).

Un número de técnicas para la manipulación del semen son generalmente útiles para los espermatozoides frescos, congelados y/o descongelados, esto para aumentar la calidad espermática antes de la aplicación de otras técnicas reproductivas (Valcàrcel et al, 1996).

Entre estas técnicas ó métodos para aumentar la calidad del semen y la separación de espermatozoides se citan las siguientes: Swin-up, Swin-down (Buzby et al., 1993, Valcàrcel et al,1996), gradientes de Percoll, filtración en fibra de vidrio, filtración en gel Sephadex, migración en hialuronato de sodio (Bielansky, et al., 1992; Buzby et al, 1993), centrifugación en Ficoll (Holt y Palomo, 1996,Valcàrcel et al, 1996), Spermprep, gradientes discontinuos de albúmina, gradientes de Nycodenz y filtración a través de membrana L4 (Buzby et al., 1993, Valcàrcel et al,1996). Sin embargo, estos procedimientos frecuentemente aumentan la calidad del semen a expensas del número de espermatozoides recobrados (Valcàrcel et al,1996). El procedimiento de la separación con Percoll, se descubrió en 1989 -1990, y este procedimiento fue transmitido a través de comunicaciones personales. Pero recientemente este procedimiento parece ir ganando popularidad en la fertilización bovina *in vitro* (Parrish et al, 1995).

La separación celular puede ser realizada por métodos físicos y utilizando equipo convencional, en base, al peso absoluto de cada estructura celular, es decir en base, a su respuesta a la fuerza de gravedad.

La sedimentación celular en un gradiente depende de su densidad, por lo que algunos medios con la misma osmolaridad de las células y que no sean tóxicos pueden ser utilizados para separar espermatozoides, entre estos se tienen albúmina de suero, dextran, ficoll, metrizamida y recientemente el percoll, ha sido utilizado con buenos resultados (Freshney, 1987).

El Percoll puede ser usado para la purificación de células, virus y organelos hasta un tamaño de 70 S aproximadamente. Este consiste de partículas de sílica coloidal, con un diámetro de 15 a 30 nm, las cuales son cubiertas con un revestimiento de polivinilpirrolidona.

El Percoll es considerado por ser completamente no tóxico para las células y ser esencialmente dependiente de la polivinilpirrolidona (Avery y Grevet, 1995), así como ajustarse al pH y a la eficiencia fisiológica iónica, por lo que es isosmótica. Así el percoll, selecciona espermatozoides de acuerdo a su densidad, que parece estar relacionada con su estado de maduración e integridad. El espermatozoide con buena morfología nuclear, son más densos, por lo que son seleccionados en la fracción de alta densidad del gradiente de percoll (Valcárcel *et al*, 1996). Los gradientes generados se forman por

centrifugación, a velocidades moderadas, además de ser estéril y reesterilizable (Moohan y Lindsay, 1995; Valcárcel *et al*, 1996).

La centrifugación con gradientes de densidad con Percoll, ha sido demostrada al ser más eficiente, manteniendo la motilidad y a los espermatozoides morfológicamente normales (Moohan y Lindsay, 1995), extraídos estos de semen congelado y/o fresco, según el caso, así mismo mejorar el semen de baja calidad, para incrementar la calidad, eficiencia y fertilización de los espermatozoides (Buzby *et al*, 1993, Zheng *et al*, 1992), pero también se recupera más esperma inmóvil, esto si la técnica se utiliza con baja cantidad de semen (Chan *et al*, 1994).

Los gradientes de densidad discontinuos para la separación de espermatozoides móviles e inmóviles, han sido adaptados extensamente para usarse para la fertilización *in vitro* en humanos, bovinos y otras especies (Hochi *et al*, 1994).

Los gradientes de Percoll típicos son de 55% a 90% (Avery y Grevet, 1995). Aunque también se usan desde 45% (Hochi *et al*, 1994; Parrish *et al*, 1995, Valcárcel *et al*, 1996, Van Soom y Kruif, 1994) y en ocasiones al 35% (Bailey y Buhr, 1994, Chan *et al*, 1994; Hochi *et al*, 1994).

Después de una centrifugación, la motilidad espermática es recobrada de la fracción inferior, mientras los espermatozoides muertos, el plasma seminal, el diluyente (por ejemplo yema de huevo) y el resto están situados en la fracción superior (Avery y Grevet, 1995). El porcentaje de espermatozoides-recobrado es alrededor del 50%, el cual es de 5 a 10 veces mayor que en el procedimiento Swin-up (Avery y Grevet, 1995, Parrish et al, 1995). La separación del semen en gradientes de Percoll, es simple de desarrollar y los resultados de motilidad son altos y las fracciones que se obtienen son limpias (Avery y Grevet, 1995).

Se conoce poco acerca de los efectos adversos del Percoll en vivo, pero teóricamente parece ser posible que las partículas de éste que invaden al espermatozoide preparado, pueden incitar una respuesta inflamatoria en el endometrio, trompas de Falopio ó cavidad peritoneal (Arora et al, 1994), aunque es probable de que el percoll induzca cambios semejantes a la capacitación, en la membrana plasmática del espermatozoide, por lo que su uso en los procesos reproductivos debe ser con precaución (Holt y Palomo, 1996; Valcárcel et al, 1996). Más sin embargo, sus efectos benéficos son mayores después de desarrollarse la selección de los espermatozoides por los gradientes de Percoll, ya que mejora el porcentaje de morfología normal, tasa de supervivencia, nivel de madurez nuclear, contenido adenosina-trifosfato y la capacidad de fertilización in vitro (Chan et al, 1994).

OBJETIVO.

El objetivo del siguiente trabajo es:

- 1.- Evaluar la motilidad espermática y la integridad del acrosoma en espermatozoides caprinos, separados en gradientes de percoll antes y después de congelar.

MATERIAL Y METODOS.

Localización:

Este trabajo se realizó en el módulo de ovinos y caprinos así como en el Laboratorio de Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, ubicada en el Km 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucán Estado de México, con la siguiente ubicación geográfica 19° 14' de latitud norte y 99° 14' de longitud poniente, cuenta con un clima templado subhúmedo con poca oscilación, su altitud es de 2450 msnm con temperatura media anual de 15.7°C y una precipitación pluvial media anual de 620.6 mm (García, 1981).

Animales:

Se utilizaron 3 machos caprinos adultos de la raza Alpina con un peso promedio de 50 Kg, que fueron seleccionados por su fertilidad probada en empadres anteriores y por que fueron entrenados para servir en la vagina artificial, destacándose por un adecuado volumen seminal. Se utilizaron como maniqués 2 cabras adultas con un peso promedio de 35 Kg, alojados en el módulo de ovinos y caprinos.

Diseño Experimental.

Entrenamiento pre-recolección de semen en los machos.

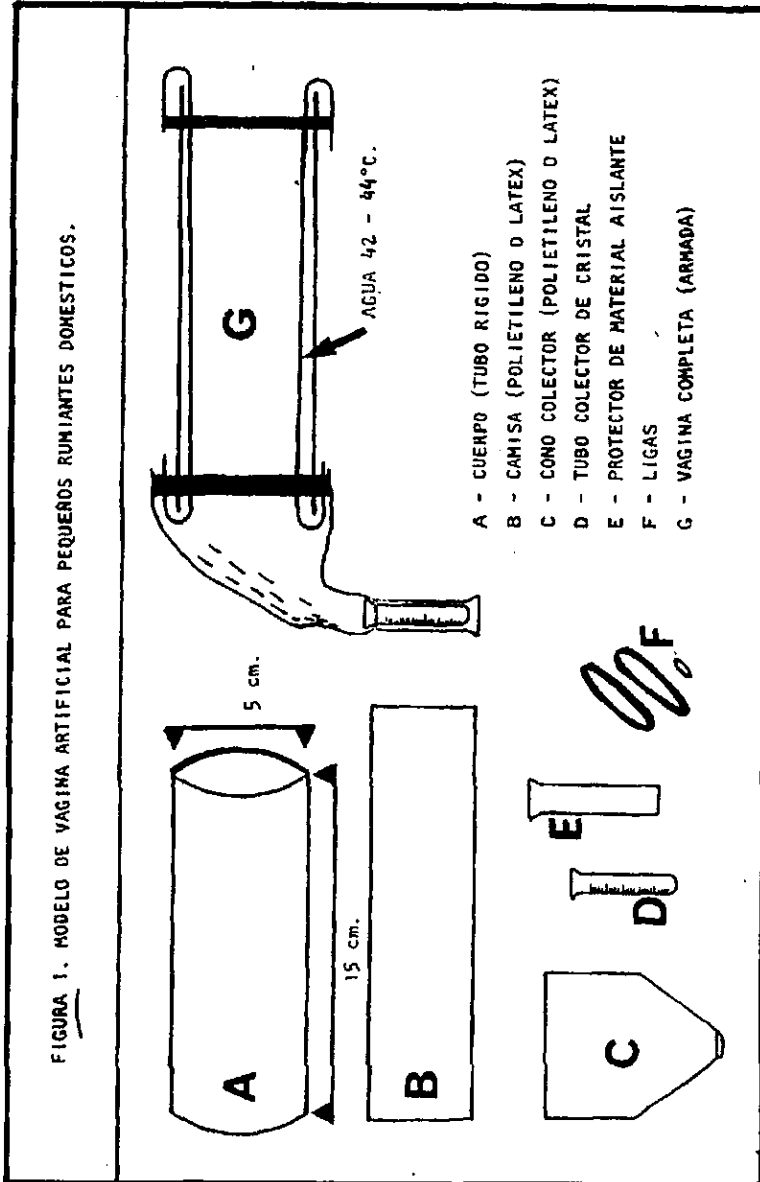
Para entrenar a los machos a servir en la vagina artificial, se reunieron con hembras inducidas hormonalmente al estro, en la sala de recolección y se les permitió realizar montas directas en presencia del personal para acostumbrarlos al manejo humano, una vez que soportaban la presencia humana, se procedió a acercarse para que eyacularan en la vagina artificial.

Inducción de celo a la hembra señuelo. Este proceso requirió de colocar una esponja preparada con progestágenos (45 mg de acetato de medroxiprogesterona) por vía intravaginal, retirando a los tres días después la esponja, e inyectando 1.5 mg de estrógenos (Ciclopentil propionato de estradiol), para que a las 24 horas posestro la cabra entrara en celo, para ser usada como estimulación del macho.

Recolección de semen.

La recolección se llevó a cabo cada tercer día durante un período de 15 días, obteniéndose 12 muestras útiles por medio del método de recolección de vagina artificial con una temperatura en promedio de 42°C del agua contenida en esta (figura 1).

Figura 1. Modelo de vagina artificial



Las pruebas inmediatas a las que fue sometido el semen durante este trabajo fueron las siguientes:

Volumen del eyaculado.

Este fue registrado inmediatamente a la eyaculación, tomado de la escala del tubo colector graduado y registrado en mililitros.

Motilidad progresiva.

Para determinar el porcentaje de espermatozoides que se desplazan en línea recta, Se realizó una dilución isotónica con 2.9 g. de citrato de sodio, que se depositó en una probeta graduada, aforando a 100 ml con agua destilada, para que esta fuera usada en cada muestra de semen.

En este experimento se tomó del eyaculado, una muestra de 0.1 ml de semen, y 9.9ml de la solución hecha de citrato, para obtener un volumen total de 10 ml, los cuales fueron introducidos en un tubo de ensayo, agitando suavemente, logrando la homogeneización del semen.

Estos tubos se mantuvieron a una temperatura de 37°C en baño María, para que no sufra alteración alguna y mantener a los espermatozoides viables.

Así el semen ya diluido en esta solución debe de colocarse en un portaobjetos tibio el cual previamente fue colocado en una platina térmica a 20°C, colocando en él 1 gota del semen diluido. Posteriormente esta muestra se procede a valorarla al microscopio en aumento de 10X ó 40X.

Para este trabajo, se requirió que para su proceso todas las muestras, tuvieran como mínimo una motilidad progresiva del 60%.

Concentración espermática.

Para efecto de este trabajo se utilizó el método de densidad óptica, el cual requirió de un espectrofotómetro previamente calibrado, el cual hay que precalentar durante 15 minutos, y posteriormente ajustar a cero. Acto seguido, se hace la selección de longitud de onda, que en este caso se usó a 600 nm según la técnica de calibración (Ibanguenitoia, 1982).

Se inserta el blanco de referencia (en este caso el blanco, es la dilución de citrato de sodio al 2.9%), ajustando a 100% de transmitancia óptica.

Posteriormente se insertó la muestra desconocida (la muestra referida es la que contiene el semen diluido) y se lee en transmitancia óptica. La muestra desconocida se toma del mismo tubo para hacer la evaluación de la motilidad progresiva, llenando la cubeta aproximadamente tres cuartas partes

de ésta e introduciéndola en el espectrofotómetro y haciendo la lectura correspondiente.

Morfología espermática.

Consistió en colocar semen diluido en tubos de Ependorf, los cuales contenían solución Hancock, agregando posteriormente solución Wells-Awa. Después se puso en un agitador para que se mezclen homogéneamente, y se dejaron reposar durante 15 días.

Pasado el tiempo, en una platina a temperatura de aproximadamente 25°C se tuvieron portaobjetos, a los cuales se les agregó una gota de estos tubos, previamente agitados, haciendo con ello un frotis para ser analizado posteriormente.

El análisis se hizo en un microscopio de contraste de fases con el objetivo 100X usando aceite de inmersión, también se utilizó un filtro para mejor visión de la morfología espermática. Se hizo un conteo total de 100 espermatozoides, de los cuales fueron sumándose en un contador de teclas, en los cuales se analizaron las anomalías primarias, secundarias, espermatozoides normales, hinchados, rotos y ausentes.

Gradientes de Percoll.

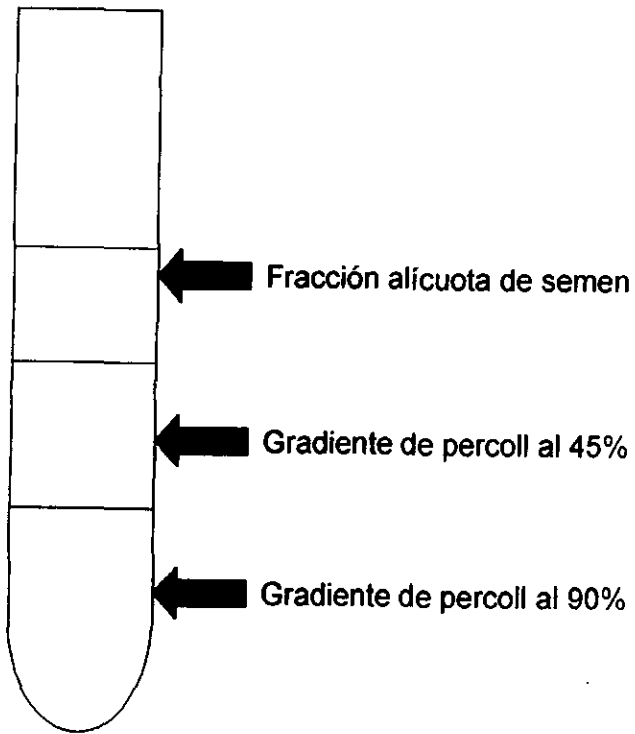
Estos se prepararon a partir de una dilución de percoll al 100%, elaborando 2 gradientes, uno al 90% y el otro al 45%, al cual se le adicionó solución PBS (Solución Buffer de Fosfatos) más Antibiótico y HEPES 1mM como regulador del pH, haciéndolos a un volumen de 40 ml. Se depositaron 1 ml de cada gradiente, a un tubo de ensaye estéril, colocando primero el de 90% y posteriormente el de 45%, para ser usados en el análisis correspondiente(figura 2).

Proceso del Semen.

A cada muestra de semen, se le hicieron las pruebas de volumen, motilidad progresiva, concentración espermática con espectrofotómetro, centrifugación de las muestras de semen con percoll a 2000 g x 20 mín., lavado de las muestras con 1 ml de PBS y la fracción correspondiente centrifugando a 2000 g x 10 mín., empajillado de las muestras agregando diluyente tris yema de huevo para su congelación en nitrógeno líquido, así como una tinción utilizando solución Hanckock y Well-Awa hechas tanto a las muestras normales como las de percoll. Las cuales fueron sometidas a 3 tratamientos:

- 1.- Eyaculado--congelación--descongelación y se agrega percoll.
- 2.- Eyaculado--congelación c/percoll parte superior--descongelación.
- 3.- Eyaculado--congelación c/percoll parte inferior--descongelación.

Figura 2. Gradientes de Percoll



Análisis Estadístico.

Este se llevó a cabo por medio de Análisis de varianza, de dos vías utilizando el programa estadístico SAS, con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}.$$

Donde: Y_{ij} es la variable de respuesta; μ es la media poblacional constante;
 T_i = Es el efecto del i -ésimo tratamiento ($i= 1,2,3,4$); E_{ij} es el error aleatorio asociado a cada observación.

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos, se muestran en los cuadros 1 y 2.

En el cuadro 1, se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza y se aprecia que los efectos significativos fueron la motilidad progresiva al descongelado ($P < 0.05$); Recuperación de la motilidad progresiva ($P < 0.05$); Acrosomas normales ($P < 0.01$); Acrosomas hinchados ($P < 0.01$); Acrosomas rotos ($P < 0.05$).

CUADRO 1. Cuadrados medios para las características espermáticas de semen caprino filtrado en gradientes de percoll antes y después de la congelación.

(Media \pm Error estándar)

Característica	Gl	Cuadrados medios del tratamiento	gl	Cuadrados medios del error
Motilidad progresiva al descongelado	3	103.02*	44	28.83
Recuperación de la motilidad progresiva	3	237.45*	44	67.35
Acrosomas normales	3	283.58**	44	67.79
Acrosomas hinchados	3	155.55**	44	29.34
Acrosomas rotos	3	125.38*	44	47.73
Acrosomas ausentes	3	0.076	44	1.33

*($P < 0.05$)

gl: Grados de libertad

**($P < 0.01$)

En el cuadro dos se anotan las medias mínimo cuadráticas para las características espermáticas de semen caprino filtrado en gradientes de Percoll antes y después de la congelación y se observa que la motilidad progresiva fue mejor antes y después de congelar en el sobrenadante del percoll; la recuperación de la motilidad progresiva siguió el mismo patrón, mientras que el porcentaje de acrosomas normales fue mejor siempre después de congelar.

Los acrosomas hinchados se mejoraron en el percol, tanto antes como después de congelar.

Los acrosomas rotos, se mejoraron tanto en el sobrenadante como en el sedimento del percoll después de congelar.

Los acrosomas ausentes, no se afectaron con los tratamientos de percoll.

CUADRO 2. Medias mínimo cuadráticas para las características espermáticas de semen caprino filtrado en gradientes de percoll antes y después de la congelación.

Característica seminal	Sobrenadante del Percoll antes de congelar.	Sedimento del Percoll antes de congelar.	Sobrenadante del Percoll después de congelar.	Sedimento del Percoll después de congelar
Motilidad progresiva al descongelado	6.25±1.55 ab	1.50±1.55 c	8.33±1.55 a	4.08±1.55 bc
Recuperación de la motilidad progresiva	9.24±2.36 a	2.40±2.36 b	12.9±2.36 a	6.64±2.36 ab
Acrosomas normales	72.91±2.37 b	69.58±2.37 b	79.33±2.37 a	79.33±2.37 a
Acrosomas hinchados	21.25±1.56 b	17.58±1.56 ab	13.91±1.56 a	13.58±1.56 a
Acrosomas rotos	4.66±1.99 a	11.91±1.99 a	6.00±1.99 b	6.08±1.99 b
Acrosomas ausentes	1.00±0.33 a	0.91±0.33 a	0.91±0.33 a	1.08±0.33 a

*Letras diferentes en los renglones, representan diferencias significativas (P<0.05).

DISCUSION.

En el presente trabajo, tanto la motilidad progresiva como su recuperación de esta, resultaron bastante bajas con respecto a lo publicado por otros autores (Buzby et al, 1993; Freshney, 1987; Moohan y Lindsay, 1995 Valcárcel *et al*, 1996; Zheng *et al*, 1992), esto pudo ser debido a diferentes causas entre las que destacan:

1.- El trabajo se realizó a temperatura de un laboratorio de campo situado en el módulo de producción caprina y durante los meses de octubre a diciembre que corresponden al final del otoño y principios del invierno con bajas temperaturas, que afectaron al material de cristalería y reactivos y el uso de un radiador eléctrico de calor no fue suficiente para contrarrestar este efecto ya que los cambios bruscos de temperatura nos afectan la sensibilidad del semen (Mayen, 1989; Trejo, 1991).

2.- La temperatura durante la centrifugación, tampoco pudo ser controlada de manera eficiente.

Una gran cantidad de espermatozoides, se mantuvieron por arriba de los gradientes de percoll, en un sobrenadante, lo que sugiere que la velocidad de centrifugación de 2000 g/20 minutos, aplicada en el presente trabajo, no fué suficiente para movilizar hacia abajo todo el paquete celular del eyaculado.

Ya que de acuerdo con las velocidades hechas por algunos autores (Avery y Grevet, 1995 y Moohan y Lindsay, 1995 y Valcárcel *et al*, 1996), en este trabajo no fue suficientes para llevar todos los espermatozoides viables a la fracción más densa (Valcárcel *et al*, 1996).

Los resultados obtenidos con el semen filtrado en percoll antes de congelar, son inferiores a los obtenidos cuando se filtró después de descongelar. La técnica de separación de espermatozoides en percoll, ha tenido mayor impacto en la técnica de fertilización in vitro que requiere espermatozoides de excelente calidad pero en cantidades relativamente bajas.

Sin embargo para ser aplicada con fines de inseminación artificial, resulta impráctico separar semen en condiciones de granja antes de inseminar cada cabra, por lo tanto es posible que la separación de espermatozoides con percoll en el semen fresco antes de congelar no tenga aplicaciones prácticas inmediatas, pero dado los bajos resultados de motilidad encontrados en este experimento, que sugieren que no fueron controladas adecuadamente las temperaturas, se recomienda repetir la experiencia en condiciones controladas de la temperatura del laboratorio o trabajando con semen previamente refrigerado bajo los protocolos ya establecidos para evitar en lo más posible el daño celular.

CONCLUSIONES.

El uso de percoll, en este trabajo, nos indica que es mejor realizarlo después del descongelado, en cuanto a la morfología espermática normal se refiere, ya que tanto la motilidad progresiva y su recuperación de esta, fue mejor antes y después de congelar. Así mismo, los acrosomas hinchados y rotos disminuyeron después del descongelado, por lo que se debe realizar el empleo de percoll después del descongelado para lograr los mejores resultados.

Además, bajo las condiciones del presente trabajo, la velocidad de centrifugación no fue suficiente para separar adecuadamente a los espermatozoides, por lo que en estudios posteriores se deben analizar las diferentes velocidades y tiempos que deben guardar la centrifugación para los gradientes de percoll, aplicados para su uso en semen caprino.

El manejo de percoll, requiere condiciones de laboratorio, por lo que su uso en la inseminación artificial con semen fresco antes de congelar, no tenga aplicaciones prácticas inmediatas a nivel de granja, pero dado los bajos resultados de motilidad encontrados en este experimento, que sugieren que no fueron controladas adecuadamente las temperaturas, se recomienda repetir la experiencia en condiciones controladas de temperatura de un laboratorio o trabajando con semen previamente refrigerado bajo los protocolos ya establecidos para evitar en lo más posible el daño celular.

LITERATURA CITADA.

- 1.-Arbiza A.S.I, *Producción caprina*. AGT Editor S.A. México. 1986.
- 2.-Arbiza A.S.I, *Sistemas de producción caprina en México*. Memorias del Congreso Interamericano de producción caprina. Universidad AAA Narro, Saltillo-México. 1988.
- 3.-Arora M, Carver-Ward J.A.C, Jaroudi K.A and Sieck.: Is Percoll safe for in vivo use? *Fertil Steril* 61:979-981 (1994).
- 4.-Avery B. and Grevet.: Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44:871-878 (1995).
- 5.-Bailey J.L and Buhr M.M: Cryopreservation alters the Ca²⁺ flux of bovine spermatozoa. *Can.J.Anim.Sci.* 74:45-51 (1994).
- 6.-Barba C.G.J: *Efecto de la yema de huevo de gallinas Rhode Island o Leghorn y del centrifugado sobre algunas características del semen caprino*. Tesis de licenciatura. FES-C. México. 1990.
- 7.-Bienlasky A, Dubuc C and Hare W.C.D.: Failure to remove bovine diarrhea virus (BVDV) from bull semen by Swin-up and other separatory sperm techniques associated with in vitro fertilization. *Reprod. Dom. Anim.* 27:303-306 (1992).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 8.-Buzby J.D, Ams M.J and pool K.C.: Evaluation of different sperm separation techniques for harvesting equine spermatozoa intended for in vitro culture. *J.Equine Vet. Sci.* 13:498-501 (1993).
- 9.-Castillo E.E, *Comportamiento de las importaciones de ganado caprino y sus principales productos durante el período 1980-1987.* IV Reunión Nacional sobre caprinocultura. Memoria UANL. México. 1988.
- 10.-Chan Y.M, Abuzeid M.I, Malcomnson J.H and Sasy M.: Selection of human spermatozoa by a hyperosmotic two-layer Percoll gradient. *Fertil. Steril* 61:1097-1102 (1994).
- 11.-Devendra C. *Producción de cabras y ovejas en los trópicos.* Ed.Manual Moderno. México. 1986.
- 12.-Evans G. and Maxwell M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras.* Ed.Acribia S.A. España. 1990.
- 13.-Freshney R. *Culture of animal cells.* Ed. Wiley-Liss. USA. 1987.
- 14.- García E. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen.* Instituto de Geografía. UNAM. 1981.
- 15.-Hafez E.S.E. *Reproducción e inseminación artificial en animales.* Ed.Interamericana McGraw-Hill. México. 1989.

16.-Hochi S, HoChoi Y., Korosue K and Oguri N.: Effets of individual stallions and mare breeds on assisted fertilization in vitro. *J. Equine Sci.* 5:77-81 (1994).

17.-Holt W.V and Palomo M.J: *Optimization of a continuous real time computerized semen analysis system for ram sperm motility assessment, and evaluation of four methods of semen preparation.* *Reprod. Fertil.Dev.* 8:219-230 (1996).

18.-Ibarguengoitia Tejada M. E. A. Técnica de calibración de un espectrofotómetro, para determinar la concentración espermática en semen de camero. Tesis de licenciatura. FES-C. México. 1982.

19.-Jaramillo Villalobos V. Producción de leche de cabra: Una alternativa rentable. *México Ganadero.* 424:16-23(1997).

20.-Laing J.A. Fertilidad e infertilidad en la práctica veterinaria.Ed. Interamericana McGraw-Hill. España. 1988.

21.-Máyen Mena J. Explotación caprina. Ed.Trillas. México. 1989.

22.-Moohan J.M. and Lindsay K.S.: Spermatozoa selected by a discontinuous Percoll density gradients exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct Swin-up. *Fertil Steril* 64: 160-165 (1995).

23.-Parada C.L.A y Olguin C.M.A. Efecto de la suplementación con Mezquite(Prosopis juliflora) en caprinos, consumiendo dietas en base a heno de avena. Tesis de licenciatura. FES-C. México. 1990.

24.-Parrish J.L, Krogenaes A. and Parrish L.S.: Effect of bovine sperm separation by either Swin-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryo C development. Theriogenology 44:859-869 (1995).

25.-Trejo G.A. Inseminación artificial y control del ciclo estral en caprinos. *Simposium de reproducción y genética en caprinos productores de leche*. Memorias FES-C. México. 1991.

26.-Valcárcel A., Moses D.F, Perez L.J and Baldassarre H.: Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. Anim. Reprod.Sci. 41:215-224 (1996).

27.- Van Soom A. and Kruif A.:Salvage of oocytes from sterile genetically valuable cows, resulting in the birth of a calf. Anim. Reprod. Sci. 36:187-196 (1994).

28.-Zheng Y.S, Fiser P. and Sirad M.A.: The use of ejaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro. Theriogenology 38:1065-1075 (1992).