



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**METODOS DE SEPARACION DE ESPERMATOZOIDES PARA MEJORAR LA  
CALIDAD SEMINAL.  
(REVISION BIBLIOGRAFICA)**

**T E S I S**  
**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**  
**P R E S E N T A:**

**PEDRO HERNANDEZ RAMIREZ**

**ASESOR: M. en C. ARTURO ANGEL TREJO GONZÁLEZ**



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005.

m344921



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 CUAUTITLÁN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL  
 AVENIDA DE  
 MEXICO

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



DEPARTAMENTO DE  
 EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
 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 comunicarle a usted que revisamos la TESIS:

Métodos de separación de espermatozoides para mejorar la calidad seminal.  
 (Revisión bibliográfica)

que presenta el pasante Pedro Hernández Ramírez  
 con número de cuenta: 9660783-7 para obtener el título de  
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Febrero de 2005

- |                  |   |  |
|------------------|---|--|
| PRESIDENTE       | <u>Dr. Armando Enrique Esperón Sumano</u> |  |
| VOCAL            | <u>M.C. Arturo Angel Trejo González</u>   |  |
| SECRETARIO       | <u>MVZ. Ma de la Luz Montero Villeda</u>  |  |
| PRIMER SUPLENTE  | <u>MVZ. Beatriz Rosas Gutiérrez</u>       |  |
| SEGUNDO SUPLENTE | <u>MVZ. Sergio Waido Tello</u>            |  |

## DEDICATORIAS

### **A MIS PADRES:**

Maria Ramírez Reyes y Gregorio Hernández García, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por el amor de padres y por haberme dado la vida siendo la herencia mas valiosa que me han dado.

### **A NORMA:**

Mi esposa, por su gran apoyo, cariño y amor que me brindo en el proceso de este trabajo y que siempre estuvo conmigo.

### **A MI HIJO:**

Al que aun no lo tengo en mis brazos pero que desde el vientre de su mamá me motivo para terminar este trabajo el cual es parte de la trayectoria de mi vida.

### **A MIS HERMANOS:**

Jesús, Guillermo, Florentino, Maria, Gabriel., Que de una u otra forma ayudaron a la realización de este trabajo y por su apoyo.

### **A MIS SOBRINOS:**

Para que en un futuro ellos también tengan el deseo de realizar una profesión y que este trabajo sea un motivo para ellos.

### **A LA FAMILIA GUTIÉRREZ MENDOZA:**

La cual también me brindo su apoyo y motivación para terminar este trabajo.

**GRACIAS A TODA MI FAMILIA POR APOYARME PARA CULMINAR CON MI FORMACIÓN PROFESIONAL PORQUE ESTE TRABAJO TAMBIÉN ES SUYO.**

## AGRADECIMIENTOS

A mi asesor M. en C. Arturo Ángel Trejo González por haberme brindado su gran apoyo, ayuda y paciencia en la realización de este trabajo.

A su esposa M.V.Z Yolanda Pérez Russ por su apoyo y motivación.

A mi jurado por brindarme su apoyo y ayuda en la culminación de este trabajo.

A Pedro Maya de reproducción por su ayuda y motivación.

A la F. E. S - Cuautitlán UNAM y Académicos por ser parte de mi formación profesional.

A mis amigos y compañeros por su motivación, en especial a mis amigos Hugo Fausto y Koral Peña por su apoyo y ayuda les agradezco en donde quiera que se encuentren.

Al personal administrativo ya que ellos juegan un papel importante en la terminación del trabajo.

## INDICE

I.-RESUMEN	1
II.- INTRODUCCIÓN	2
III.- OBJETIVO	5
A. - SEPARACIÓN EN MOCO CERVICA	6
B.- PERLAS DE VIDRIO	7
C.- FIBRA DE VIDRIO	8
D.- FILTRACIÓN EN SEPHADEX	14
E.- GRADIENTES DE PERCOLL	17
F.- <i>SWIM-UP</i>	20
G.- OTROS MÉTODOS DE FILTRARACIÓN	22
H.- RESULTADOS OBTENIDOS EN SEPARACIÓN DE ESPERMATOZOIDES	23
H.1.- AVANCE EN MOCO CERVICAL BOVINO	23
H.2.- FILTRACIÓN EN FIBRA DE VIDRIO DE BORO SILICATO	24
H.3.- FILTRACIÓN DE SEMEN EN <i>SEPHADEX</i>	27
H.4.- SEPARACIÓN ATRAVES DE GRADIENTES DE PERCOLL	29
H.5.- SEPARACIÓN ESPERMÁTICA POR <i>SWIM-UP</i>	31
IV.- COROLARIO	36
V.-LITERATURA CONSULTADA	37
OTRAS FUENTES	44

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Motilidad progresiva de los espermatozoides caprinos mantenidos durante 2 y 24 horas a 5°C.	23
Cuadro 2. Efecto de la filtración del semen caprino sobre la motilidad progresiva, las anomalías secundarias y la concentración espermática.	24
Cuadro 3. Porcentaje de motilidad progresiva en base a los factores momento de conservación, diluyente y filtro (Media $\pm$ Error estándar).	25
Cuadro 4. Porcentaje de motilidad progresiva en semen de carnero en base al diluyente y al filtro (Media $\pm$ Error estándar).	25
Cuadro 5. Efecto de la inseminación con semen filtrado a través de Borosilicato sobre la fertilidad de un rebaño de ovejas Criollas.	26
Cuadro 6. Motilidad progresiva, recuperación de la motilidad progresiva y acrosomas normales de los espermatozoides, después de la congelación de semen caprino filtrado en fibra de vidrio y <i>Sephadex</i> (Medias $\pm$ Error estándar).	27
Cuadro 7. Medias mínimo cuadráticas para las características espermáticas de semen caprino filtrado en gradientes de Percoll antes y después de la congelación.	30
Cuadro 8. Efecto del <i>Swim-up</i> y la congelación sobre las características seminales de cabritos jóvenes (Medias mínimo cuadráticas).	32

## INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1: Filtro de Fibra de vidrio de Borosilicato	12
Fig. 2: Espermatozoide anormal capturado por una Fibra de vidrio de Borosilicato	13
Fig. 3: Filtro de <i>Sephadex</i>	16
Fig. 4: Tubo para Gradientes de Percoll	19
Fig. 5: Tubo para <i>Swim-up</i>	21



## RESUMEN:

En el presente trabajo se realizó una revisión de diversas técnicas de separación de espermatozoides para mejorar la calidad seminal, se analizaron las técnicas de separación en moco cervical, la separación con perlas de vidrio, los filtros de fibra de borosilicato, la separación por filtros de *sephadex*, el uso de gradientes de percoll, la técnica de *swim up*.

Hasta los conocimientos actuales del estado que guarda la investigación en filtración de semen de caprinos, apoyado por alguna evidencia en ovinos, se puede inferir que las mejores opciones son las columnas de *sephadex*, de fibra de vidrio de borosilicato y los gradientes de percoll, respectivamente ya que permiten tener mejor recuperación de motilidad después de la congelación y mejor porcentaje de acrosomas normales, aunque se disminuya la concentración espermática. El *swim-up* aunque mejora la calidad espermática, reduce el número de espermatozoides recuperados y tiene el inconveniente de la incubación en CO<sub>2</sub> a 37°C, lo cual retrasa el uso del semen. Así utilizando estos métodos puede mejorarse la calidad del semen destinado a la inseminación artificial de cabras.

De cada técnica, se describe su uso, resultados obtenidos y las perspectivas de su uso futuro.

## II.- INTRODUCCION.

En el estro natural la mucosa cervical ayuda a seleccionar a los espermatozoides móviles y actúa como una barrera contra los no móviles. Esta selección cervical es desviada en la inseminación artificial (Anzar y Graham, 1993 a y b; Hawk *et al.*, 1981).

El desarrollo de las biotecnologías reproductivas tales como la fertilización *in vitro*, la transferencia de embriones, el sexado de embriones, la clonación y otras han demandado el uso de espermatozoides con mayor capacidad fertilizante, por lo que se han utilizado técnicas de separación de gametos masculinos de mejor calidad (Massip, 1981).

Mejorar la calidad de los gametos en fresco o después de descongelarlos, es una prioridad tanto si el fin es la inseminación artificial como si se pretende realizar la fertilización *in vitro* siendo ambas técnicas herramientas reproductivas para el mejoramiento genético (Evans y Maxwell, 1987; Sandoval y Trejo, 1994).

La separación física de espermatozoides móviles y no móviles, utiliza diversos métodos, los más utilizados han sido: La migración a través del moco cervical (Trejo *et al.*, 1986; Hafez, 1993), perlas de vidrio, fibra de vidrio borosilicato (Medrano *et al.*, 1994), Sefadex y Sefadex con intercambiadores de iones utilizados como filtros (Bangham y Hancock, 1955; Acevedo, 1995; Samper, 1992; Anzar y Graham, 1993 a y b; Graham y Graham, 1990), gradientes de percoll (Trejo *et al.*, 1986; Hafez, 1993), Swim-up (Suttiyotin y Thwaites, 1993; Coscioni, *et al.*, 2001). Inicialmente, la técnica de filtración se reportó como un método para separar espermatozoides vivos y muertos (Bangham y Hancock, 1955; Maki-Laurila y Graham, 1968). Por lo general la separación resulta exitosa, fraccionando el semen en una porción de espermatozoides móviles que pasan a través del filtro y otra de espermatozoides inmóviles y/o muertos que son retenidos, independientemente del filtro utilizado.

Los filtros actúan al menos de tres maneras físicas para mejorar la calidad seminal:

1.- Retienen los espermatozoides muertos, eliminando así posibles toxinas derivadas de la descomposición celular en el medio.

2.- Retienen la mayoría de los espermatozoides inmóviles, permitiendo el paso de espermatozoides móviles, de esta manera se reduce la cantidad de espermatozoides disponibles, pero se aumenta el porcentaje de espermatozoides con capacidad fertilizante.

3.- Los filtros retienen algunos espermatozoides anormales, especialmente con anomalías acrosómicas, lo cual aumenta el porcentaje de espermatozoides normales.

Se ha sugerido practicar la separación de espermatozoides para seleccionar una población de espermatozoides más aptos para la fertilización, para concentrarlos, para reducir la viscosidad, remover leucocitos, células de línea germinal, masas de residuos citoplasmáticos, plasma seminal y para remover partículas extrañas o espermatozoides aglutinados (Paulson y Polakoski, 1977; Marmor *et al.*, 1980; Lechtzin *et al.*, 1991; Vyas *et al.*, 1991; Moohan y Lindsay, 1995). La finalidad principal de la separación espermática es tratar de aumentar su resistencia al proceso de congelación-descongelación, además se ha utilizado también en el semen descongelado (Salamon, 1987; Lechtzin, *et al.* 1991). La mayoría de los reportes de filtración y congelación de semen, señalan que el semen separado soporta mejor la criopreservación y subsecuente descongelación que el no filtrado (Chandrasahana *et al.*, 1986), sin embargo, esta resistencia sólo se ha medido en base a la motilidad pre y pos congelación, y son pocas las pruebas de fertilidad realizadas con espermatozoides separados. Por otro lado, Shalgi *et al.*, (1981), señalan que aunque los espermatozoides filtrados mostraron buena morfología y motilidad, su capacidad funcional se afectó negativamente, no siendo capaces de penetrar ovocitos *in vitro*. Asimismo, Fukui *et al.*, (1983), observaron que el efecto de la filtración sobre la fertilización no fue

significativo, y que la tasa de fertilización obtenida fue la más baja de ese trabajo en que se comparó semen filtrado y no filtrado.

El método ideal de separación de espermatozoides, sería el que permite los más grandes números y mayor funcionalidad de los espermatozoides competentes, es decir capaces de fertilizar al ovocito al ser recolectados (Moohan y Lindsay, 1995).

### **III.-OBJETIVO.**

Con la finalidad de realizar un manual de procedimientos para los usuarios de cualquier nivel en el Laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se realizó el presente estudio de revisión sobre la separación de espermatozoides para mejorar la calidad seminal.

## REVISIÓN DE LA LITERATURA

### A.- SEPARACION EN MOCO CERVICAL.

Se conoce que durante el estro natural, la mucosa cervical en conjunto con el moco cervical ayuda a seleccionar a los espermatozoides móviles (Hawk *et al.*, 1977).

Se han propuesto métodos de laboratorio basados en la migración de espermatozoides a través del moco cervical, aprovechando la afinidad biológica que tienen los espermatozoides para viajar por ese medio (Langford, *et al.*, 1984).

La técnica consiste en llenar tubos capilares con moco cervical principalmente de bovino ya que se consigue en abundancia, los espermatozoides suben contra la gravedad de la tierra y se almacenan en la parte superior del tubo capilar. Los espermatozoides que lograron llegar ahí, tienen la mejor motilidad.

## **B.- PERLAS DE VIDRIO.**

Los primeros filtros utilizados fueron las perlas de vidrio, de varios diámetros, y la fibra de vidrio borosilicato. Salamon, (1987), reporta que con el uso de los filtros anteriores, la separación de los espermatozoides móviles e inmóviles fue incompleta o errática.

Las perlas de vidrio se han usado principalmente para la filtración de semen de roedores (McGrath *et al.*, 1977; Shalgi *et al.*, 1981; Lechtzin *et al.*, 1990), aunque se utilizaron anteriormente en semen de toro (Bangham y Hancock, 1955), y recientemente en semen de hombre (Lechtzin *et al.*, 1991).

El diámetro de la perla que se ha utilizado, varía de 75 a 200 micrómetros. Se ha reportado que la filtración a través de las perlas pequeñas proporciona mayor concentración de espermatozoides móviles que a través de las perlas grandes (Lechtzin *et al.*, 1991). Para sostener la columna de perlas de vidrio se coloca debajo de ella una perla de mayor tamaño, 5 mm, y en ocasiones, se coloca encima de la columna una capa delgada de perlas de 3 mm de diámetro, para evitar que al fluir el semen se rompa la uniformidad de la columna (Bangham y Hancock, 1955). La altura de la columna, cuando se reporta, varía de 0.5 a 3.0 cm. En otros casos se reporta el peso de la columna. McGrath *et al.*, (1977), señala 1.5 gramos para perlas de 200 micrómetros.

La filtración a través de perlas de vidrio, es un procedimiento rápido y sencillo que tiene estas ventajas sobre los métodos estándar comúnmente usados para concentrar espermatozoides móviles (Lechtzin *et al.*, 1991).

### C.- FIBRA DE VIDRIO.

La fibra de vidrio utilizada son filamentos de borosilicato con un diámetro aproximado de 0.008 mm que puede utilizarse en combinación con acetato de celulosa o nylon para obtener mayor rapidez en el paso de los fluidos a través del filtro (Cole-Parmer, 2000).

Para el procesamiento del semen desde hace varios años se ha empleado la filtración con fibra de vidrio, para separar los espermatozoides móviles de los no móviles, además se ha buscado separar los normales de los anormales así como de acrosomas intactos de los dañados (Maki-Laurila y Graham, 1968; Paulson y Polaskoski, 1977; Landa *et al.*, 1980; Lodhi y Crabo, 1984, Bangham y Hancock, 1955, Vyas *et al.*, 1991).

El primer reporte disponible, del uso de la fibra de vidrio como filtro, la realizaron Mki-Laurila y Graham, en 1968, con semen de toro, desde entonces se ha basado, la investigación generalmente en bovinos.

Paulson y Polakoski en 1977 y Paulson *et al.*, 1979, realizaron las primeras filtraciones en fibra de vidrio con semen humano, con el objetivo de resolver la infertilidad atribuible a la alta viscosidad del semen y bajo número de espermatozoides móviles en el eyaculado, tanto en semen fresco como en el descongelado.

La fibra de vidrio es el filtro más utilizado en trabajos de filtración de semen de varias especies y se ha preferido su uso sobre otros filtros debido a la facilidad del manejo y su menor costo (Krishnamurthi *et al.*, 1983; Chandrahasan *et al.*, 1986; Vyas *et al.*, 1991).

Salamon en 1987, reporta que el uso de los filtros para la separación de los espermatozoides móviles e inmóviles es incompleta ya que las variaciones se explican por la gran cantidad de factores que intervienen en la filtración.



La filtración de semen de humano a través de fibra de vidrio se ha utilizado para remover restos celulares y otras partículas de desecho y se ha observado que mejora la motilidad en eyaculados de humanos fértiles como de infértiles (Koukoulis, *et al.*, 1989; Marmor, *et al.*, 1980; Paulson y Polakoski, 1977; Paulson, *et al.*, 1979).

El semen de caprino también se ha filtrado en fibra de vidrio obteniendo una importante reducción en el porcentaje de anomalías, tanto primarias como secundarias (Trejo *et al.*, 1986), aunque en pequeños rumiantes son muy escasos los reportes. Sin embargo Medrano en 1993, observó que la filtración del semen de ovino en fibra de vidrio no ocasiona cambios favorables en la motilidad progresiva en ningún momento de la conservación.

En otros experimentos realizados por Marmor, *et al.*, 1980, observaron que la motilidad progresiva en semen de humano después de la filtración en fibra de vidrio presenta una mejoría, con una variación de 18 a 48%, los factores que determinan la variación es el medio en que se embebe el filtro y la posterior incubación de la muestra.

Otros investigadores mencionan que la concentración espermática tiende a variar debido al tipo de filtros a utilizar, recuperándose de un 37 a 98% de la concentración inicial en fibra de vidrio (Marmor *et al.*, 1980; Trejo *et al.*, 1986).

El tiempo que se ha reportado en el proceso de filtración varía de 2 a 3 minutos en semen de toro (Chandrasahana, *et al.*, 1986), mientras que en semen de humano es de 5 a 15 minutos (Marmor, *et al.*, 1980; Paulson y Polakoski, 1977).

Otra variable es la temperatura en la cual se lleva a cabo la filtración (Vyas, *et al.*, 1991; Lechtzin, *et al.*, 1991). Algunos investigadores la han realizado a 37° C., a 22°C. (Fayemi, *et al.*, 1979), e incluso Graham y Graham en 1990, reportan la filtración a 5°C proceso del equilibrio del semen, aunque es poco utilizable.

La filtración se ha realizado por gravedad, colocando los filtros en posición vertical y permitiendo el paso fluido de la muestra (Marmor *et al.*, 1980; Krishnamurthi *et al.*, 1983; Medrano 1993; Acevedo,1995; Trejo *et al.*, 1986).

Los espermatozoides móviles se orientan hacia abajo debido a la fuerza de gravedad, mientras que los muertos y dañados flotan, debido a que tienden a perder su poder de orientación (Chandrasahana, *et al.*, 1986), sin embargo Maki- Laurila y Graham, 1968, utilizaron presión negativa para la filtración de semen de ovino en fibra de vidrio.

El volumen a filtrar es variable, así tenemos que el semen de ratón, el volumen a filtrar fue de de 1.0 a 2.0 ml. (McGrath, *et al.*, 1977; Mientras de que Shalgi, *et al.*, 1981, utilizaron 1.5 a 1.8 ml.

Medrano en 1993, realizó otro experimento con semen ovino, diluido en proporción 1:4 utilizando un volumen de 1.0 ml. En filtro de fibra de vidrio.

El semen fresco o diluido es el más ampliamente utilizado en los trabajos de filtración, independientemente del filtro usado (Lodhi y Crabo 1984; Trejo *et al.*, 1986; Medrano, 1993; Paulson y Polakoski, 1977).

Otros investigadores han preferido filtrar el semen descongelado y de esta manera evaluar su recuperación (Paulson, *et al.*, 1979; Fukui, *et al.*, 1983; Lechtzin, *et al* 1991; Salamon, 1987; Medrano, 1993).

El peso del filtro parece ser la variable más importante cuando se utiliza fibra de vidrio. Moohan, *et al.*, 1994, Paulson y Polakoski, 1977, recomendaron utilizar de 20 a 60 miligramos en los filtros.

Otros reportes obtenidos manejan de 20 a 100 miligramos, con buenos resultados (Koukoulis, *et al.*, 1989; Vyas, *et al.*, 1991).

La altura de las columnas que forman el filtro varia de 2 a 6 cm. (Lodhi y Cramo, 1984; Chandrahasan, *et al.*, 1986). Fukui, *et al.*, en 1983, utilizaron fibra de vidrio de 10 a 12 micras. (Figuras 1 y 2).

Se ha mencionado que el procedimiento de filtración no perjudica la estructura espermática ni los procesos subsecuentes de capacitación acrosómica, fijación a la zona pelúcida y fertilización (Lechtzin, *et al.*, 1991). Por lo que la filtración del semen puede ser utilizada como un procedimiento de rutina en bancos de semen para mejorar la calidad de eyaculados pobres (Vyas, *et al.*, 1991; Chauhan, *et al.*, 1993).

El tiempo que dura la filtración varia de acuerdo a las especies donadoras del semen, al tipo de filtro y a la fluidez de la muestra de semen completo o diluido.

El manejo del filtro antes de ser utilizado esta encaminado a favorecer el paso de los espermatozoides evitando que presenten cambios bruscos de temperatura y contaminación. El filtro de fibra de vidrio puede ser lavado con alcohol y agua destilada o ser esterilizado a 180°C. por 30 minutos (Marmor, *et al.*, 1980; Chandrahasan, *et al.*, 1986), Mientras que Koukoulis, *et al.*, 1989, recomiendan lavar con solución salina.

Marmor *et al.*, (1980), encontraron que la fibra de vidrio no selecciona *a priori* las formas más aptas para la fecundación. Sin embargo, tales variaciones en los resultados se explican por la gran cantidad de factores que intervienen en la filtración. no obstante, la fibra de vidrio es un filtro muy utilizado y actualmente sigue en uso (Krishnamurthi *et al.*, 1983; Chandrahasan *et al.*, 1986; Vyas *et al.*, 1991, Medrano, 1993).

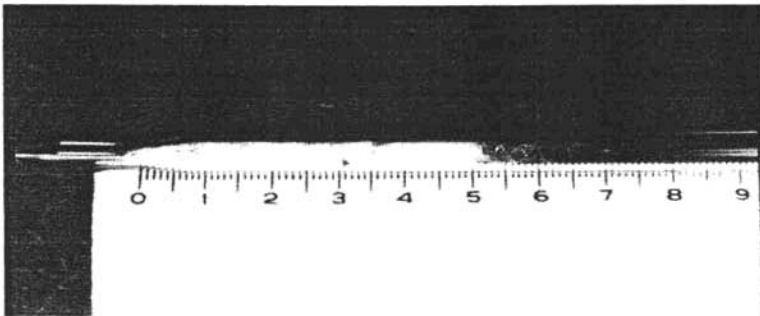


Fig. 1:Filtro de fibra de vidrio de borosilicato.

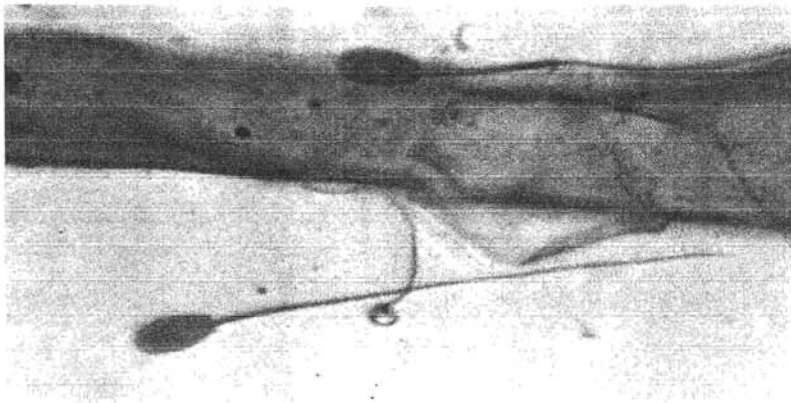


Fig. 2:Espermatozoide anormal  
capturado por una fibra de  
vidrio de borosilicato.

#### D.- FILTRACION EN *SEPHADEX*.

El *sephadex* es un carbohidrato especialmente tratado (dextrina de almidón) que al activarse forma un gel compuesto por pequeñas esferas porosas con diversos diámetros, y es utilizado para separar espermatozoides en cuanto a motilidad, morfología acrosómica e incluso aunque en porcentajes bajos por cromosoma sexual (Fayemi *et al.*, 1979; Guerrero, 1981).

Existe la hipótesis de que la retención en el filtro de espermatozoides muertos o dañados, se realiza por una interacción entre la superficie espermática y el filtro, entre proteínas de la membrana y los carbohidratos del filtro (Lodhi y Crabo, 1984). Se ha reportado que en ovinos una proteína llamada clusterina, presente en la membrana espermática, que al existir algún daño en dicha membrana se expone la enzima fijándose firmemente al *sephadex* (Samper y Crabo, 1988).

Comparando un filtro de fibra de vidrio-*sephadex*, algodón-*sephadex*, y otro filtro de fibra de vidrio, Samper *et al.* (1988), observaron que los filtros con *sephadex* retienen más espermatozoides debido al efecto del diluyente utilizado, tiempo de filtración y concentración de la muestra sobre la cubierta proteica del espermatozoide y las moléculas expuestas a la membrana.

El porcentaje de motilidad progresiva y el de acrosomas normales obtenidos después de la filtración a través de *sephadex*, por lo general es superior al observado antes de filtrar (Graham y Graham, 1990; Vyas *et al.*, 1991). La correlación entre el porcentaje de espermatozoides que pasan el filtro, y la motilidad progresiva o acrosomas intactos es en promedio 0.6 para semen de bovino (Landa *et al.*, 1980).

Salamon (1987), señala que en pruebas de fertilidad con semen descongelado de toro y verraco, los resultados de la filtración con *sephadex* estuvieron bien correlacionados con la fertilidad.

El tipo de *sephadex* más usado para filtrar semen es el G-15, aunque también se ha utilizado el G-10 y G-50 que son menos eficientes (Landa *et al.*, 1980; Graham y Graham, 1990; Vyas *et al.*, 1991), y el diámetro de la esfera varía de 40 a 120 micrómetros. El peso y la altura del filtro que se han reportado son de 3 gramos por filtro, y de 6 a 10 milímetros, respectivamente. (Graham y Graham, 1990; Lodhi y Crabo, 1984; Vyas *et al.*, 1991). Obsérvese Figura 3.



Fig. 3:Filtro de *Sephadex*



## E .- GRADIENTES DE PERCOLL

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 *in vitro* en la mayoría de las especies (Trejo,1991).

El Percoll puede ser usado para la purificación de células, virus y organelos.

El Percoll consiste de partículas de sílica coloidal, con un diámetro de 15 a 30 nm, las cuales son cubiertas con un revestimiento de polivinilpirrolidona que minimiza la interacción con el material biológico. El Percoll tiene como ventaja ser completamente no tóxico para las células además de ser esencialmente dependiente de la polivinilpirrolidona (Sharpe, 1988; Avery y Grevet 1995).

La eficiencia de la centrifugación con gradientes de densidad con Percoll, ha sido demostrada al obtenerse buenos porcentajes de motilidad y 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).

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 observada y recuperada 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 esperma recuperado 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). Figura 4.

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), mas 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).



Fig. 4: Tubo para gradientes de Percoll

## **F.- SWIM-UP.**

El *swim-up* o (nado ascendente) de los espermatozoides, es una técnica que aprovecha una cualidad espermática basada en un geotropismo negativo, que induce a los espermatozoides móviles a nadar contra la gravedad del globo terrestre. Figura 5.(Trejo *et al.*, 2004)

Para la separación de los espermatozoides viables la técnica se basa en una centrifugación del eyaculado en un medio HTF (Human Tubal Fluid) modificado, seguido de una incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono, seguido de un ascenso de los espermatozoides viables y su posterior recuperación en el medio sobrenadante . (Trejo *et al.*, 2004).

Un procedimiento estandarizado consiste en centrifugar a 3500 rpm los espermatozoides inmersos en un medio líquido de tal forma que aquellos que presenten anomalías se sedimenten y los sanos floten y a partir de este sobrenadante realizar pruebas directas e indirectas que permitan conocer la calidad del semen y posterior a ello elaborar pajillas, mejorando así la tasa de fertilidad para una inseminación futura. Los espermatozoides recolectados del sobrenadante, no solamente presentan mejor calidad, física sino que mejoran en cuanto a la integridad del DNA. ([www.cegyr.com/cpac.html.../science?\\_ob=ArticleURL&\\_aset=A-WA-A-VY-MsSDUW-UUA-AUBVVVYZCZ-VECEYYI0/10/02](http://www.cegyr.com/cpac.html.../science?_ob=ArticleURL&_aset=A-WA-A-VY-MsSDUW-UUA-AUBVVVYZCZ-VECEYYI0/10/02)).

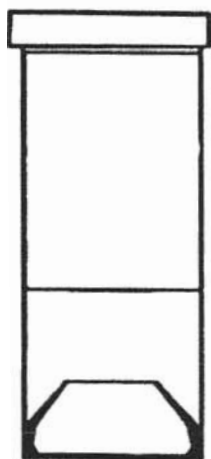


Fig. 5: Tubo para *Swim-up*

## **G .- OTROS METODOS DE FILTRACION.**

Otros filtros menos utilizados son: poliacrilamina, gel de sílice (Lodhi y Crabo, 1984), gradientes Ficoll.

El ficoll es una sustancia ampliamente utilizada en la separación celular, sin embargo en el semen ha sido desplazado por el percoll. el Ficoll es un polímetro sintético de alto peso molecular 400000 d. Se obtiene a través de la copolimerización de la sucrosa y la epíclorodrina; las soluciones de ficoll se producen en un rango de densidad de 1.00 a 1.17 g/ml y son osmoticamente inertes a esa concentración. No es tóxico y suele tener una influencia de protección sobre la célula, sin embargo su principal desventaja es su alta viscosidad.(Sharpe, 1988).

## H.- RESULTADOS OBTENIDOS EN SEPARACION DE ESPERMATOZOIDES.

### H.1.- AVANCE EN MOCO CERVICAL BOVINO.

Simán *et al.*, (1987), Trabajando con semen caprino y tubos con moco cervical bovino probaron que existe una migración contra la gravedad de la tierra y al mismo tiempo encontraron que la migración en esos tubos capilares con moco demostró ser útil para evaluar objetivamente la motilidad del semen y al mismo tiempo dependiendo del tiempo transcurrido se separan los espermatozoides mótiles antes o después de congelar, como se muestra en el cuadro 1 donde la recuperación fue de 920 espermatozoides / mm<sup>2</sup> a las cero horas, 940 a las dos horas y 300 a las 24 horas.

<b>Cuadro 1. Motilidad progresiva de los espermatozoides caprinos mantenidos durante 2 y 24 horas a 5°C.</b>	
<b>Tiempo transcurrido</b>	<b>Cantidad de espermatozoides en el tubo capilar.</b>
<b>Cero horas</b>	<b>920 Espermatozoides/mm<sup>3</sup></b>
<b>Dos horas</b>	<b>940 Espermatozoides/mm<sup>3</sup></b>
<b>24 horas</b>	<b>300 Espermatozoides/mm<sup>3</sup></b>
<b>Motilidad progresiva promedio del semen fresco 70%</b>	
<b>Adaptado de Simán, C.G., Herrera, O.D. y Trejo, G.A., 1986.</b>	

Considerando un promedio de 3000 millones de espermatozoides/ml de semen y multiplicando los valores por diez para obtener el mililitro, se tendría una gran pérdida, pero se obtendría una dosis de buena calidad por micropipeta con moco cervical.

## H.2.- FILTRACIÓN EN FIBRA DE VIDRIO DE BORO SILICATO.

En México, la filtración del semen caprino se realizó por Trejo *et al.*, 1986 y Reséndiz *et al.*, 1996) mientras que en ovinos se tienen datos de Medrano *et al.*, 1994 y Juárez *et al.*, 1994), sin embargo solamente han sido inseminadas ovejas después de filtrar el semen (Castro *et al.*, 1993).

La primera referencia de filtración de semen caprino, la realizaron Trejo *et al.*, en 1986, encontrándose efectos significativos para la motilidad progresiva que fue el 54% para los espermatozoides filtrados y de 26% para el semen sedimentado que no paso el filtro de borosilicato (cuadro 2). También existieron menos anomalías secundarias en el semen filtrado 8.5% que en el semen sedimentado 16.8% (cuadro 2), observándose ventajas al utilizar este método.

<b>Cuadro 2. Efecto de la filtración del semen caprino sobre la motilidad progresiva, las anomalías secundarias y la concentración espermática.</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>Motilidad Progresiva (%)</b>	<b>Anormalidades primarias (%)</b>	<b>Anormalidades secundarias (%)</b>	<b>Concentración espermática (millones)</b>
<b>Semen fresco</b>	64.8±16.7 a	0.0	14.5±10.7 b	4188±243
<b>Semen Filtrado</b>	54.0±16.7 a	0.2	8.5± 3.2 a	4130±215
<b>Semen sedimentado</b>	26.0±11.4 b	0.7	16.8± 5.4 b	-----
<b>diferencia fresco-filtrado</b>	10	-----	6	58
<b>Letras diferentes en las columnas, representan diferencias significativas (P&lt;0.01) Ji Cuadrada</b>				
<b>Tomado de Trejo, G.A. et al., (1986)</b>				

Por otra parte Reséndiz, *et al.*, (1996), encontraron diferencias a favor del semen filtrado en fibra de vidrio, solamente para la presencia de acrosomas normales, lo cual en semen descongelado es una ventaja para mejorar los porcentajes de inseminación artificial (Cuadro 6). Observándose las ventajas de utilizar este método como una forma de separar



los espermatozoides, aunque pueden presentarse varios resultados según la especie y el tipo de semen ya sea fresco o congelado.

En semen de carnero, Medrano *et al.*, (1994), han realizado algunas experiencias, con diferentes medios de conservación y no encontraron diferencias ni entre los filtros de borosilicato, ni entre la interacción filtro-medio.

<b>Cuadro 3. Porcentaje de motilidad progresiva en base a los factores momento de conservación, diluyente y filtro (Media ± Error estándar).</b>							
<b>Momento de conservación</b>	<b>Semen diluido</b>		<b>Semen refrigerado</b>		<b>Semen descongelado</b>		
	<b>Diluyente</b>	<b>Tris</b>	<b>Leche</b>	<b>Tris</b>	<b>Leche</b>	<b>Tris</b>	<b>Leche</b>
Sin filtro		42.4±1.9 a	47.1±1.9 a	25.3±2.0 b	35.3±2.0 c	22.4±1.9 b	9.4±1.9 d
Filtro 30 mg		47.0±1.9 a	50.4±1.9 a	27.9±2.0 b	36.2±2.0 c	23.7±1.9 b	10.4±1.9 d
Filtro 50 mg		48.4±1.9 a	49.0±1.9 a	26.9±2.0 b	35.6±2.0 c	20.5±1.9 d	10.7±1.9 e
Letras diferentes indican diferencia estadística (P<0.03).							
Tomado de: Medrano <i>et al.</i> , (1994).							

Otros investigadores como (Juárez *et al.*, 1994), encontraron diferencias significativas al mojar la fibra de vidrio borosilicato con diluyente a base de leche, a base de tris o con citrato de sodio, obteniendo mejores resultados con citrato de sodio 98mM. Y se obtuvieron mejores resultados con 50mg de borosilicato que con 30mg, siendo la motilidad promedio de 41.7% y 45.8% para el diluyente tris y de 43.3% y 44.2% para el diluyente de leche respectivamente como se observa en el cuadro 4.

<b>Cuadro 4. Porcentaje de motilidad progresiva en semen de carnero en base al diluyente y al filtro (Media ± Error estándar).</b>		
<b>Filtro</b>	<b>Diluyente</b>	
	<b>Tris</b>	<b>Leche</b>
30 mg de Borosilicato	41.7 ± 4.5 ab	43.3 ± 4.5 a
50 mg de Borosilicato	45.8 ± 4.5 a	44.2 ± 4.5 a
Sin filtrar	30.0 ± 4.5 b	35.0 ± 4.5 a
Letras diferentes, indican diferencias significativas (P<0.04).		
Tomado de: Juárez, L.R. <i>et al.</i> , (1994)		

No se conoce la fertilidad del semen separado por motilidad ya que los experimentos realizados en México han demostrado buenos resultados en el laboratorio y la única experiencia que se tiene con ovinos se realizó con semen refrigerado. Las hipótesis señalan que cuando se utiliza semen congelado, este sufre cambios en la membrana plasmática que alteran su fertilidad, por eso mejora la calidad con la filtración, pero el semen refrigerado no sufre alteraciones, por lo tanto casi todos los espermatozoides pasan el filtro, por lo que en este experimento no hubo diferencias entre el semen filtrado y semen sin filtrar como se muestra en el cuadro 5.

<b>Cuadro 5. Efecto de la inseminación con semen filtrado a través de borosilicato sobre la fertilidad de un rebaño de ovejas Criollas.</b>			
<b>Grupo</b>	<b>Ovejas inseminadas</b>	<b>Ovejas paridas</b>	<b>Porcentaje de parición</b>
<b>Semen refrigerado 2-5 horas</b>	<b>25</b>	<b>4</b>	<b>16.0 a</b>
<b>Semen filtrado Refrigerado</b>	<b>24</b>	<b>7</b>	<b>29.2 a</b>
<b>Semen sin filtrar Refrigerado</b>	<b>24</b>	<b>8</b>	<b>33.3 a</b>
<b>Monta Natural</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>66.6 b</b>
<b>Letras diferentes en las columnas, representan diferencias significativas (P&lt;0.03)</b>			
<b>Tomado de: Castro <i>et al.</i>, (1993).</b>			

### H.3.- FILTRACIÓN DE SEMEN EN *SEPHADEX*.

La observación ha mostrado que todos los espermatozoides que pasaron las columnas de *sephadex* tenían motilidad progresiva, pero algunos espermatozoides retenidos también se movían, sin embargo estos invariablemente tuvieron daño acrosomal (Vyas *et al.*, 1992).

Landa *et al.*, (1980) y Acevedo (1995), filtraron en *sephadex* semen de ovino y obtuvieron una mejor calidad de semen en lo referente a motilidad progresiva, porcentaje de anomalías espermáticas e integridad acrosomal.

Reséndiz *et al.*, (1996), filtraron semen caprino en *sephadex* G 25-80 y borosilicato con 0.50 gramos y 20 $\mu$  de diámetro en columnas de 14.5 cm de altura y obtuvieron buenos resultados con el *sephadex* en lo que corresponde a recuperación de la motilidad progresiva y con el *sephadex* y el borosilicato en lo referente a el porcentaje de acrosomas normales ambos filtros tanto el de *sephadex* 89% y fibra de vidrio 88.3% de acrosomas normales fueron mejores que los del semen sin filtrar 84% como se muestra en el cuadro 6.

<b>Cuadro 6. Motilidad progresiva, recuperación de la motilidad progresiva y acrosomas normales de los espermatozoides, después de la congelación de semen caprino filtrado en fibra de vidrio y <i>sephadex</i> (Medias <math>\pm</math> Error estándar).</b>			
<b>Filtros</b>	<b>Motilidad progresiva</b>	<b>Recuperación de la motilidad progresiva</b>	<b>Acrosomas normales</b>
Sefadex	66.41 $\pm$ 1.39 a	84.69 $\pm$ 1.91 b	88.96 $\pm$ 1.08 a
Fibra de vidrio	69.41 $\pm$ 1.39 a	88.19 $\pm$ 1.91 a	88.39 $\pm$ 1.08 a
Sin filtrar	69.42 $\pm$ 1.40 a	88.86 $\pm$ 1.91 a	83.77 $\pm$ 1.08 b
<b>Letras diferentes en las columnas, representan significancia estadística (P&lt;0.05).</b>			
<b>Tomado de: Reséndiz, M.L. <i>et al.</i>, (1996).</b>			

Con estos resultados, es posible aplicar con buenos resultados la técnica al semen congelado, habiendo obtenido con semen de este experimento 30% de gestaciones en

cabras criollas en pastoreo inseminadas con estro natural, independientemente del tipo de filtración.

#### H.4.- SEPARACION A TRAVES DE GRADIENTES DE PERCOLL.

El percoll, es una sustancia que tiene varias ventajas, por un lado permite o facilita la capacitación espermática cuando los gametos se separan por este método reduciendo los requerimientos de medio (Mendes *et al.*, 2003), encontraron que podían omitir la heparina en el medio de cultivo para la fertilización *in vitro*.

Gardon *et al.*, (2001), estudiaron la reacción del acrosoma en semen bovino y obtuvieron 32% de espermatozoides con una reacción aceptable después de separar con percoll contra 13% en la muestra control.

Trentalance y Beorlegui (2002), comparando el percoll contra el semen fresco lograron en bovinos aumentar la motilidad progresiva de 60% a 83%.

Rho *et al.*, (2001), compararon espermatozoides separados por percoll, *swim-up* y fibra de vidrio con el fin de realizar fertilización *in vitro* en ovocitos caprinos y los mejores resultados evaluados como la formación de pronúcleos en los ovocitos se obtuvieron cuando se utilizó el percoll 54% contra 16% en los otros dos métodos.

Sin embargo Ortiz y Reyes (1999), trabajando con semen caprino separado por percoll después de la congelación no lograron mejorar el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal aunque si incrementaron la recuperación de la motilidad progresiva. La recuperación de la motilidad progresiva que es la proporción de espermatozoides que recuperan motilidad después de la congelación fue mejor en el Percoll antes y después de congelar que en el sobrenadante, siendo de 9.24% antes de congelar y de 12.9% después de congelar contra 2.40% y 6.6% antes y después de congelar en el sedimento que no filtro por el Percoll, como se muestra en el cuadro 7.

**Cuadro 7. Medias mínimo cuadráticas para las características espermáticas de semen caprino filtrado en gradientes de percoll antes y después de la congelación.**

<b>Característica seminal</b>	<b>Sobrenadante del Percoll antes de congelar.</b>	<b>Sedimento del Percoll antes de congelar.</b>	<b>Sobrenadante del Percoll después de congelar.</b>	<b>Sedimento del Percoll después de congelar</b>
<b>Motilidad progresiva al descongelado</b>	6.25±1.55 ab	1.50±1.55 c	8.33±1.55 a	4.08±1.55 bc
<b>Recuperación de la motilidad progresiva</b>	9.24±2.36 a	2.40±2.36 b	12.9±2.36 a	6.64±2.36 ab
<b>Acrosomas normales</b>	72.91±2.37 b	69.58±2.37 b	79.33±2.37 a	79.33±2.37 a
<b>Acrosomas hinchados</b>	21.25±1.56 b	17.58±1.56 ab	13.91±1.56 a	13.58±1.56 a
<b>Acrosomas rotos</b>	4.66±1.99 a	11.91±1.99 a	6.00±1.99 b	6.08±1.99 b
<b>Acrosomas ausentes</b>	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).  
Tomado de Örtiz y Reyes, 1999.

## H.5.- SEPARACION ESPERMATICA POR *SWIM UP*.

Trejo, *et al.*, 2002, trabajando con semen caprino separado por la técnica de *Swim-up* antes de congelar encontraron que las variables que tuvieron cambios significativos fueron la motilidad espermática progresiva, las anomalías primarias, las anomalías secundarias y el porcentaje de espermatozoides normales.

En el cuadro 8 se presentan las medias mínimo cuadráticas para el semen de cabritos jóvenes antes y después de la congelación y con una separación de espermatozoides móviles por la técnica del *swim-up* y se aprecia que para tres variables de importancia fisiológica se obtuvieron ventajas con el tratamiento. La motilidad progresiva fue mayor en el semen fresco que en el descongelado 30.5% contra 11.2%, lo que representa el 36.6% de recuperación de la motilidad progresiva.

Los espermatozoides normales se incrementaron con el tratamiento 75.2% contra 65.8% después y antes de congelar respectivamente.

Las anomalías primarias y secundarias se redujeron después del tratamiento en beneficio de la calidad seminal.

La ventaja de la técnica *swim-up*, es la separación de espermatozoides viables en individuos con oligospermia (Barros *et al.*, 1985), esta misma técnica puede ser utilizada en animales jóvenes donde todavía no se ha establecido una espermatogénesis del todo normal, para mejorar su calidad seminal.

Al aplicar el procedimiento a los cabritos, fue posible mejorar las anomalías primarias y secundarias en las muestras y por ende el total de espermatozoides normales, esto se logra por el movimiento propio de las células espermáticas que tienen geotropismo negativo. Llama la atención que tanto el volumen seminal como la concentración

espermática al utilizarlos como un ajuste matemático afectaron la motilidad progresiva del semen descongelado y las correlaciones fueron positivas lo que sugiere un sesgo de la evaluación subjetiva en favor de las muestras con mayor población espermática, sin embargo al ser ajustadas el efecto se corrige, por lo que la apreciación visual no altera el efecto final sobre la calidad seminal. El aumento de 10% en espermatozoides normales, no se refleja en la motilidad, lo que indica que en este trabajo existió daño espermático, tanto por la congelación como por el efecto de la centrifugación, y la recuperación de la motilidad progresiva no superó el 50% que se ha señalado como adecuado después de la congelación (Pickett y Berndtson, 1974).

<b>Cuadro 8.- Efecto del <i>Swim-up</i> y la congelación sobre las características seminales de cabritos jóvenes (Medias mínimo cuadráticas).</b>		
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>ANTES DE CONGELAR</b>	<b>DESPUES DE CONGELAR CON SWIM-UP</b>
Motilidad progresiva	30.5% ± 1.5	11.2% ± 1.5
Espermatozoides normales	65.8% ± 2.9 <b>b</b>	75.2% ± 2.9 <b>a</b>
Anormalidades primarias	20.0% ± 1.7 <b>b</b>	14.3% ± 1.7 <b>a</b>
Anormalidades secundarias	9.1% ± 0.6 <b>b</b>	2.2% ± 0.6 <b>a</b>
Letras diferentes en los renglones, representan diferencias significativas (P<0.05) Tomado de Trejo <i>et al.</i> , 2004.		

Trejo *et al.*, 2004, utilizaron el *swim-up* para separar semen de cabritos jóvenes y lo congelaron en pajillas de 0.5 ml o tubos criogénicos de 2.0 ml y sus resultados aparecen en el cuadro 8, en el cual se aprecia que la motilidad progresiva fue mejor antes de congelar 30.5% que después de congelar separando espermatozoides por *swim-up* 11.2%, el semen considerado en ese trabajo como una combinación constante heterospermica, el tipo de envase y la concentración espermática del semen fresco. Para el porcentaje de



espermatozoides normales, se incrementaron con el *swim-up* de 65 a 75% y esta diferencia se observó igualmente en las anomalías primarias y secundarias, el único efecto significativo fue el tipo de envase. La motilidad progresiva fue mejor para el tubo criogénico de 2 ml  $25.5 \pm 3.1\%$  contra  $19.3 \pm 2.8\%$ , lo que se refleja por ende en la recuperación de la motilidad progresiva  $81.3 \pm 12.5\%$  para 2 ml contra  $58.1 \pm 11.1\%$  para pajillas de 0.5 ml.

Para las anomalías espermáticas de origen primario existió una diferencia en favor de la pajilla francesa con 5 ml  $4.6 \pm 1.1\%$  contra  $16.4 \pm 1.3\%$  en el tubo criogénico; mientras que para las anomalías de tipo secundario, existió un efecto inverso, siendo menores en el tubo criogénico con  $5.3 \pm 2.03\%$  contra  $25.5 \pm 1.8\%$  en la pajilla.

Es sabido que los ingredientes proteicos del diluyente, en este caso yema de huevo, protegen a los espermatozoides contra el choque frío y a mayor proporción de diluyente mejor protección (Corteel, 1981), esta protección es debida en mayor grado a que la temperatura desciende con mayor lentitud. En el presente trabajo, no se alteró la proporción de diluyente, pero se aumentó la cantidad del mismo en relación a la capacidad volumétrica del contenedor ya fuera pajilla de 0.5 ml o tubo de 2 ml, y es evidente que este aumento de volumen tuvo efectos favorables en la viabilidad espermática.

La congelación afectó de manera significativa la motilidad espermática, siendo menor en el semen congelado, por lo que la covariable para esta característica fue altamente significativa.

La recuperación de la motilidad progresiva fue mejor cuando se almacenó en volumen relativamente alto de 2 ml que representó el 75% más que 0.5 ml. y aunque la motilidad inicial fue más baja que la encontrada por Trejo, *et al.*, 2002, la recuperación fue superior en los dos tratamientos, esto pudo deberse entre otras cosas a que la incubación en

este trabajo fue en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>, mientras que en trabajo anterior la incubación se dio en atmósfera normal aunque en ambos casos se mantuvo una temperatura de 37°C. Como quiera que sea, el mayor volumen de diluyente favoreció la motilidad progresiva, por lo que existen posibilidades de congelar semen de animales jóvenes en volúmenes mayores.

La motilidad progresiva, se vio afectada por la covariable de concentración espermática, lo que significa que existe un pequeño error de apreciación, ya que la prueba es subjetiva, los resultados parecen indicar que al observar mayor cantidad de células en el campo del microscopio, se sobre estima la motilidad, sin embargo el error, no parece afectar en forma considerable el resultado final.

En cuanto al porcentaje de espermatozoides normales no existieron diferencias significativas, lo que indica que ambos tratamientos fueron aceptables, sin embargo para las anormalidades primarias, si existió ventaja para las pajillas mientras que los papeles se invirtieron para el tubo, la explicación lógica para este fenómeno, pone de manifiesto un error de diseño en el experimento, los espermatozoides sanos, llegan a la parte alta del tubo, los espermatozoides con anormalidades secundarias nadan más rápido que los de anormalidades primarias, por lo tanto al llenar en primer lugar la pajilla, se absorben en mayor cantidad las células con daño secundario, al llenar posteriormente el tubo, se recolectan células con mayor cantidad de anormalidades primarias. Sin embargo los espermatozoides normales no se alteran, lo que indica que estos se distribuyen en todo el líquido sobrenadante.

Sin embargo queda un punto sin esclarecer, por que si no existe diferencia entre los espermatozoides normales y si el tubo tiene mayor cantidad de daño primario, por que la motilidad y la recuperación de la motilidad son mayores en el tubo de dos mililitros, esto

fortalece la hipótesis de que mayor volumen de diluyente, protege a los espermatozoides del choque frío y aunque estén morfológicamente intactos, fisiológicamente están muertos.

#### IV.- COROLARIO.

Hasta los conocimientos actuales del estado que guarda la investigación en filtración de semen de caprinos, apoyado por alguna evidencia en ovinos, se puede inferir que las mejores opciones son las columnas de *sephadex*, de fibra de vidrio de borosilicato y los gradientes de *percoll*, respectivamente ya que permiten tener mejor recuperación de motilidad después de la congelación y mejor porcentaje de acrosomas normales, aunque se disminuya la concentración espermática. El *Swim up* aunque mejora la calidad espermática, reduce el número de espermatozoides recuperados y tiene el inconveniente de la incubación en CO<sub>2</sub> a 37°C, lo cual retrasa el uso del semen. Así utilizando estos métodos puede mejorarse la calidad del semen destinado a la inseminación artificial de cabras.

## V.- LITERATURA CONSULTADA.

- Acevedo, H.M.A. 1995. Evaluación de semen de carnero filtrado a través de columnas de sephadex. Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlán U.N.A.M. México.
- Anzar, M. and Graham, E.F. 1993 a. Filtration of bovine semen I Development of sephadex ion-exchange filter. *Anim. Reprod. Sci.* 31:187-195.
- Anzar, M. And Graham, E.F. 1993 b. Filtration of bovine semen II Factors affecting the recovery rate of spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 31:197-204.
- Anzar, M. And Graham, E.F. 1995. Effect of filtration on post-thaw quality of bull semen. *Theriogenology*. 43:439-449.
- Arora, M, Carver-Ward J.A.C., Jaroudi K.A and Sieck. 1994. Is Percoll safe for in vivo use? *Fertil Steril* 61:979-981.
- Avery B. and Grevet. 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology* 44: 871-878.
- Bailey J.L and Buhr M.M. 1994. Cryopreservation alters the Ca<sup>2+</sup> flux of bovine spermatozoa. *Can.J.Anim.Sci.* 74:45-51.
- Bangham. A. D. y Hancock. J. L. 1955. A new method for counting live and dead bull spermatozoa. *Nature*. 176: 656.
- Barros, e., Vigil, P., Herrera, Arguello, B., Walker, R. 1985. Selection of morphologically abnormal spermatozoa by human cervical mucus. *Arch. Androl.* Vol 16.
- Buzby J.D, Arns M.J and pool K.C. 1993. Evaluation of different sperm separation techniques for harvesting equine spermatozoa intended for in vitro culture. *J.Equine Vet. Sci.* 13:498-501.
- Castro, O.J., Soto, G.R., Medrano, H.A. y González, D.F., 1993. Efecto de la refrigeración y filtración de semen en borosilicato sobre la fertilidad en un rebaño de ovejas Criollas. *Memorias del 6° Congreso Nacional de Producción Ovina. Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos A.C. Ciudad Valles. San Luis Potosí, México.*: 147-150.
- Cole-Parmer, 2000. Cole Parmer International. Catálogo de laboratorio. <http://www.teesa.com>.
- Corteel. J. M. 1981 Collection, processing and artificial insemination of goat semen. En *goat Reproduction*. C. Gall (Ed). Academic Press Inc. Londres, Gran Bretaña. 171-191.
- Coscioni, A. C., Reichenbach, H.D., Schwartz, J., LaFalci, V.S., Rodriguez, m J.L., Brandelli, A. (2001). Sperm function and production of bovine embryos in vitro after *Swim-up* different calcium and caffeine concentration. *Animal Reproduction Science* 67 : 59-67.

- Chan Y.M, Abuzeid M.I, Malcomson J.H and Sasy M. 1994. Selection of human spermatozoa by a hyperosmotic two-layer Percoll gradient. *Fertil. Steril* 61:1097-1102.
- Chandrasanan. C., Pattabiraman. S. R. Venkataswami. V. 1986. Studies on the effect of glass wool colum filtration on the quality of semen of cross bread bulls. *Indian Vet. J.* 63: 913-918.
- Chauhan, S.S; Mohan, G.;Kumar, S. and Sahni, K.L. 1993. Comparative evaluation of various grades of sephadex for improving the quality of buffalo semen. *Indian J. Anim. Sci.* 63(3):346-350.
- Evans. G. y Maxwell. W. M. C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Butterworths. Australia. 194p.
- Fayemi. E. O., Crábó. B. G. y Gráham, E. F. 1979. Assáy of frozen boar semen with sephadex filtration. *Theriogenology* 12(1): 13-17.
- Fukui. Y., Fukushima. M. y Ono. H. 1983. Fertilization in vitro of bovine oocytes after various sperm procedures. *Theriogenology*. 20 (6): 651-660.
- Gardon, J.C. Matas, C. y Gadena, J. 2001. Effect of the method of preparing bovine semen on the acrosome reaction pattern. *Anales de Veterinaria de Murcia*. 17: 19-26.
- Graham. E. F. y Graham. J. K. 1990. The effect of whole ejaculate filtration on the morphology and the fertility of bovine semen. *J. Dairy Sci.* 73: 91-97.
- Guerrero, C.A. 1981. Efecto del paso de semen de conejo en columnas de sephadex sobre la proporción de espermatozoides X e Y. Tesis de licenciatura. FMVZ. UNAM. México. 21p.
- Hafez, E.S.E, 1993. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ta edición, Interamericana. México
- Hawk, H.W., Cooper, B.S. y Conley, H.H., (1977). Sperm transport the cervix of the ewe after regulation of estrus prostaglandins or progesterone. *J. Anim. Sci.* 55: 878-890.
- Hawk, H. W. Cooper, B. S. Rexroad, C. E., Jr. Pursel, V. G. 1981. Death of sperm in the cervix of ewes bearing intrauterine plastic spirals or threads. *Theriogenology*. 16: 6, 641-650.
- Hochi S, HoChoi Y., Korosue K and Oguri N. 1994. Effets of individual stallions and mare breeds on assisted fertilization in vitro. *J. Equine Sci.* 5:77-81.

- Juárez, L.R.; Hernández, J.G.; Hernández, N.F.; Soto, G.R. y Medrano, H.A. 1994. Técnica de filtración de semen de carnero en borosilicato. Memorias del VII congreso nacional de producción ovina. Fac. Med. Vet. Zoot. U.N.A.M. México.
- Koukoulis, G.N., Vantman, D., Dennison, L., Banks, S.M. y Sherins, R. J. 1989. Low acrosin activity in a subgroup of men with idiopathic infertility does not correlate with sperm density, percent motility, curvilinear velocity, or linearity. *Fertil. Steril.* 52 (1): 120-127.
- Krishnamurthi, P. S., Pattabiraman, S. R. y Venkataswami, V. 1983. A physical method to improve semen quality. *Cheiron.* 12 (1): 49-51.
- Landa, C.A., Almquist, J. O, y Amann, R.P. 1980. Factors influencing sephadex separation of bovine and ovine spermatozoa. *J. Dairy. Sci.* 63 (2);277-282.
- Langford, G.A. Hackett, A.J. y Marcus, G.J. 1984. Studies on ram sperm penetration in bovine cervical mucus. *Proc. Int. Cong. Anima. Reprod. A. I. Vol II: 58: 10-14* Illinois University. U.S.A.
- Lechtzin, N., Garside, W., Wileman, G. y Hillman, N. 1990. The ability of glass bead column filtered mouse spermatozoa to fertilize homologous eggs in vitro. *J. in vitro Fertil. Embryo Transf.* 7 (2): 86-88.
- Lechtzin, N., Garside, W., Heyner, S. y Hillman, N. 1991. Glass-bead column separation of motile and nonmotile human spermatozoa. *J. in vitro Fertil. Embryo Transf.* 8(2): 96-100.
- Lodhi, L.A. y Crabo, B.G. 1984. Filtration of bull spermatozoa through sephadex, polyacrylamide, silica gel and glass wool in the presence and absence of two sugars. *Proc. 10th. Int. Cong. Ani. Reprod. Artif. Insem. Illinóis. EUA. Vol. II: 59.*
- Maki-Laurila, M. y Graham, E. F. 1968. Separation of dead and live spermatozoa in bovine semen. *J. Dairy Sci.* 51 (6): 965.
- Marmor, D., Delafontaine, D., Prieur, B., Fourcat, C., Moing, M. y Parta, F. 1980. La filtration in vitro du sperme sur laine de verre. *J. Gyn. Obst. Biol. Reprod.* 9 (6): 705-711.
- Massip, A. 1981. Manipulations des gametes et embryons de mammiferes. *Ann. Med. Vet.* 125 : 457-483.
- McGrath, J., Hillman, N. y Nadijcka, M. 1977. Separation of dead and live mouse spermatozoa. *Develop. Biol.* 61: 114-117.

- Medrano, H.J.A. 1993. Congelación de semen de carnero diluido en tris y leche, filtrado a través de borosilicato. Tesis de Maestría en Producción Animal (ovinos y caprinos). F.E.S. Cuautitlán U.N.A.M. México.
- Medrano, H.J.A.; Trejo, G.A. y Soto, G.R. 1994. Efectos de la congelación de semen de carnero diluido y filtrado en borosilicato sobre las características seminales. Memorias del VII congreso nacional de producción ovina. Fac. Med. Vet. Zoot. U.N.A.M. México, DF. Memorias de la Reunión Nacional Sobre Caprinocultura. Universidad Autónoma de Durango.
- Mendes, J.O.B., Burns, P.D., Torre-Sanchez, J.F y Seidel, G.E. 2003. Effects of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology* 60: 331-340.
- Moohan J.M. and Lindsay K.S. 1995. 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
- Moohan, J. and Moudgal, R.P. 1994. Filtration of chicken semen using Glass-Wool-Packed column. *Indian Anim. Sci.* 64(5):474-476.
- Ortiz, R.J.L. y Reyes M. S. 1999. Efecto de la separación de espermatozoides a través de gradientes de percoll antes y después de la congelación, sobre la motilidad progresiva y la morfología espermática de semen caprino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
- Parrish J.L, Krogenaes A. and Parrish L.S. 1995. 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.
- Paulson. J. D. y Polakoski. K.L. 1977. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil. Steril.* 28 (2): 178-181.
- Paulson. J. D., Polakoski. k. L. y Leto. S. 1979- Further characterization of glass wool column filtration of human semen. *Fertil. Steril.* 32 (1): 125-126.



- Pickett, B. W. y Berndtson, W. E. 1974. Preservation of bovine spermatozoa by freezing in straws. A review. *J. Dairy Sci.* 57: 1287.
- Resendiz, M.L., Rafael, M.N., Trejo, G.A., Medrano, H.A. y Hernández, P.E., (1996). Comparación de filtros de sefadex y fibra de vidrio para mejorar la calidad del semen caprino congelado. *Memorias de la XI Reunión Nacional Sobre Caprinocultura*. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco. México.: 35-41
- Rho, G.J., Hahnel, A.C. y Betteridge, K.J. 2001. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effect on the production of goat embryos in vitro. *Theriogenology* 56: 503-516.
- Salamon. S. 1987. Assessment of frozen-thawed semen. En *Artificial Breeding of sheep with frozen semen workshop*. W. M. C. Maxwell (Ed). Waite Inst. Dpto. Agric. South Australia. 5-11.
- Samper. J. C., Loseth. K.J. y Crabo. B.G. 1988. Evaluation of horse spermatozoa with sephadex filtration using three extenders and three dilutions. *lith. Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Dublin, Irlanda.* 3: 295.
- Samper. J.C. y Crabo. B. G'. 1988. Filtration of capacitated stallion spermatozoa through filters containing glass wool and/or sephadex. *lith. Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem: Dublin, Irlanda.* 3: 294.
- Samper. J.C. 1992. Evaluation of cryopreserved semen: An alternative assay. *Acta vet. Scand. Sipl.* 88: 59-65.
- Sandoval V,A. y Trejo, G.A. 1994. Evaluación de la morfología de ovocitos de ovinos recuperados de folículos antrales en diferentes etapas reproductivas. *Memorias de la 25 Reunión de la Asociación Mexicana de Producción Animal*. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Asociación Mexicana de Producción Animal A.C. La Paz, Baja California Sur.: 72-76.
- Shalgi. R., Kaplan, L. R., Nebel. L. y Kraicer. P.F. 1981. The male factor in fertilization of rat eggs in vitro. *J. Exp. Zool.* 217: 399- 402.
- Sharpe, P.T., 1988. *Methods of cell separation*. Elsevier. Amsterdam.

- Siman C.G., Herrera O.D. y Trejo G.A. 1986. Evaluación de tres métodos para estimar la motilidad progresiva en semen caprino fresco y refrigerado en dos diluentes. Memorias de la III Reunión Nacional Sobre Caprinocultura Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México.: 36 - 41.
- Suttiyotin, P., Thwaites, C.J. 1993. Evaluation of the ram semen motility by a swim- up technique. *Journal of Reproduction and fertility*. 97: 339-345.
- Trejo G.A. 1991. Inseminación artificial y control del ciclo estral en caprinos. Simposium de reproducción y genética en caprinos productores de leche. Memorias FES-C. México.
- Trejo, G. A., Esquivel, C. A. Rodríguez, M. A, y Martínez, A. 1986. Algunas técnicas para facilitar el manejo, la evaluación o mejorar la calidad del semen caprino. Memorias de la segunda reunión nacional sobre caprinocultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila. México. A1-A7.
- Trejo, G.A., Sarmina, J. y Villalobos, G. 2002. Uso de la técnica swim-up para mejorar la calidad del semen congelado de cabritos menores de un año.
- Trejo A, J.A. Sarmina, M.G. Villalobos, J.L. Camacho and P. Hernández.(2004). Use of swim-up Technique and Extender Volume to Improve Frozen Semen Quality in Young Male Gotas. Universidad Nacional Autónoma de México F.E.S Cuautitlán Catedra de Reproducción y Genetica en Ovinos y Caprinos., 8th Internacional Conference on Gotas Pretoria Sudáfrica.:PH050.
- Trentalance, G.M y Beorlegui, N.B. 2002. Sperm evaluation in criopreserved bovine semen recovered by two selection methods. *Andrologia* 34: 397-403.
- Valcárcel A., Moses D.F, Perez L.J and Baldassarre H. 1996. Comparison between Sephadex G-10 and Percoll for preparation of normospermic, asthenospermic and frozen/thawed ram semen. *Anim. Reprod.Sci.* 41:215-224.
- Van Soom A. and Kruif A. 1994. Salvage of oocytes from sterile genetically valuable cows, resulting in the birth of a calf. *Anim. Reprod. Sci.* 36:187-196.

- Vyas,S., Dhami, A.j.,Mohan, G. AND Sahni, K.l. 1992. Effect of sephadex and Glass Wool on the quality and Freezability of semen of cross bred bull. Indian J. Anim. Sci. 62(4):341-343.
- Vyas. S., Dhami. A. J., Mohan. G, y Sahni. K. L. 1991. Effect of sephadex and glass wool column filtration on the quality and storage (at 5°C) of crossbred bull semen. Indian J. Ani. Sci. 61 (7): 702- 704.
- Zheng Y.S, Fiser P. and Sirad M.A. 1992. The use of eyaculated boar semen after freezing in 2 or 6% glycerol for in vitro fertilization of porcine oocytes matured in vitro. Theriogenology 38:1065-1075.

## OTRAS FUENTES.

([www.cegyr.com/cpac.html](http://www.cegyr.com/cpac.html), .../science?\_ob=ArticleURL&\_aset=A-WA-A-VY-MsSDUW-UUA-AUBVVVYZCZ-VECEYYI0/10/02)

[www.teesa.com](http://www.teesa.com).

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**METODOS DE SEPARACION ESPERMATOZOIDES PARA MEJORAR LA  
CALIDAD SEMINAL.  
(REVISION BIBLIOGRAFICA)**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A:**

**PEDRO HERNANDEZ RAMIREZ**

**ASESOR: M. en C. ARTURO ANGEL TREJO GONZÁLEZ**