



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Estudios Superiores
"Cuautitlán"



2ej

"EVALUACION DE SEMEN DE CARNERO FILTRADO
A TRAVES DE COLUMNAS DE SEPHADEX"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A,

MIGUEL ANGEL ACEVEDO HERNANDEZ

ASESORES: MVZ. M.C. JOSE ALFREDO MEDRANO HERNANDEZ
MVZ. M.C. ROSALBA SOTO GONZALEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1995

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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

F. E. S. A. N.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

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

" Evaluación de semen de carnero filtrado a
través de columnas de sephadex."

que presenta el pasante: Miguel Angel Acevedo Hernández.
con número de cuenta: 8005959-2 para obtener el TITULO de:
Médico Veterinario Zootecnista ; en colaboración con :

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

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 21 de julio de 199 5

PRESIDENTE M.V.Z. Fernando Osaya Gallardo'
VOCAL M. en C. Arturo Trejo González
SECRETARIO M. en C. Rosalba Soto González
PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Blanca Moreno Cardenti
SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Juan Osampo López

AGRADECIMIENTOS:

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por haberme brindado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán:

Que me abrió sus puertas para llevar a cabo mis estudios de licenciatura que ayudaron a desarrollarme como persona y profesionista a través de los conocimientos y experiencias adquiridos en sus instalaciones.

| Gracias !

A todos mis profesores:

Por compartir conmigo sus conocimientos y experiencia personal durante mi formación profesional.

Mi eterno agradecimiento.

A mis asesores:

M en C. J. Alfredo Medrano Hernández
y M. en C. Rosalba Soto González.

Quienes además de brindarme todo su apoyo, compartieron conmigo sus conocimientos y su tiempo, además de ofrecerme toda su confianza y amistad.

¡ Mil Gracias !

Al M. en C. Arturo A. Trejo G.

Por su gran apoyo y paciencia para la realización de este trabajo.

Al M. en C. Francisco González Díaz:

Por su valiosa cooperación en la realización de este trabajo.

A los miembros de mi jurado:

Gracias por la ayuda que me brindaron.

DEDICATORIAS:

A Dios:

Le doy las gracias por haberme permitido llegar hasta el día de hoy, en que tengo la oportunidad de brindarles este trabajo a mis padres y pagar con ello un poco de lo mucho que me han brindado.

A mis padres:

**Felicitas Hernández de Acevedo
y Enrique Acevedo Balleza.**

Por el apoyo moral y económico así como el gran amor que siempre me han brindado. Por la confianza y entusiasmo que tuvieron para que terminara mis estudios profesionales.

Les dedico la presente con cariño como muestra de mi eterno agradecimiento.

¡ Gracias !

A mis hermanos y cuñados:

**Jorge y Gloria, Víctor y Elizabeth,
María y Ricardo, Enrique y Blanca,
Eloy y Maricruz y, Laura y Oscar:**

Gracias por el cariño y apoyo que siempre me han brindado y que han sido tan importantes para mí.

A María del Socorro:

Gracias por ese cariño incondicional y por todos los momentos maravillosos que hemos compartido juntos.

A Javier Beltrán y Porfirio Hernández.

Dos grandes amigos con quienes aprendí la grandeza de esta carrera y con quienes compartí grandes aventuras.

A todos mis amigos y compañeros del laboratorio de Reproducción y a todos los que contribuyeron a la realización de este trabajo.

| Gracias !

INDICE

i. RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
II. OBJETIVOS	16
III. MATERIAL Y METODOS	17
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSION	41
VI. CONCLUSIONES	50
VII. LITERATURA CONSULTADA	51
VIII. ANEXO I	55
IX. ANEXO II	56

RESUMEN.

Con el objeto de evaluar la técnica de filtración de semen utilizando columnas de Sephadex, se determinó la motilidad, concentración, morfología e integridad acrosomal de los espermatozoides filtrados y la eficacia de la tinción acrosomal propuesta por Kovács y Foote (1992).

Se recolectaron 16 muestras de semen de un carnero adulto, por medio de vagina artificial. El semen fué diluido 1:4 (semen: diluyente) en el diluyente Tris-glucosa-yema de huevo. Las muestras se trabajaron por duplicado. La filtración se realizó en columnas de 2cm de altura conteniendo cada una de ellas 0.5g de Sephadex. De cada filtro se recolectaron 3 fracciones filtradas (1, 2 y 3) y una muestra de los espermatozoides que quedaron retenidos en las columnas. Los datos se analizaron por medio de análisis de varianza. Se utilizaron como covariables los valores del semen fresco y la prueba de Tukey para diferencia de medias. Los datos expresados en porcentaje se transformaron al arcoseno.

La motilidad progresiva se incrementó como resultado de la filtración del semen, 78.4% y 71.8% en las fracciones 1 y 2, en comparación al semen fresco que presentó 57.9% ($P < 0.01$).

La concentración de espermatozoides recuperados después de la filtración fué de 3 481 millones de espermatozoides por mililitro, correspondiente al 62.2% del valor inicial del semen fresco que fué de 5 594 millones.

En relación a la morfología espermática, el porcentaje de espermatozoides normales aumentó con la filtración, presentando la fracción 1, 74.8% de éstas células en comparación al semen fresco que registró 63.2%. En cuanto a las anomalías espermáticas, se registraron valores muy altos, ya que el semen fresco presentó 37.1%, correspondiendo el 8.1% a primarias, y el 29% a secundarias. Estos valores disminuyeron con la filtración del semen, pero sólo en la fracción 1 que presentó el 25.1% de anomalías, 5.5% de primarias y 19.6% de secundarias ($P < 0.05$).

En la relación morfología-integridad acrosomal, se encontró que la fracción 1, presentó el valor más elevado de espermatozoides normales y anormales con acrosoma intacto (73.6%), muy pocos espermatozoides sin acrosoma (1.9%). La fracción 2 se caracterizó por poseer pocos espermatozoides con acrosoma intacto (25.5%), tener un elevado porcentaje de acrosomas dañados (40.6%) y poseer el valor más alto de espermatozoides sin acrosoma (23.2%). La fracción 3 presentó la cifra más alta de espermatozoides sin acrosoma ni anillo postacrosomal, 56.9%, al mismo tiempo presentó el porcentaje más bajo de acrosomas intactos 2.1% y, también tuvo un porcentaje elevado de células sin acrosoma, 22.3%. La fracción retenida presentó 11% de espermatozoides normales y 16.9% de acrosomas intactos, además de poseer el valor más alto de espermatozoides con acrosoma dañado, 46.4% ($P < 0.05$).

La filtración a través de columnas de Sephadex posee una elevada selectividad para retener espermatozoides dañados y permite el paso de la mayor parte de los espermatozoides intactos.

I. INTRODUCCION

En México, la población ovina se ha mantenido estática durante los últimos 40 años, oscilando entre los 4 y 5 millones de cabezas, las cuales son explotadas en su mayoría por productores campesinos con bajos recursos económicos o por gente dedicada a otras actividades, lo cual hace que su demanda sea sólo de tipo local. Por otra parte, alrededor del 95% de la población ovina está formada por ganado criollo y el otro 5% restante son animales de razas puras como Rambouillet, Hampshire, Suffolk, Corriedale y Pelibuey entre otros (*De Lucas, 1984*).

Al igual que en otros países en vías de desarrollo, en México la especie ovina desempeña un papel importante como proveedora de alimentos, sin embargo se le ha dado poca importancia, no obstante el ser una especie productiva en algunas zonas que se caracterizan por su pobreza (*Gutiérrez, 1992*).

La rentabilidad de una empresa ovina está determinada por varios factores importantes, uno de ellos es el número de crías nacidas por oveja y por año y, no resulta raro observar fertilidades anuales menores al 50%, aunadas a pesos corporales bajos. Esto se podría incrementar de dos maneras básicas: primero, aumentando la cantidad de crías que nacen por parto y en segundo lugar, acortando el intervalo entre partos, incrementando de esta manera la cantidad de corderos producidos anualmente en el rebaño. Además de los beneficios inherentes a la venta de mas corderos, se tendrían evidentes avances de tipo biológico, tales como más rápido crecimiento del rebaño y mayor presión de selección para el mejoramiento genético del mismo (*Trejo, 1986*).

Para lograr un mejoramiento genético es necesario un balance entre la selección y la eficiencia reproductiva. La utilización de sementales genéticamente mejorados es una alternativa para incrementar cualitativa y cuantitativamente los

productos ovinos. Uno de los caminos más adecuados para la utilización de estos sementales es el uso de la inseminación artificial (*Vallejo y col., 1990*).

Inseminación artificial.

La inseminación artificial es el método reproductivo en el que se obtiene el semen del macho para introducirlo posteriormente en el aparato reproductor de la hembra por medio de instrumentos especiales, no existiendo contacto directo entre el macho y la hembra (*Evans y Maxwell, 1990*).

Actualmente en México, la inseminación artificial en ovejas es poco utilizada en comparación a otras especies como los bovinos, ésto puede deberse al desconocimiento de la técnica. Sin embargo, su empleo ofrece importantes ventajas en relación al empadre natural como la aceleración del mejoramiento genético del rebaño, ya que los machos genéticamente superiores pueden emplearse más ampliamente en cuanto a número de servicios posibles, mejor control reproductivo y sanitario y además permite un mejor establecimiento de medidas de manejo (*Cuadra y col., 1990; Bustamante y col., 1990*).

Existe la posibilidad de utilizar el semen en estado fresco o congelado. La inseminación con semen fresco, vía pericervical, es la más efectiva en el aspecto económico, debido a las elevadas tasas de concepción obtenidas que van del 60 a 95%. El empleo de semen fresco presenta inconvenientes como el corto tiempo de viabilidad de los espermatozoides, por ello su empleo se limita a lugares cercanos al sitio de recolección (*Bustamante y col.1990*).

Para romper con estas limitantes, se ha recurrido a la congelación del semen, siendo posible mantener a los espermatozoides en buenas condiciones durante varios años. La conservación del semen a corto y largo plazo es fundamental para el óptimo aprovechamiento del potencial reproductivo de los semen-

tales seleccionados. Otras ventajas de la congelación del semen son su fácil transportación, aún a lugares lejanos del sitio donde se recolectó, posibilidades de acelerar el mejoramiento genético del rebaño y obtener una más rápida multiplicación de razas nuevas (Evans, 1988; Jheltobruch, 1979, citado por Medrano, 1993).

El semen, después de recolectado, se puede congelar y almacenar durante la estación reproductiva, cuando éste se produce con mayor concentración y calidad y, puede ser aplicado en cualquier época del año y área geográfica (Pérez, 1984; Bustamante y col., 1990).

Sin embargo, la conservación del semen ovino ha tenido dificultades porque presenta bajos porcentajes de motilidad después de congelado, que se reflejan en bajos índices de fertilidad. En la mayoría de los casos la fertilidad obtenida va de un 25% a un 45%, aunque en condiciones experimentales se ha logrado pasar del 55% (Gutiérrez y col., 1990; Evans y Maxwell, 1990).

La baja fertilidad obtenida con el empleo de semen congelado, después de la inseminación cervical, está asociada a una reducida viabilidad de los espermatozoides descongelados, por lo cual no logra establecerse una población suficiente de ellos en el cérvix, además existen fallas en el transporte espermático a través del cérvix y útero hacia el oviducto (tuba uterina). Al final, muy pocos espermatozoides viables y sin daños alcanzan el sitio de fertilización y, como resultado, la fertilidad del rebaño se ve deprimida (Evans y Maxwell, 1990).

Recientemente, se ha desarrollado la técnica de inseminación intrauterina por medio de laparoscopia. De esta manera, es superada la barrera del cérvix, ya que el semen se deposita directamente en los cuernos uterinos, y las tasas de concepción son comparables a la obtenidas con monta natural u otras formas de

inseminación con semen fresco diluído o sin diluir. La fertilidad obtenida con esta técnica es de 50 a 80% (Evans, 1988; Evans y Maxwell, 1990). Aunque esta técnica es de uso rutinario en algunos países como Australia y Nueva Zelanda, y técnicamente puede ser posible su empleo en México, no resulta una opción, sobre todo económica, para la mayoría de criadores (Evans, 1988).

Por otro lado, una de las principales razones por las que no se ha logrado mejorar la fertilidad del semen descongelado, se atribuye al pobre desarrollo de diluentes capaces de conservar la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, por lo cual la investigación debe dirigirse a encontrar mejores diluentes y crioprotectores que logren preservar la motilidad, morfología y viabilidad de los espermatozoides, así como de pruebas de calidad del semen que muestren correlación con la fertilidad y que indiquen su capacidad de soportar el proceso de congelación-descongelación (Evans, 1988; Medrano, 1993).

Producción y evaluación del semen.

La fertilidad del macho está intrínsecamente ligada a la calidad del semen. La composición de éste varía según las especies, entre los individuos de una misma especie e incluso entre los eyaculados del mismo individuo (Derivaux, 1976; Evans y Maxwell, 1990; McDonald, 1991).

En la oveja, como en otras especies, la fertilidad depende entre otras cosas, del número y calidad de los espermatozoides depositados en el tracto genital femenino. Por lo que la capacidad de producción espermática y la calidad del semen deben ser considerados cuando se evalúa a los reproductores, ya que es necesario un gran número de espermatozoides de buena calidad para un adecuado apareamiento (Gutiérrez, 1992).

En los machos, la producción de semen constituye la premisa fundamental

para la reproducción, los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos por una serie de divisiones celulares (espermatocitogénesis), seguidas por una metamorfosis (espermiogénesis), que produce una célula altamente diferenciada y potencialmente móvil: el espermatozoide. El espermatozoide es una célula altamente especializada, que ha evolucionado para ejecutar como función única la fecundación del ovocito (*McDonald, 1991*).

El semen está formado por dos constituyentes principales: el plasma seminal y los espermatozoides. El plasma seminal es una mezcla de líquidos secretados por las glándulas vesiculares, los epidídimos, ductos deferentes y otras glándulas sexuales accesorias; tiene tres funciones principales: a) actúa como vehículo para los espermatozoides, b) sirve de activador de la motilidad para los espermatozoides, los cuales previamente no son mótils y, c) proporciona un medio rico en nutrientes, tamponado, que colabora para mantener la supervivencia de los espermatozoides después de depositarse éstos en el aparato reproductor de la hembra (*Evans y Maxwell, 1990*).

El semen ha sido intensamente estudiado desde la introducción y desarrollo de la inseminación artificial. Se evalúa para determinar la utilidad del macho o la de un eyaculado en particular. Antiguamente, la infertilidad era prácticamente la única razón para evaluar la capacidad reproductora del macho; actualmente, el examen de sementales con respecto a su capacidad sexual es parte importante de la medicina veterinaria preventiva (*Sorensen, 1982; Zemjanis, 1985*).

Innumerables sistemas han sido utilizados para evaluar el semen y todos ellos han tenido un objetivo común: descubrir métodos capaces de determinar y pronosticar la fertilidad del macho (*Sorensen, 1982; Zemjanis, 1985; Samper, 1992*).

La mayoría de las pruebas empleadas para la evaluación del semen están pobremente correlacionadas con la fertilidad del espermatozoide; por lo que actualmente, no existe alguna prueba o característica seminal que por sí sola pueda servir para precisar la fertilidad del macho (*Evans y Maxwell, 1990; Samper, 1992*).

Generalidades y evaluación del acrosoma.

La espermatogénesis, es el proceso de división y diferenciación celular que conduce a la formación de los espermatozoides, comprende dos fases: 1) la espermatocitogénesis, que abarca una serie de divisiones mitóticas a partir de células germinales primordiales, seguidas de divisiones meióticas que dan como resultado el estado haploide del espermatozoide y 2) la espermiogénesis, que involucra cambios morfológicos que dan como resultado la forma característica del espermatozoide, la formación del acrosoma y la migración de las mitocondrias alrededor de la pieza media y en el origen del flagelo. Durante esta fase se desarrollan tanto los espermatozoides normales como los anormales. La espermiogénesis principia en los túbulos seminíferos y se completa en el epidídimo (*Hafez, 1987; McDonald, 1991*).

La formación del sistema acrosomal empieza con la aparición de dos o tres gránulos postacrosomales dentro del aparato reticular interno (complejo de Golgi), en el citoplasma de las espermátides, éstos forman un solo gránulo acrosomal, contenido en una vesícula acrosomal, el cual se mueve hacia la parte anterior de la membrana nuclear. La vesícula aplastada sobre el núcleo forma el capuchón cefálico, el cual sufre modificaciones que dan lugar al acrosoma. La combinación del acrosoma y del capuchón cefálico forman el sistema acrosomal (*Ramos, 1986; Hafez, 1987*), (*figura 1*).

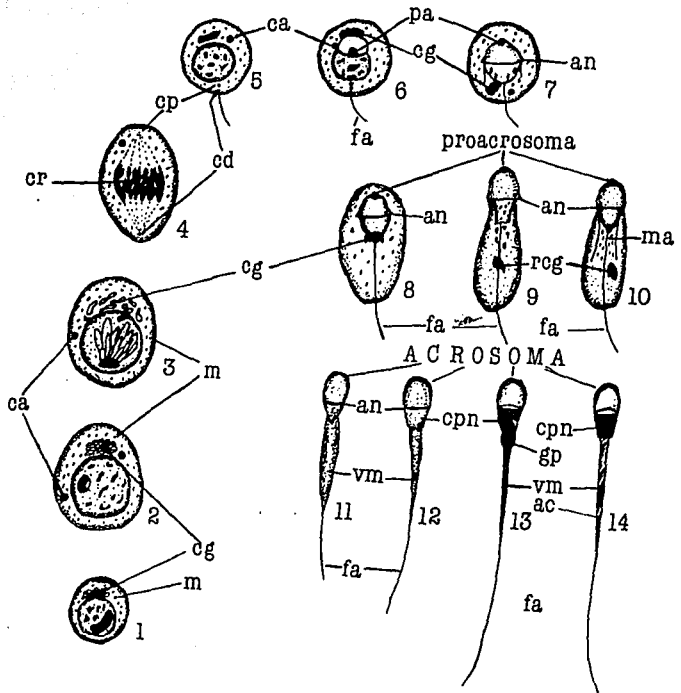


Fig. 1 Formación de un espermatozoide. Obsérvese las inclusiones celulares responsables. 1. Espermatogonia. 2. Espermatocito primario. 3. Espermatocito primario, profase temprana. 4. Espermatocito primario, anafase temprana. 5. Espermátide joven. 6-8. Espermátides. 9-11. Espermátides tardíos. 12 y 13. Espermatozoides inmaduros. 14. Espermatozoide. m. mitocondrias. ma. manchete. cg. complejo de golgi. rcg. remanente de golgi. ca. cuerpo accesorio. cr. cromosomas. cd. centriolo distal. cp. centriolo proximal. ac. anillo centriolo. fa. filamento axial. pa. proacrosoma. an. anillo nuclear o postacrosomal. vm. vaina mitocondrial. gp. gota protoplásmica. cpn. capuchón o región postacrosomal (Adaptado de McDonald, 1991).

El acrosoma consiste en una matriz de un material homogéneo dentro de un sistema de membranas, compuesto de dos partes desiguales: el segmento anterior y el segmento ecuatorial. El segmento anterior es la porción principal que rodea como una funda marginal a la cabeza del espermatozoide. El segmento ecuatorial es una depresión semilunar con una dimensión de una quinta parte del acrosoma entero en el carnero (*Hafez, 1987; Cross y Meizel, 1989*).

La región posacrosomal muestra una compleja morfología que exhibe depresiones dentadas y estriaciones. La matriz acrosomal contiene enzimas hidrolíticas tales como: acrosina, hialuronidasas, enzima penetradora de la corona y varias hidrolasas ácidas. El acrosoma y su contenido están involucrados en la penetración del espermatozoide a través de la corona radiada y la zona pelúcida del óvulo (*Ramos, 1986*).

El porcentaje de espermatozoides con morfología normal del acrosoma es comúnmente usado como un método de evaluación del semen en muchas especies (*Pintado y Pérez, 1992*).

Las anomalías del acrosoma son clasificadas como anormalidades primarias del espermatozoide y se ha demostrado que está asociado con baja fertilidad o esterilidad completa (*Wells y Awa, 1970*).

Se conoce que algunas anormalidades del acrosoma pueden ser hereditarias y algunos estudios han mostrado que el medio puede causar cambios destructivos e irreversibles en el acrosoma. También se ha señalado, que entre las posibles causas de los pobres resultados de fertilidad logrados con semen de carnero congelado-descongelado, está el daño acrosomal de los espermatozoides por el proceso de congelación-descongelación, ocasionado por la falta de protección al cambio térmico (*Rangel, 1985*).

El acrosoma se lesiona en forma gradual y comienza con un ensanchamiento de la porción anterior que luego se deteriora y desprende. Otra de las causas de daño acrosomal en espermatozoides de carnero es el almacenamiento por largo tiempo o, cuando la muestra recibe un choque frío, produciéndose una ruptura del mismo. Si bien la yema de huevo es benéfica durante el enfriamiento y la congelación, la presencia del glicerol en el diluyente produce un incremento en la supervivencia del espermatozoide; ya que reduce al mínimo el daño electrolítico a medida que se congela el agua (Ramos, 1986).

Varias tinciones han sido empleadas rutinariamente para ayudar a determinar las características morfológicas del espermatozoide (Wells y Awa, 1970). Sin embargo, pocas de estas tinciones dan una buena definición del acrosoma. Kovács y Foote (1992), diseñaron una tinción acrosomal para espermatozoides de toro, verraco y conejo, que combina un procedimiento de tinción con Azul tripán-Giemsa o Rojo Congo-Giemsa, a diferentes concentraciones y temperaturas (Anexo 2), con la cual lograron distinguir 5 clases de espermatozoides vivos y muertos en base a su integridad acrosomal, dando esta combinación de colorantes una muy buena definición del acrosoma y de la morfología de los espermatozoides.

Dilución del semen.

Debido a que los espermatozoides eyaculados no sobreviven un período largo de tiempo fuera del tracto genital, es necesario agregarles algunos agentes conservadores con los cuales se forma una suspensión que aporta nutrientes como fuente de energía, que proteja contra los efectos dañinos del enfriamiento rápido, proporcione un medio amortiguador de cambios de pH, mantenga la presión osmótica y el equilibrio electrolítico, inhiba el crecimiento bacteriano y aumente el volumen del semen para que pueda utilizarse en varias dosis de inseminación.

Los componentes básicos de un diluyente seminal son: a) una solución amortiguadora que generalmente contiene fosfatos, citratos o Tris (hidroximetil) amino-metano, en solución, b) Un medio nutritivo como yema de huevo, leche descremada, lactosa, sacarosa, fructosa, etc., y c) una solución bactericida (penicilina, estreptomycin, polimixina, etc.) (*Chagoya, 1991*).

La inseminación artificial ha contribuido al desarrollo de diluyentes efectivos para el espermatozoide bovino, lo que permite un mantenimiento prolongado, tanto a temperatura ambiente como congelado, con excelente viabilidad. En contraste, los diluyentes satisfactorios para el espermatozoide de carnero no están disponibles y la inseminación artificial en ovejas es practicada solamente con limitados diluyentes, ya que los diluyentes empleados para el espermatozoide bovino no son recomendables para el semen ovino, debido entre otras cosas, a que aunque lleven los mismos ingredientes, la concentración de éstos es diferente entre uno y otro (*Upreti, 1991*).

El diluyente a base de Tris ha sido ampliamente probado en semen de carnero y se ha comprobado que mantiene una proporción más alta de espermatozoides móviles, así como también un número mayor de espermatozoides sin cambios acrosomales que otros diluyentes que llevan como base lactosa, rafinosa, citratos, etc., (*El-Gaafary, 1990*).

Filtración del semen.

Los espermatozoides de mamíferos están caracterizados por una marcada heterogeneidad morfológica en un eyaculado. Se ha reportado que los espermatozoides muertos, dañados o anormales, tienen una influencia negativa en la fertilidad del semen, ya que tienen efectos tóxicos y líticos sobre las demás células que los acompañan en el eyaculado y consecuentemente reducen la fertilidad (*Graham y Graham, 1990; Anzar y Graham, 1993*).

En el cruzamiento natural, el moco cervical ayuda a seleccionar los espermatozoides móviles y actúa como una barrera contra los no móviles; esta selección no se lleva a cabo en la inseminación artificial. La remoción de espermatozoides muertos y dañados de un eyaculado, se ha venido haciendo en los últimos años, por medio de la filtración del semen a través de diversas sustancias como perlas de vidrio, fibra de vidrio, columnas de Sephadex, Sephadex con intercambiadores de iones, utilizadas como filtros (*Samper, 1992; Anzar y Graham, 1993*).

La filtración del semen consiste en la separación física o química de espermatozoides a través de un filtro; pasando por éste los espermatozoides móviles (vivos) y quedando retenidos los no móviles, los cuales pueden estar muertos o dañados (*Bangham y Hancock, 1955; Graham y Graham, 1990; Anzar y Graham, 1993*). Este procedimiento, además de que permite seleccionar una buena población de espermatozoides, es útil para reducir la viscosidad del semen y para remover partículas extrañas o espermatozoides aglutinados (*Paulson y Polakoski, 1977; citados por Medrano, 1993*).

El objetivo principal de la filtración del semen es seleccionar una población de espermatozoides físicamente más aptos para llevar a cabo la fertilización y sean éstos capaces de resistir el proceso de congelación-descongelación, incrementando de esta manera la eficacia de la inseminación artificial en las ovejas. Algunos reportes señalan que el semen filtrado soporta mejor la criopreservación y la descongelación que el semen sin filtrar, sin embargo, esto sólo ha sido medido en base a la motilidad espermática pre y postcongelación y son pocas las pruebas de fertilidad que se han realizado con semen filtrado (*Medrano, 1993*).

Se han utilizado una gran variedad de filtros como perlas de vidrio de diferentes diámetros, gradientes de albúmina sérica bovina, fibra de vidrio (borosilicato), geles newtonianos, geles de Sephadex, la mayoría de estos filtros

han retenido los espermatozoides no móviles pero han fallado al no poder aumentar la fertilidad (Graham y Graham, 1990).

La primera separación exitosa de espermatozoides móviles de los no móviles fué realizada pasando semen diluído a través de una capa de perlas de vidrio (Anzar y Graham, 1993).

La fibra de vidrio (borosilicato), es también uno de los primeros filtros utilizados. El primer reporte disponible en que se utilizó la fibra de vidrio como filtro para semen corresponde al que hicieron Maki-Laurila y Graham (1968), con semen de toro; desde entonces, su uso es continuo y actualmente es de los filtros más utilizados. Se ha visto que la fibra de vidrio es el filtro más efectivo para atrapar espermatozoides muertos, se ha empleado para remover restos celulares y otras partículas de deshecho presentes en el semen y además para reducir su viscosidad (Medrano, 1993).

Otro de los filtros que se ha venido utilizando en los últimos años es el Sephadex. El Sephadex es un carbohidrato especialmente tratado (*dextrina del almidón*) que al activarse (hidratarse) forma un gel compuesto por pequeñas esferas porosas, empleado para la separación de proteínas (Mertz, 1971; Lehninger, 1982), aunque en los últimos años también se ha venido empleando para separar espermatozoides móviles de no móviles, además selecciona a los espermatozoides sin daño acrosomal (acrosoma intacto) y retiene a los que presentan el acrosoma dañado (Fayemi y col., 1979; citados por Medrano, 1993; Guerrero, 1981; McDonald, 1991).

El primer reporte que se tiene de filtración de semen a través de filtros de Sephadex es el correspondiente a Graham (1976) quien propuso una prueba rápida y objetiva de filtración de semen de toro a través de columnas conteniendo

Sephadex G-15-100 soportado por fibra de vidrio. En esta prueba se llevó a cabo la separación de espermatozoides "vivos" de los "muertos" que quedaron retenidos en los filtros (*Landa y col., 1980; Samper y Crabo, 1988; Samper, 1992*).

Graham y col. (1976), reportaron su conveniencia para espermatozoides de carnero; Fayemi y col. (1976) para verraco; Heuer y col. (1983) para el búfalo de agua y Samper y col. (1991) para el caballo (*Hellander, 1992; Samper, 1992*).

Crabo y col. (1986), observaron que todos los espermatozoides que pasaron a través de los filtros de Sephadex tenían motilidad, pero no todos los espermatozoides móviles pasaban a través de éstos. También mencionan que los espermatozoides con acrosoma dañado fueron invariablemente atrapados en las columnas de Sephadex (*Samper, 1992*).

La motilidad espermática y la integridad de la membrana han sido sugeridos como algunos de los factores que influyen en el atrapamiento de las células en el filtro. Se han hecho muchos estudios empleando el Sephadex para la filtración del semen, sin embargo el mecanismo exacto para la remoción de espermatozoides muertos, anormales y dañados, es todavía desconocido (*Samper, 1992; Anzar y Graham, 1993*).

En la rata, se ha reportado la presencia de una glucoproteína sulfatada (SGP-II) presente en la membrana del espermatozoide, producida por los epitelios sustentaculares (células de Sertoli). Cuando la membrana sufre daño y queda expuesta la SGP-II, ésta se fija firmemente al Sephadex (*Samper, 1992*).

Pryor y col. (1991), filtrando a través de columnas de Sephadex los extractos de membranas espermáticas, revelaron la presencia de varias bandas que denominaron colectivamente como Proteínas Unidas al Sephadex (SBP) y encontraron que la mayor de estas bandas tiene una fuerte reactividad cruzada con una

proteína llamada clusterina, que tiene características similares a la SGP-II, ambas producidas por las células de Sertoli del carnero y rata respectivamente (*Samper y Crabo, 1988; Samper, 1992*).

La clusterina sirve como una proteína transportadora de lípidos, como proteína de agregación celular y como un activador del complemento; aunque la mayor actividad de ésta proteína es la inmunestimulación. Se puede especular que las células espermáticas que son dañadas y en las cuales queda expuesta la clusterina, debido a un efecto del diluyente o a un mal manejo del semen, pueden ser destinadas a morir quedando unidas firmemente al Sephadex (*Samper, 1992*).

Esta reacción de la clusterina con el Sephadex, presente en los espermatozoides dañados, se ha propuesto como el mecanismo por medio del cual el Sephadex separa los espermatozoides de acrosoma intacto de los espermatozoides con acrosoma dañado. A su vez, los espermatozoides retenidos se van aglomerando formando una barrera que impide el paso a otros espermatozoides, con lo cual sólo logran pasar a través del filtro aquellos espermatozoides que poseen una buena motilidad. Sin embargo, no todos los espermatozoides móviles y con acrosoma intacto, logran pasar ya que un buen porcentaje de ellos quedan retenidos en los filtros, al impedirles el paso los espermatozoides aglomerados y fijados al Sephadex (*Vyas y col., 1992*).

Por otro lado, la filtración del semen que se ha venido practicando en las últimas décadas, ha tenido resultados alentadores por lo cual se debe de seguir investigando para encontrar el mejor filtro o combinación de filtros. Además, la filtración del semen puede ser utilizada como un procedimiento de rutina en los bancos de semen para mejorar la calidad de eyaculados, inicialmente pobres, de machos valiosos; de esta manera, un mayor potencial del mejoramiento genético de los ovinos será aprovechado (*Vyas y col., 1991*).

II. OBJETIVOS.

1.- Evaluar la técnica de filtración de semen utilizando como filtros columnas de Sephadex.

2.- Seleccionar una población de espermatozoides más aptos para la fertilización, removiendo los espermatozoides muertos y anormales mediante su filtración a través de las columnas de Sephadex.

3.- Evaluar la motilidad progresiva, concentración, morfología e integridad acrosomal del semen filtrado.

4.- Evaluar la eficacia de la tinción acrosomal a base de Azul tripán al 0.25% y Giemsa al 5%, propuesta por Kovács y Foote (1992).

III. MATERIAL Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Reproducción Animal e Inseminación Artificial y en el Módulo de Ovinos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (U.N.A.M.), cuya ubicación geográfica es 19° 14' latitud Norte y 99° 14' longitud. Poniente, a 2250 msnm., en el Km 2.5 de la carretera Cuautitlán-Teoloyucan; Cuautitlán, Izcalli, Estado de México.

Material biológico:

Se obtuvieron 16 muestras de semen de un carnero adulto de la raza Suffolk, recolectando dos muestras por semana, empleando una vagina artificial. El semen se recolectó en un tubo graduado, protegido de la luz por un capuchón de hule espuma, el cual permitió también, mantener la temperatura del semen y un mejor transporte de éste al laboratorio.

Materiales y reactivos:

- Sephadex G-25-80 (lab. Sigma).- Esferas con un diámetro de 20 a 80 micrómetros para filtración en gel.

- Borosilicato (fibra de vidrio).- empleada como soporte para formar las columnas de Sephadex.

- Tubos de filtración.- Se construyeron a partir de la adaptación de las cámaras de goteo de venoclisis, las cuales se recortaron dejándoles una pequeña porción de manguera de tal manera que quedarán a manera de embudos, a las que se les insertó la llave de control de flujo, que sirvió para regular el paso del semen al ser filtrado (*figura 2*).

- Diluyente Tris-glucosa-yema de huevo.- Se utilizó para hacer la dilución 1:4 (semen:diluyente) de la muestra de semen (*Evans y Maxwell, 1990*).

- Solución de Hancock, Hancock-eosina.

- Coloraciones.- Azul Tripán y Giemsa (lab. Sigma), para teñir los frotis del semen (Kovács y Foote, 1992).

Preparación de las columnas de Sephadex.

a) Activación (hidratación) del Sephadex.- Se colocaron 2g de Sephadex seco (en polvo) en un matraz conteniendo 32ml de citrato de sodio al 2.9%; y manteniéndolo a temperatura de refrigeración (4°C) durante 24 horas se permitió que las esferas del Sephadex se hincharan, y pudiera emplearse para el montaje de las columnas de filtración.

b) Montaje de las columnas de Sephadex.- Se colocaron dos tubos de filtración en un soporte y en su interior se puso un pequeño ovillo de fibra de vidrio, la cual sirvió para contener al Sephadex y se formara la columna. Se agregó la cantidad suficiente de Sephadex hasta que alcanzó una altura de 2cm, quedando de esta forma lista para utilizarse. La cantidad de Sephadex que se utilizó por cada columna fué de 0.5g (pesado en seco). Las columnas se conservaron húmedas y tapadas todo el tiempo, a temperatura de refrigeración (4°C), hasta el momento en que se utilizaron. Por cada muestra de semen recolectada se emplearon dos columnas de filtración (*figura 2*).

c) Citrato de sodio al 2.9%. - Se utilizó para hidratar el Sephadex, para realizar las diferentes diluciones utilizadas en la evaluación de la motilidad y para regular a una temperatura de 37°C las columnas de Sephadex, momentos antes de efectuar la filtración del semen.

d) Diluyente Tris-glucosa-yema de huevo.- se prepararon 2 tubos conteniendo cada uno 4 ml de diluyente y se colocaron en baño maría a 37°C; a partir de uno de ellos se hizo la dilución 1:4, semen:diluyente y, al otro tubo se le agregó

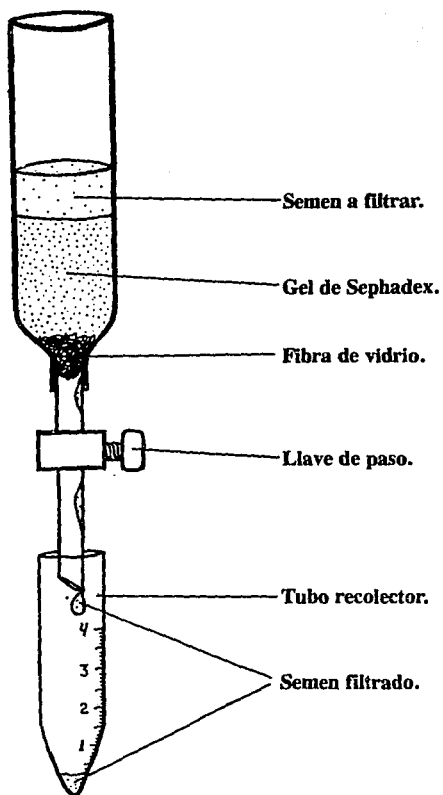


Fig. 3. Columna de Sephadex empleada en la filtración de semen de carnero.

un poco de colorante verde natural para alimentos con la finalidad de teñirlo y diferenciarlo del anterior al efectuar la filtración del semen (*Anexo 1*).

Fraciones recolectadas.

Como resultado de la filtración del semen se recolectaron 3 fracciones diferentes por cada columna, identificadas de la siguiente forma:

Fracción 1.- representa la primera fracción filtrada a través de Sephadex, del semen diluido 1:4 en diluyente Tris-glucosa-yema de huevo.

Fracción 2.- que corresponde a una segunda fracción de semen diluido y filtrado a través de las columnas de Sephadex.

Fracción 3.- o tercera fracción de semen filtrado, correspondiente a un lavado de las columnas con citrato de sodio.

Los espermatozoides que quedaron atrapados dentro de las columnas de filtración fueron considerados como "*fracción retenida*".

De cada fracción filtrada y del semen fresco sin filtrar se hicieron diluciones con citrato de sodio al 2.9%, para evaluar su motilidad progresiva.

Evaluación del semen:

Examen macroscópico. Una vez que se obtuvo el semen, se realizó el examen macroscópico, el cual se efectuó antes de las pruebas de motilidad. Este examen incluyó la valoración visual del eyaculado en relación al volumen recolectado y, al aspecto y presencia de material extraño.

Después de este rápido examen, el semen se colocó a 37°C en baño María para su conservación, después se procedió a realizar el examen microscópico de la motilidad.

Motilidad progresiva.- La motilidad progresiva se estimó por observación

directa al microscopio a partir de la dilución 1:100 (v/v) en el caso del semen fresco sin filtrar (*Zemjanis, 1985*).

Filtración del semen:

A fin de efectuar la filtración del semen, se montaron las columnas de Sephadex ya preparadas en un soporte, a temperatura ambiente (22°C). Antes de realizar la filtración se agregó a cada columna 1ml de citrato de sodio para poner el filtro a una temperatura de 37°C y evitar un posible choque térmico del semen.

Después se agregó a cada columna 1ml de semen diluido, permitiendo que el citrato de sodio que previamente ocupaba la columna se fuera desplazando y, cuando el semen diluido comenzó a fluir por la manguera del tubo de filtración, la llave de paso fué cerrada impidiendo la salida del semen ya filtrado.

Enseguida se adicionó a cada columna 1ml de diluyente teñido, sin espermatozoides, con la finalidad de mantener húmeda la columna de filtración ya que al irse filtrando el semen diluido, su lugar lo va ocupando el diluyente agregado. Se anotó el volumen recolectado de la primera fracción de semen filtrado (*fracción 1*) y se colocaron los tubos recolectores en baño María a 37°C.

Para recolectar la segunda fracción filtrada (*fracción 2*), se adicionó a cada columna de filtración 1ml de citrato de sodio al 2.9% para que desplazara al diluyente teñido y al semen diluido que quedara en las columnas, se anotó el volumen recolectado y se colocaron los tubos en el baño María.

De las primeras dos fracciones filtradas se hicieron diluciones, correspondiendo la dilución 1:500 (v/v) a la fracción 1 y una dilución de 1:1000 (v/v) a la fracción 2 y se determinó su motilidad progresiva.

Para recolectar la fracción 3 (lavado de la columna), se agregó paulatina-

mente citrato de sodio hasta completar 3ml por columna de filtración, mismos que fueron recolectados. De esta fracción, no se midió el volumen recolectado y la motilidad progresiva se determinó sin dilución previa.

Concentración espermática:

Se evaluó por medio de la cámara de Neubauer, en una dilución 1:200 (v/v) para el semen fresco, 1:500 (v/v) para la fracción 1 y 1:1000 (v/v) para la fracción 2. En las fracciones 3 y retenida no se efectuó esta prueba. La dilución se hizo con la solución conservadora Hancock-eosina.

Morfología espermática (examen de semen teñido):

Para efectuar este examen se hicieron frotis de cada fracción. Se empleó la tinción acrosomal propuesta por *Kovács y Foote (1992)* para espermatozoides de toro, verraco y conejo. Para la realización de este trabajo se eligió la combinación de Azul Tripán al 0.25% y Giemsa al 5%, a temperatura ambiente (22°C) con un tiempo de exposición al colorante de Giemsa de 20 a 24 horas.

Previo a la elaboración de las laminillas, se realizó un lavado de las muestras con solución de Hancock sin colorante, para quitar el excedente de eosina. Este lavado consistió en poner 0.5ml de la muestra en un tubo, agregarle 2ml de solución de Hancock y centrifugarla a 3000rpm. durante 10 minutos; se decantó el sobrenadante y se resuspendieron los espermatozoides agregándole al tubo 0.3ml de solución de Hancock.

Preparación de los frotis:

De cada fracción se prepararon 2 laminillas, para ésto se combinaron 3 gotas de la muestra con 3 gotas del colorante Azul Tripán y se hicieron los frotis identificándolos individualmente; se dejaron secar a temperatura ambiente y una

vez secos, se fijaron utilizando el fijador compuesto de: a) 86% de HCl 1.0N, b) 14% de solución de formaldehído (37% p/p) y c) 0.2g de rojo neutro. Posteriormente se sumergieron durante 20 a 24 horas en el colorante de Giemsa al 5%, a temperatura ambiente (22°C en promedio). Transcurrido este tiempo, las laminillas fueron sacadas del colorante, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar (*Anexo 2*). La evaluación se realizó en un microscopio Rossbach de campo claro, (1000x).

Se examinaron 100 espermatozoides de cada laminilla. En algunos casos debido a que las muestras estaban muy diluídas, para realizar el conteo de los 100 espermatozoides se requirió de las dos laminillas. De cada espermatozoide examinado se determinó su morfología e integridad acrosomal. La integridad del acrosoma de los espermatozoides se evaluó siguiendo la clasificación propuesta por *Kovács y Foote (1992)*.

Análisis estadístico:

La información se analizó por medio de Análisis de Varianza. Se utilizaron como covariables los valores del semen fresco y prueba de Tukey para diferencia de medias. Para los datos expresados en porcentaje se utilizó la transformación al arcoseno (*Steel y Torrie, 1980*).

IV. RESULTADOS.

En los *cuadros 1 y 2*, se presentan las variables estudiadas y sus valores generales observados en la evaluación del semen fresco, éstos se anotan como referencia para los valores obtenidos en la evaluación del semen diluido y filtrado a través de las columnas de Sephadex.

Motilidad progresiva.

La motilidad progresiva observada en el semen filtrado a través de Sephadex fué de $78.4 \pm 1.9\%$ para la fracción 1 y $71.8 \pm 1.9\%$ para la fracción 2. En la fracción 3 se observó un $50.7 \pm 1.9\%$, estos valores son significativamente diferentes entre sí ($P < 0.01$). (*Cuadro 3*).

Morfología espermática.

En el *cuadro 4*, se muestran los resultados correspondientes a la morfología espermática observada en las diferentes fracciones. A este respecto, en la fracción 1 se observó un mayor porcentaje de espermatozoides normales ($74.8 \pm 1.4\%$), en relación a las fracciones 2 y 3 en las que se observó $45.5 \pm 1.4\%$ y $13.4 \pm 1.4\%$ respectivamente ($P < 0.0001$). Sin embargo, la fracción 3 no fué diferente a la fracción retenida que presentó $11.0 \pm 1.3\%$ de estas células.

En cuanto a las anomalías espermáticas, la fracción 1 presentó el porcentaje más bajo de anomalías primarias, $5.5 \pm 0.7\%$, siendo este valor diferente al de las otras fracciones ($P < 0.0003$), en tanto que las fracciones 2 y 3 no fueron diferentes entre sí ya que presentaron $9.6 \pm 0.7\%$ y $9.5 \pm 0.7\%$ respectivamente. La fracción retenida presentó el valor más alto, $17.8 \pm 0.8\%$, cifra que resultó diferente en su relación con las demás fracciones ($P < 0.0003$).

La fracción 1, con $19.6 \pm 1.5\%$, presentó el porcentaje más bajo de espermatozoides con anomalías secundarias, a diferencia de las fracciones 2, 3 y retenida que presentaron $45.0 \pm 1.5\%$, $77.2 \pm 1.5\%$ y $71.1 \pm 1.5\%$ respectivamente ($P < 0.006$).

Integridad Acrosomal.

En la *figura 3*, se muestran cinco clases de espermatozoides en base al estado de su acrosoma según Kovács y Foote (1992):

- 1) espermatozoides con acrosoma intacto.
- 2) con acrosoma hinchado.
- 3) con acrosoma dañado.
- 4) espermatozoides sin acrosoma y,
- 5) sin acrosoma ni anillo postacrosomal.

Estas características del acrosoma se registraron tanto en espermatozoides normales como en aquellos que presentaron anomalías primarias y secundarias.

En el *cuadro 5*, se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de los distintos estados del acrosoma de los espermatozoides en las diferentes fracciones sin considerar su morfología.

Espermatozoides con acrosoma intacto.- La fracción 1 presentó el mayor porcentaje de éstos, $73.6 \pm 1.1\%$, contra $25.5 \pm 1.1\%$ de la fracción 2, $2.1 \pm 1.1\%$ de la fracción 3 y $16.9 \pm 1.2\%$ de la fracción retenida. Todos estos valores son diferentes entre sí ($P < 0.0001$).

Espermatozoides con acrosoma hinchado.- El porcentaje más bajo de éstos lo presentó la fracción 1 con $4.7 \pm 0.7\%$, seguida de la fracción 3 con $5.8 \pm 0.7\%$, no existiendo diferencia significativa entre ellas. La fracción retenida, con

16.7 ± 0.7% presentó el valor más alto, superando a la fracción 2 que presentó 8.4 ± 0.7% (P<0.007).

Espermatozoides con acrosoma dañado.- En la fracción 3 se registró el porcentaje más bajo de estas células, 13.1 ± 1.3%; seguida de la fracción 1 con 19.5 ± 1.3%, mientras que la fracción 2 presentó 40.6 ± 1.3%, valor que fué superado por la fracción retenida que presentó la cifra más alta, 46.4 ± 1.5%, existiendo diferencia significativa entre todos los valores (P<0.001).

Espermatozoides sin acrosoma.- Las fracciones 2 y 3 mostraron un elevado porcentaje de estos espermatozoides 23.2 ± 1.5% y 22.3 ± 1.5%, respectivamente, no existiendo diferencia significativa entre ellas. La fracción 1 presentó el porcentaje más bajo, 1.9 ± 1.5%, mientras que en la fracción retenida se encontró un 7.8 ± 1.3%, siendo estos valores diferentes entre sí y las primeras fracciones (P<0.001).

Espermatozoides sin acrosoma ni anillo postacrosomal.- Dentro de ésta característica, los valores más bajos, 0.3 ± 1.4% y 2.2 ± 1.4% correspondieron a las fracciones 1 y 2, la fracción 3 con 56.9 ± 1.4%, mostró el porcentaje más alto, en tanto que en la fracción retenida se observó el 13.3 ± 1.2% de estas células, siendo los resultados significativamente diferentes entre sí (P<0.0001).

Morfología espermática e integridad acrosomal.

El análisis de la integridad acrosomal de los espermatozoides se desarrolló en dos fases). En la primera, se evalúa el estado acrosomal de los espermatozoides en base a la clasificación de Kovács y Foote (1992), sin tomar en cuenta la morfología de los espermatozoides (cuadro 5) y, en la segunda, se evaluó la morfología espermática junto con la integridad acrosomal de cada uno de los 100 espermatozoides observados en cada laminilla (cuadros 6, 7 y 8).

Espermatozoides normales:

En el *cuadro 6*, se muestra la relación entre los espermatozoides morfológicamente normales y su estado acrosomal, observado en las diferentes fracciones.

A este respecto, se observó que la fracción 1 presentó el porcentaje más alto de *acrosomas intactos*, $60.3 \pm 1.0\%$. En cambio la fracción 3 y la retenida presentaron los valores más bajos, $0.2 \pm 1.0\%$ y $2.4 \pm 1.0\%$ respectivamente. La fracción 2 tuvo un valor medio de $13.9 \pm 1.0\%$. Este valor es diferente a los anteriores ($P < 0.0001$).

En cuanto a *acrosomas hinchados*, la fracción 2 presentó el porcentaje más alto, $4.6 \pm 0.4\%$ y la 3 el más bajo, $1.6 \pm 0.4\%$, mientras que en las fracciones 1 y retenida, se observó $2.9 \pm 0.4\%$ y $3.0 \pm 0.4\%$ respectivamente. Excepcionalmente la relación entre las fracciones 1 y retenida, la relación entre las otras fracciones fué diferente ($P < 0.02$).

De los que presentaron el *acrosoma dañado*, se observó el valor más alto en la fracción 2, $17.1 \pm 0.8\%$; la fracción 1 también presentó una cifra elevada, $10.9 \pm 0.8\%$ ($P < 0.0001$). Los valores más bajos se encontraron en la 3 y la retenida, $2.1 \pm 0.8\%$ y $3.2 \pm 0.8\%$.

Entre los *espermatozoides sin acrosoma*, la fracción 2 presentó el valor más alto, $9.1 \pm 0.6\%$. Los valores más bajos, $1.1 \pm 0.6\%$ y $1.2 \pm 0.5\%$, correspondieron a las fracciones 1 y retenida. La fracción 3 presentó $3.3 \pm 0.6\%$, siendo este valor significativamente diferente a los demás ($P < 0.006$).

En relación a los *espermatozoides sin acrosoma ni anillo postacrosomal*, la fracción 3 con $6.1 \pm 0.4\%$, presentó el porcentaje más alto, mientras que en la retenida se observó $1.9 \pm 0.3\%$ ($P < 0.006$). En la fracción 2 se registró $0.7 \pm$

0.4% y en la fracción 1 el $0.1 \pm 0.4\%$ que correspondieron a los valores más bajos.

Espermatozoides con anomalías primarias:

En el *cuadro 7* se muestran los resultados de la relación entre los espermatozoides con anomalías primarias y la morfología acrosomal en las diferentes fracciones.

Acrosoma intacto.- La fracción 1 presentó el porcentaje más alto con $3.1 \pm 0.3\%$, en tanto que la 3 careció de estas células. Las fracciones 2 y retenida presentaron $2.0 \pm 0.3\%$ y $2.9 \pm 0.3\%$ respectivamente, existiendo diferencia significativa entre estos últimos valores y los primeros ($P < 0.01$).

Acrosoma hinchado.- La fracción retenida presentó $1.5 \pm 0.2\%$, en tanto que las demás fracciones tuvieron valores inferiores al 0.8% ($P < 0.03$).

Acrosoma dañado.- Para esta característica, la fracción retenida, con $8.9 \pm 0.5\%$, tuvo el valor más elevado de estas células, en tanto que los valores más bajos se observaron en la 3, $1.7 \pm 0.3\%$, y la 1, $1.8 \pm 0.3\%$, que no fueron diferentes entre sí. La 2 presentó el $4.0 \pm 0.3\%$, existiendo diferencia significativa en relación a las otras fracciones ($P < 0.0001$).

Sin acrosoma.- Las fracciones 2 y 3 presentaron los valores más altos, $2.4 \pm 0.3\%$ y $2.2 \pm 0.3\%$ respectivamente. La fracción 1 presentó el $0.1 \pm 0.3\%$, correspondiendo al valor más bajo. En tanto que la retenida tuvo $1.0 \pm 0.3\%$ ($P < 0.03$).

Sin acrosoma ni anillo postacrosomal.- El valor más alto correspondió a la fracción 3 con $4.9 \pm 0.3\%$ y el más bajo a la 1 que careció de estas células, mientras que la 2 sólo presentó el $0.3 \pm 0.3\%$ y la retenida, $3.6 \pm 0.3\%$ ($P < 0.002$).

Espermatozoides con anomalías secundarias:

En el cuadro 8, se muestran los resultados obtenidos en la evaluación del estado acrosomal de los espermatozoides con anomalías secundarias observados en las diferentes fracciones.

Acrosoma intacto. Para esta característica, las fracciones 1, 2 y retenida, presentaron valores similares (media 10.5%). En cambio la fracción 3 presentó un valor significativamente diferente, $1.9 \pm 0.7\%$ ($P < 0.0001$).

Acrosoma hinchado. La fracción retenida presentó el porcentaje más alto, $12.0 \pm 0.5\%$; la 1 el más bajo, $1.4 \pm 0.3\%$, y las fracciones 2 y 3 presentaron $3.0 \pm 0.3\%$ y $3.6 \pm 0.3\%$ respectivamente ($P < 0.001$).

Acrosoma dañado. Dentro de esta característica, la fracción retenida presentó el valor más alto, $34.5 \pm 1.1\%$, seguida de la fracción 2 con $19.4 \pm 0.9\%$, en tanto que las fracciones 1 y 3 tuvieron $6.7 \pm 0.9\%$ y $9.2 \pm 0.9\%$ respectivamente, existiendo diferencia significativa entre estos valores ($P < 0.04$).

Sin acrosoma.- El porcentaje más alto correspondió a la fracción 3 con $16.7 \pm 1.1\%$ y el más bajo a la fracción 1, $0.6 \pm 1.1\%$. Las fracciones 2 y retenida presentaron $11.7 \pm 1.1\%$ y $5.7 \pm 0.9\%$ respectivamente, encontrándose diferencia estadística ($P < 0.002$).

Sin acrosoma ni anillo postacrosomal. En este renglón, la fracción 3 presentó un valor muy elevado, $45.6 \pm 1.2\%$, en comparación a las demás fracciones que presentaron: $7.1 \pm 1.0\%$, la retenida; $1.2 \pm 1.2\%$, la fracción 2, y $0.1 \pm 1.2\%$ para la fracción 1, que prácticamente careció de estas células ($P < 0.0001$).

Concentración espermática:

La concentración espermática fué en promedio de 5594 ± 146 millones de espermatozoides por mililitro, para el semen fresco, mientras que para la frac-

ción 1 se obtuvo un promedio de 3481 ± 148 y en la fracción 2, 1745 ± 148 millones. Estos valores son significativamente diferentes entre sí ($P < 0.0001$), (Cuadro 9).

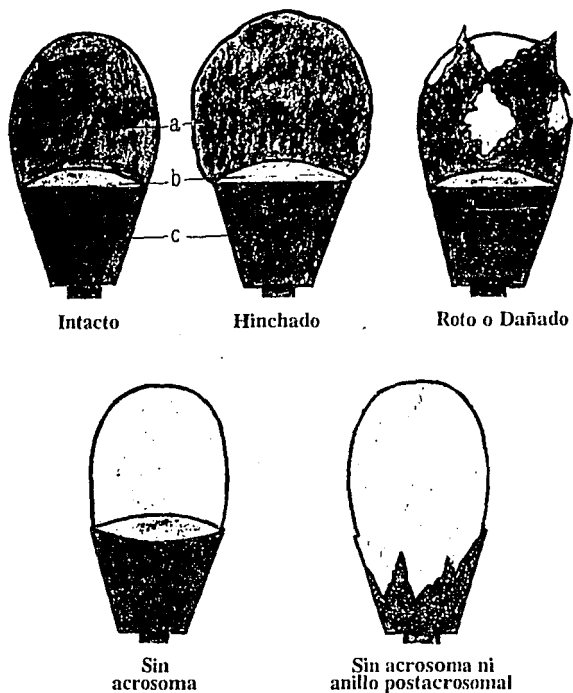


Fig. 2. Los 5 diferentes estados del acrosoma observados en espermatozoides de carnero. Tinción: Azul tripan-Giemsa. a. Acrosoma. b. Anillo nuclear o postacrosomal. c. Región o capuchón postacrosomal (Adaptado de Kovács y Foote, 1992).

Cuadro 1. Variables estudiadas y valores iniciales promedio
Evaluación de semen fresco sin filtrar.

Tratamiento:	Media \pm e.e.
Concentración espermática (millones de esp./ml).	5594 \pm 146
32 Motilidad progresiva	57.9 \pm 1.9
Morfología espermática:	
Espermatozoides normales	63.2 \pm 1.3
Anormalidades primarias	8.1 \pm 0.8
Anormalidades secundarias	29.0 \pm 1.5

**Cuadro 2. Morfología espermática e integridad acrosomal
Semen fresco sin filtrar.**

	Sin evaluar morfología	Espermatozoides normales	Anormalidades primarias	Anormalidades secundarias
Estado del acrosoma.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.
Intacto	44.5 ± 1.2	33.5 ± 1.0	2.0 ± 0.3	9.0 ± 0.7
Hinchado	10.6 ± 0.7	5.6 ± 0.3	0.6 ± 0.2	4.5 ± 0.4
Dañado	35.1 ± 1.4	18.8 ± 0.8	4.3 ± 0.5	12.0 ± 1.1
Sin acrosoma	8.5 ± 1.2	4.9 ± 0.5	1.1 ± 0.2	2.4 ± 0.9
Sin acrosoma ni anillo	1.2 ± 1.2	0.2 ± 0.3	0.0 ± 0.3	1.0 ± 1.0

Nota: En la primera columna no se evaluó la morfología de los espermatozoides, ésta sí es evaluada en las siguientes tres columnas, las cuales son derivación de la primera.

Cuadro 3. Motilidad progresiva de las diferentes fracciones.

Tratamiento	Media \pm e.e.
fracción 1	78.4 \pm 1.9 a*
fracción 2	71.8 \pm 1.9 b
fracción 3	50.7 \pm 1.9 c

Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa ($P < 0.01$)

Cuadro 4. Morfología espermática de las diferentes fracciones (Promedios).

	Espermatozoides normales	Anormalidades primarias	Anormalidades secundarias
35 Tratamiento:	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.
fracción 1	74.8 ± 1.4 a	5.5 ± 0.7 a	19.6 ± 1.5 a
fracción 2	45.5 ± 1.4 b	9.6 ± 0.7 b	45.0 ± 1.5 b
fracción 3	13.4 ± 1.4 c	9.5 ± 0.7 b	77.2 ± 1.5 c
frac. ret.	11.0 ± 1.3 c	17.8 ± 0.8 c	71.1 ± 1.5 d

Letras diferentes en las columnas indican diferencia significativa ($P < 0.05$).

Cuadro 5. Estado acrosomal observado en las diferentes fracciones.

	Acrosoma intacto	Acrosoma hinchado	Acrosoma dañado	Sin acrosoma	Sin acrosoma ni anillo postacros.
Tratamiento:	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.
fracción 1	73.6 ± 1.1 a	4.7 ± 0.7 a	19.5 ± 1.3 a	1.9 ± 1.5 a	0.3 ± 1.4 a
fracción 2	25.5 ± 1.1 b	8.4 ± 0.7 b	40.6 ± 1.3 b	23.2 ± 1.5 b	2.2 ± 1.4 a
fracción 3	2.1 ± 1.1 c	5.8 ± 0.7 a	13.1 ± 1.3 c	22.3 ± 1.5 b	56.9 ± 1.4 b
frac. ret.	16.9 ± 1.2 d	16.7 ± 0.7 c	46.4 ± 1.5 d	7.8 ± 1.3 c	13.3 ± 1.2 c

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas (P<0.05)

Cuadro 6. Estados acrosomales de los espermatozoides normales (porcentajes promedio).

Tratamiento:	Acrosoma intacto	Acrosoma hinchado	Acrosoma dañado	Sin acrosoma	Sin acrosoma ni anillo postacros.
fracción 1	60.3 ± 1.0 a	2.9 ± 0.4 a	10.9 ± 0.8 a	1.1 ± 0.6 a	0.1 ± 0.4 a
fracción 2	13.9 ± 1.0 b	4.6 ± 0.4 b	17.1 ± 0.8 b	9.1 ± 0.6 b	0.7 ± 0.4 a
fracción 3	0.2 ± 1.0 c	1.6 ± 0.4 c	2.1 ± 0.8 c	3.3 ± 0.6 c	6.1 ± 0.4 b
frac. ret.	2.4 ± 1.0 c	3.0 ± 0.3 a	3.2 ± 0.8 c	1.2 ± 0.5 a	1.9 ± 0.3 c

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 7. Estados acrosomales de los espermatozoides con anomalías primarias.
(Porcentajes promedio).

	Acrosoma intacto	Acrosoma hinchado	Acrosoma dañado	Sin acrosoma	Sin acrosoma ni anillo postacros.
58 Tratamiento:	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.
fracción 1	3.1 ± 0.3 a	0.4 ± 0.2 a	1.8 ± 0.3 a	0.1 ± 0.3 a	0.0 ± 0.3 a
fracción 2	2.0 ± 0.3 b	0.8 ± 0.2 a	4.0 ± 0.3 b	2.4 ± 0.3 b	0.3 ± 0.3 a
fracción 3	0.0 ± 0.3 c	0.6 ± 0.2 a	1.7 ± 0.3 a	2.2 ± 0.3 b	4.9 ± 0.3 b
frac ret.	2.9 ± 0.3 a	1.5 ± 0.2 b	8.9 ± 0.5 c	1.0 ± 0.3 c	3.6 ± 0.3 c

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 8. Estados acrosomales de los espermatozoides con anomalías secundarias.
(Porcentajes promedio).

	Acrosoma intacto	Acrosoma hinchado	Acrosoma dañado	Sin acrosoma	Sin acrosoma ni anillo postacros.
39 Tratamiento:	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.	Media: e.e.
fracción 1	10.7 ± 0.7 a	1.4 ± 0.3 a	6.7 ± 0.9 a	0.6 ± 1.1 a	0.1 ± 1.2 a
fracción 2	9.6 ± 0.7 a	3.0 ± 0.3 b	19.4 ± 0.9 b	11.7 ± 1.1 b	1.2 ± 1.2 a
fracción 3	1.9 ± 0.7 b	3.6 ± 0.3 b	9.2 ± 0.9 c	16.7 ± 1.1 c	45.6 ± 1.2 b
frac. ret.	11.4 ± 0.7 a	12.0 ± 0.5 c	34.5 ± 1.1 d	5.7 ± 0.9 d	7.1 ± 1.0 c

Letras diferentes en las columnas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 9. Concentración espermática promedio.
Semen fresco y fracciones filtradas.

	Media \pm e.e.
Semen fresco	5594 \pm 146 a
Fracción 1	3481 \pm 148 b
Fracción 2	1745 \pm 148 c

Letras diferentes en la columna indican diferencia significativa ($P < 0.0001$)

V. DISCUSION.

En este trabajo, de filtración de semen de carnero a través de columnas de Sephadex, se realizó la comparación de los resultados obtenidos en las fracciones filtradas 1, 2, y 3, así como de la fracción retenida, tomando como base los valores encontrados en la evaluación del semen fresco y los resultados obtenidos en trabajos similares efectuados con semen de carnero, bovino u otras especies.

Motilidad progresiva.

En comparación con el semen fresco, las fracciones 1 y 2 presentaron un incremento del 35.4 y 24.0% respectivamente, mientras que en la fracción 3 se observó una disminución del 12.4%, que pudo deberse al lavado efectuado en las columnas, por lo cual junto con los espermatozoides móviles filtrados, fueron acarreados muchos de los espermatozoides muertos y/o dañados que habían sido retenidos en los filtros.

El incremento en el porcentaje de motilidad progresiva observado, no significa que aumentó el número de espermatozoides móviles dentro del eyaculado, sino que debido al efecto de la filtración del semen, quedan retenidos dentro de las columnas los espermatozoides no móviles, dando por resultado que en el semen filtrado, aunque tiene una menor concentración espermática que el eyaculado original, la mayoría de los espermatozoides filtrados poseen una buena motilidad debida al efecto de selección efectuada por el filtro de Sephadex.

Landa y col. (1980), reportan una motilidad progresiva de 55% para semen entero de carnero filtrado a través de Sephadex; este valor es inferior al observado en el presente trabajo en las fracciones 1 y 2, 78.4 y 71.8% respectivamente. En otros trabajos, también con semen de carnero diluido en leche o diluyente a base de Tris, filtrado a través de fibra de vidrio, *Medrano (1993)* reporta resultados inferiores a los observados en el presente trabajo,(48.7%).

Se ha visto que la motilidad del espermatozoide está notablemente influenciada tanto por el diluyente utilizado como por los parámetros físicos involucrados en el procesamiento del semen. *El-Gaafary (1990)*, evaluando semen de ovino diluido reporta que el diluyente a base de Tris presentó una motilidad progresiva mayor (77.7%) que otros diluyentes que llevan como base Lactosa (68.0%) o Rafinosa (67.8%). El resultado obtenido con diluyente a base de Tris es similar al encontrado en este trabajo (78.4% en la fracción I), pero con el semen sin filtrar.

En otras especies, *Trejo y col. (1986)* observaron una motilidad progresiva de 54.0% en semen caprino filtrado a través de fibra de vidrio, siendo este resultado inferior a los encontrados en este trabajo.

Otros trabajos, empleando semen bovino, también indican un aumento en la motilidad progresiva como resultado de la filtración. *Crabo y col. (1986, citados por Samper, 1992)*, observaron en semen de toro filtrado a través de Sephadex que todos los espermatozoides que pasaron a través de los filtros eran móviles, pero no todas las células móviles lograban pasar a través de éstos. *Chinnaiya y col. (1988)* reportan un aumento en la motilidad espermática de 61% a 71, 81 y 82%, para tres tipos de columnas de Sephadex utilizadas, siendo estos resultados similares a los encontrados en el presente trabajo. Mientras que *Vyas y col (1991 y 1992)* reportan un incremento de alrededor de 14.0%, en semen de bovino filtrado a través de Sephadex, con respecto al semen testigo.

Por su parte, *Anzar y Graham (1993)*, observaron que el Sephadex con intercambiadores de iones, tales como el Di-etil-amino-etano-52 (DEAE, cargado positivamente) y Carboxi-metil-52 (CM, cargado negativamente) celulosas, posee una mayor eficacia para remover los espermatozoides inmóviles que el Sephadex solo. Después de filtrar semen bovino, observaron un aumento en la motilidad

progresiva de 50.1 y 53.7% para los filtros de Sephadex con intercambiadores de iones contra 37.4% del testigo que solamente contenía Sephadex.

Los resultados anteriores muestran que con el empleo del Sephadex en columnas de filtración, el porcentaje de motilidad progresiva de un eyaculado es incrementado al quedar retenidos dentro del filtro los espermatozoides no móviles (dañados y/o muertos), logrando pasar la mayor parte de los espermatozoides móviles.

Morfología espermática:

Aún cuando el semen eyaculado, de cualquier especie, es heterogéneo en su población de espermatozoides, no debe poseer más de 15 a 18% de espermatozoides anormales (*Anzar y Graham, 1993*).

En el presente trabajo, se encontraron valores muy altos en relación al parámetro anterior, ya que el semen fresco presentó 37.1% de anomalías espermáticas, correspondiendo el 8.1% a anomalías primarias y el 29.0% a secundarias. Este elevado porcentaje de anomalías se pudo deber, entre otros factores a efectos estacionales del carnero, lo cual alteró la calidad y concentración espermática de los eyaculados, debido a que los muestreos se hicieron entre los meses de primavera y verano (*Cameron, 1984; McDonald, 1989*).

Los niveles plasmáticos de la hormona luteinizante (LH), aumentan después de la exposición a días de corta duración y disminuyen después de días de larga duración. Tanto la temperatura como la duración del día afectan la producción total del semen y su calidad. Las altas temperaturas ambientales superiores a 27°C tienden a deprimir la calidad del semen y pueden dar como resultado "esterilidad veraniega" (*Cameron, 1984; Hafez, 1987; Fraser y Stamp, 1989; McDonald, 1989; Evans y Maxwell, 1990*).

Estos valores, del semen fresco, se redujeron con la filtración del semen, pero solamente en la fracción 1 que presentó un 25.1% de espermatozoides anormales, correspondiendo el 5.5% a anomalías primarias y el 19.6% a secundarias. En contraste, en la fracción 2 se observó un aumento en el porcentaje de anomalías espermáticas. Este aumento pudo deberse a la selectividad del filtro de Sephadex, ya que éste retuvo la mayor parte de los espermatozoides anormales, muertos y/o dañados, de los cuales una parte se recuperó en la fracción 2 al ser arrastrados por el diluyente sin semen que le fué agregado al filtro para recolectar esta fracción.

Algunos reportes de filtración a través de Sephadex señalan una disminución de espermatozoides anormales de 7 a 14.4 unidades porcentuales, en semen de toro y búfalo (*Chinnaiya y col., 1988; Vyas y col., 1991 y Chauhan y col., 1993*). En el presente trabajo, se obtuvo una disminución de 12 unidades porcentuales. Por otro lado, *Medrano (1993)*; logró sólo una reducción de 3.6 unidades porcentuales filtrando en borosilicato.

Integridad acrosomal.

En el presente trabajo, en semen de carnero, se logró identificar las 5 clases descritas por *Kovács y Foote (1992)* para espermatozoides muertos tomando como base su estado acrosomal. Sin embargo, los colores descritos por ellos para el acrosoma y la región postacrosomal fueron diferentes a los observados en el presente trabajo. En base a esto, se encontró que la fracción 1 tuvo el porcentaje más elevado de espermatozoides con acrosoma intacto, en comparación con el semen fresco. En la fracción 2 se observó un bajo porcentaje de acrosomas intactos, debido a que la mayor parte de éstos se recuperó en la fracción 1. Se puede afirmar que la fracción 2 estuvo compuesta en una cuarta parte por espermatozoides de buena calidad que lograron atravesar el filtro y las otras tres cuar-

tas partes por espermatozoides muertos, anormales o dañados que primeramente fueron retenidos por el filtro y que fueron desplazados de éste, por el diluyente. Otra vez, estos valores son diferentes a los encontrados por *Medrano (1993)* quien reporta 52% de espermatozoides con acrosoma intacto.

Tanto el porcentaje reportado por *Medrano* como los valores encontrados en el presente trabajo son inferiores a los reportados por *Anzar y Graham (1993)* en semen de toro, quienes lograron incrementar a más del 90% los espermatozoides con acrosoma intacto, después de filtrar el semen en columnas de *Sephadex* con intercambio de iones, en comparación del 84% cuando utilizaron *Sephadex* sólo.

La fracción 3 registró el porcentaje más elevado de espermatozoides que no presentaron acrosoma ni anillo postacrosomal, estando representada esta fracción, casi en su totalidad, por espermatozoides que quedaron retenidos en los filtros, los cuales posteriormente fueron arrastrados por el citrato de sodio al efectuar el lavado de las columnas de filtración.

La fracción retenida presentó los valores más elevados de espermatozoides con acrosoma hinchado y acrosoma dañado, también presentó un alto porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto. Estos resultados indican que al quedar retenidos los espermatozoides muertos o dañados dentro de las columnas de filtración, éstos forman una barrera que impide el paso a otros espermatozoides, aún y cuando éstos no tengan alteración morfológica o daño acrosomal, por lo cual dentro de la fracción retenida se encontraron espermatozoides con todo tipo de características.

A este respecto, *Landa y col. (1980)* mencionan que la retención de espermatozoides de carnero o bovino dentro de los filtros fué independiente del por-

centaje de espermatozoides con acrosoma intacto. *Crabo y col. (1986, citados por Samper, 1992)* al hacer la filtración del semen a través de columnas de Sephadex, observaron que los espermatozoides con acrosoma dañado generalmente quedaron atrapados en el filtro. Estos hallazgos se confirmaron en el presente trabajo, ya que aproximadamente el 83% de los espermatozoides con alguna alteración acrosomal, fueron retenidos en los filtros.

Influencia del diluyente en la calidad espermática.

Se ha visto que los diluyentes tienen un papel importante en la conservación de la integridad espermática. *Bustamante y Valencia (1981, citados por Rangel, 1985)*, encontraron que el diluyente a base de Tris-yema de huevo es suficiente para proteger la integridad acrosomal durante el proceso de congelación, mas no la motilidad progresiva. También observaron mayor motilidad progresiva y un mayor número de células con acrosoma normal cuando congelaron semen de carnero con diluyente a base de Tris-yema de huevo-glicerol. A su vez, *El-Gaafary (1990)* menciona que el daño acrosomal fue mayor en el semen diluido en lactosa y rafinosa. *Medrano (1993)*, reporta que no hubo diferencias en la integridad acrosomal para el semen de carnero diluido en Tris o leche. En el presente trabajo, aunque no se evaluó la eficacia del diluyente a base de Tris-glucosa-yema de huevo, se vió que éste mantuvo una buena motilidad espermática y no alteró la morfología ni la integridad acrosomal de los espermatozoides de carnero.

A este respecto, *Peña y Melesio (1984)* evaluaron daños acrosomales en el semen fresco y diluido de carneros. Para el semen fresco reportan un 4.6% de anomalías acrosomales, para el diluido en Tris, glucosa y lactosa reportan 6.0, 5.9 y 7.3% respectivamente. Ellos no reportan por separado los porcentajes de cada anomalía acrosomal.

Morfología espermática e integridad acrosomal.

En relación al estado acrosomal de los espermatozoides normales tenemos que la fracción 1 presentó la mejor calidad espermática, superando al semen fresco y a las otras fracciones. Este mejoramiento se debe a la remoción de espermatozoides anormales y dañados efectuada con la filtración del semen. Sin embargo, esta fracción, aún conteniendo la mayor cantidad de espermatozoides normales, presentó 15.0 unidades porcentuales de anomalías acrosomales.

La fracción 2, presentó una calidad espermática inferior al semen fresco, presentando en relación a las demás fracciones, los valores más altos de acrosomas hinchados, dañados y sin acrosoma. Sin embargo, en relación al semen fresco presentó valores similares en lo que se refiere a acrosomas hinchados y dañados. Estas observaciones sugieren la existencia de una posible interferencia en la reacción acrosoma dañado-Sephadex, causada por el diluyente teñido, el cual pudo impedir la fijación del acrosoma dañado de los espermatozoides al gel de Sephadex.

En base a los resultados de las fracciones 3 y retenida, se puede inferir que el lavado del filtro, con citrato de sodio, desprendió del Sephadex, en mayor grado, a los espermatozoides sin acrosoma que aquellos que tenían acrosoma o restos de él. De lo anterior se puede sugerir que existen dos tipos de uniones entre el acrosoma dañado y el Sephadex; la primera, determinada por la presencia del acrosoma dañado, restos de él y/o enzimas acrosomales (unión fuerte), y la segunda debida a la unión de la cabeza del espermatozoide, sin acrosoma, y posiblemente algunas enzimas acrosomales (unión débil). Esta última con susceptibilidad a ser interrumpida cuando se efectúa el lavado del filtro.

En la fracción retenida, se observaron todo tipo de características al ser

bloqueado su paso a través del filtro, tanto por la barrera formada por los espermatozoides retenidos, como por el mismo filtro. Se puede inferir que la formación de esta barrera también está influenciada por el tipo de unión que se da entre los acrosomas dañados y el Sephadex, persistiendo en esta fracción la "unión fuerte" que no es separada por el lavado del filtro.

Siguiendo con la relación morfología espermática-integridad acrosomal, el mayor porcentaje registrado de espermatozoides que presentaron anomalías primarias-acrosoma intacto, y anomalías secundarias-acrosoma intacto se observó en la fracción 1, misma que también presentó la cifra más baja de células sin acrosoma y careció de aquellos que no presentaron acrosoma ni anillo posacrosomal. A diferencia de ésta, la fracción 2 presentó valores elevados de espermatozoides con acrosomas dañados o sin acrosoma y un bajo porcentaje de acrosomas intactos. En la fracción 3, los espermatozoides anormales con acrosoma intacto fueron muy escasos o nulos, en cambio, ésta fracción registró los valores más elevados de espermatozoides anormales sin acrosoma y sin acrosoma ni anillo postacrosomal. Estos resultados sugieren que los filtros de Sephadex poseen una elevada selectividad hacia los espermatozoides con acrosomas lesionados, independientemente de la morfología espermática; y esto se muestra aún más con los resultados de la fracción retenida en la que predominan los espermatozoides anormales con acrosomas dañados.

Concentración espermática.

La concentración promedio de espermatozoides recuperados se reduce notablemente cuando éste es filtrado a través de columnas de Sephadex, porque el filtro retiene la mayor parte de los espermatozoides anormales, muertos o dañados.

La muestra de semen filtrada contiene una menor concentración espermática que la muestra original, pero a diferencia de ésta, los espermatozoides que contiene son normales, aumentando la calidad de la muestra. *Landa y col. (1980)* encontraron que solamente un 22% de espermatozoides de carnero pasaron a través de una columna de Sephadex cuando el semen fué diluído en leche entera homogeneizada, en comparación con 52% cuando fué diluído en Tris. Estos resultados son inferiores a los encontrados en el presente trabajo.

En semen de toro filtrado a través de Sephadex, *Lodhi y Crabo (1984)*, reportan un 55.0% de recuperación espermática posfiltración, siendo este resultado inferior al observado en este trabajo.

Por su parte, *Vyas y col. (1991)*, reportan un 67% de espermatozoides recuperados cuando el semen se filtró a través de columnas de Sephadex, siendo este resultado similar al encontrado en el presente trabajo.

En relación a los filtros de Sephadex con intercambio iónico, *Anzar y Graham (1993)* encontraron que aunque éstos mejoraron la calidad de las muestras de semen, la recuperación posfiltración de espermatozoides siempre es menor. Aunque ellos reportan la recuperación mas alta en filtros de Sephadex sólo, siendo por lo tanto superior al encontrado en este trabajo y a otros resultados reportados por varios investigadores.

VI. CONCLUSIONES.

La calidad del semen con respecto a su motilidad progresiva, porcentaje de anomalías espermáticas e integridad acrosomal, se mejora significativamente mediante su filtración a través de columnas de Sephadex.

La filtración del semen en Sephadex permite obtener una población de espermatozoides, de mejor calidad, aunque en menor concentración que el eyaculado original, mediante la remoción de los espermatozoides muertos, anormales y dañados.

La tinción de *Kovács* y *Foot*, resultó eficaz para teñir y diferenciar la morfología espermática y los distintos estados acrosomales de los espermatozoides de carnero.

El diluyente Tris-glucosa-yema de huevo mantuvo una buena motilidad progresiva en los espermatozoides de carnero.

Se recomienda recolectar únicamente la primera fracción, porque las otras fracciones presentan en general, una baja calidad espermática.

VII. LITERATURA CONSULTADA.

ANZAR, M. y GRAHAM, E.F. 1993. Filtration of bovine semen. I. Development of a Sephadex ion-exchange filter. *Anim. Rep. Sci.* 31: 187-195.

ANZAR, M. y GRAHAM, E.F. 1993. Filtration of bovine semen II. Factors affecting the recovery rate of spermatozoa. *Anim. Rep. Sci.* 31: 197-204.

BANGHAM, A.D. y HANCOCK, J.L. 1955. A new method for counting live and dead bull spermatozoa. *Nature.* 176: 656.

BUSTAMANTE, G., GARCIA, D. y SANCHEZ, L. G. 1990. Evaluación de la fertilidad de semen ovino descongelado y depositado intrauterinamente por laparoscopia. Memorias del Tercer Congreso Nacional de Producción Ovina. AMTEO. Tlaxcala, México. 153-155.

CAMERON, A.W.N. 1984. Semen quality, quantity and flock fertility. En *Reproduction in sheep*. Lindsay, D.R. y Pearce, D.T. eds. Aust. Acad. Sci. y Aust. Wool Corp. Canberra, Australia: 79-85.

CHAGOYA, B.R.A. 1991. Manual de prácticas para el laboratorio de Reproducción Animal e Inseminación Artificial. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. México. pp. 108.

CHAUHAN, S.S., MOHAN, G., KUMAR, S. y SAHNI, K.L. 1993. Comparative evaluation of various grades of sephadex for improving the quality of buffalo semen. *Indian Journal of Animal Sciences* 63 (3): 346-350.

CHINNAIYA, G.P., SARMA, P.V. y REDDY, O. 1988. Standardisation of semen filtration technique through different media to improve its quality. *Indian Journal of Animal Reproduction.* 10 (1): 56-60.

CROSS, N.L. y MEIZEL, S. 1989. Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm. *Biology of Reproduction*, 41: 635-641.

CUADRA, S.C., CHANG, G.J., APONTE, B.M., PEREZ, P.H. y TORAL, S.J. 1990. Resultados de dos años con inseminación artificial utilizando semen fresco en ovinos. Memorias del tercer congreso nacional de producción ovina. AMTEO. Tlaxcala, México. 149-152.

DE LUCAS, T.J. 1984. Manejo reproductivo del rebaño. Memorias del curso bases de la cría ovina. Toluca, México.

DERIVAUX, J. 1976. Reproducción de los animales domésticos. segunda edición, ed. Acribia. España. 144-166.

EL-GAAFARY, M.N. 1990. A diluent for freezing of ram semen. *Indian Journal of Animal Sciences* 60 (7): 769-772.

EVANS, G. 1988. Current topics in artificial insemination of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 41 (1): 103-116.

EVANS, G. y MAXWELL, W.M.C. 1990. **Steve Salamon. Inseminación artificial de ovejas y cabras.** Acribia, España. pp. 192.

FRASER, A. y STAMP, J.T. 1989. **Ganado ovino. Producción y enfermedades.** Ediciones Mundi-Prensa, España. 78-79.

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. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. México. pp. 21.

GUTIERREZ, A.J.R. 1992. **Efecto del tratamiento hormonal con GnRH, HCG y Testosterona en corderos púberes sobre la calidad espermática y el área de los túbulos seminíferos y del epidídimo.** Tesis de Licenciatura; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. (U.N.A.M.). México. pp. 40.

GUTIERREZ, T.P., VALLEJO, O.E. y TREJO, G.A. 1990. **Comparación entre sementales de la fertilidad del semen congelado en ovinos.** Memorias del tercer congreso nacional de producción ovina. AMTEO. Tlaxcala, México. 156-158.

HAFEZ, E.S.E. 1987. **Semen evaluation. In: Reproduction in farm animals.** E.S.E. Hafez (ed). Lea y Febiger. Filadelfia, EUA. 455-480.

HELLANDER, J.C. 1992. **Current practical use of a glass-wool/Sephadex filtration technique of frozen stallion semen.** Acta Vet. Scand. Suppl. 88: 67-70.

KOVACS, A. y FOOTE R.H. 1992. **Viability and acrosome staining of bull, boar, and rabbit spermatozoa.** Biotechnic & Histochemistry. 67 (3): 119-124.

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.

LEHNINGER, A.L. 1982. **Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular.** Ediciones Omega. España: 161-186.

LODHI, L.A. y CRABO, B.G. 1984. **Filtration of bull spermatozoa through Sephadex, polyacrilamide, silica gel and glass-wool in the presence and absence of two sugars.** Proc: 10th. Int. Cong. Ani. Reprod. and Artif. Insem. Illinois. EUA. Vol. II: 59.

MCDONALD, L.E. 1991. **Endocrinología veterinaria y reproducción.** cuarta ed. Interamericana-McGraw-Hill. México: 223-285.

MEDRANO, H.J.A. 1993. **Congelación de semen de carnero diluido en Tris y en leche, filtrado a través de borosilicato.** Tesis. Maestría en Produc-

ción Animal (ovinos y caprinos). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México. pp. 93.

MERTZ, E.T. 1971. **Bioquímica**. Publicaciones Cultural. México: 91-92.

MUÑOZ, L.M. 1986. **Comparación de la fertilidad de semen congelado en ovejas con estro natural y sincronizadas con progestágenos**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. México. pp. 34.

PEÑA, V. M. y MELESIO, A. F. 1984. **Comparación de la motilidad progresiva y anomalías de los espermatozoides de carnero de la raza Merino Australiano, antes y después de la congelación en pellets en tres diferentes diluentes**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M. México. pp. 22

PEREZ, E.D.A. 1984. **Elaboración de un cuadro básico de anomalías espermáticas en ovinos**. Tesis de Licenciatura; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. (U.N.A.M.). México. pp. 51.

PINTADO, S.B. y PEREZ, L.B. 1992. **Effect of Glutaraldehyde concentration and fixative temperature on the number of spermatozoa with normal acrosomes in goat semen**. Theriogenology, 38: 557-564.

RAMOS, G.R.M. 1986. **Comparación de 3 métodos para determinar las anomalías acrosómicas en semen congelado de carnero**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.

RANGEL, N.A. 1985. **Comparación de la motilidad progresiva del semen de carnero Merino Australiano antes y después de la congelación en pajillas, centrifugado y sin centrifugar, utilizando dos clases de diluentes**. Tesis de Licenciatura; Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. U.N.A.M.. México. pp. 25.

SAMPER, J.C. y CRABO, B.G. 1988. **Filtration of capacitated stallion spermatozoa through filters containing glass-wool and/or Sephadex**. 11th. Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Dublin, Ireland. 3: 294.

SAMPER, J.C. 1992. **Evaluation of cryopreserved semen: An alternative assay**. Acta Vet. Scand. Suppl. 88: 59-65.

SORENSEN, A.M. 1982. **Reproducción Animal. principios y prácticas**. McGraw-Hill, México. p.125-143.

STEEL, R.G. y TORRIE, J.H. 1980. **Principles and procedures of statistics. A biometrical approach**. 2nd. edn., McGraw-Hill, EUA. pp. 622.

TREJO, G.A. 1986. **Aumento en la producción de corderos**. Ganadero. 11 (4). México. 64-76.

TREJO, G.A., ESQUIVEL, C.A., RODRIGUEZ, M.A. y MARTINEZ, C.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.

UPRETI, G.C.; OLIVER, J.; MUNDAY, R. y SMITH, J.F. 1992. **Effect of physical parameters on ram spermatozoal motility.** Proc. New Zealand Society of Ani. Prod. Vol. 52: 251-254.

VALLEJO, O.E., GUTIERREZ, T.P. y TREJO, G.A. 1990. **Comparación de la fertilidad en ovejas con estro sincronizado utilizando PGF 2α o MAP-HCG inseminadas con semen congelado.** Memorias del tercer congreso nacional de producción ovina. Tlaxcala, México. 173-176.

VYAS, S., DHAMF, 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.

VYAS, S.; MOHAN, G.; DHAMF, A.J. y SAHNI, K.L. 1992. **Effect of filtration through Sephadex and glass-wool on the quality and freezability of semen of crossbred bulls.** Indian J. Ani. Sci. 62 (4): 341-343.

WELLS, M.E. y AWA, O. A. 1970. **New technique for assessing acrosomal characteristics of spermatozoa.** J. Dairy Sci. 53 (2): 227-232.

ZEMJANIS, R. 1985. **Reproducción Animal. Diagnóstico y técnicas terapéuticas.** LIMUSA, México. p.147-174.

ANEXO I.

Composición del diluyente de congelación para diluir semen de
carnero en un sólo paso.

Proporción de dilución, 1:4 (una parte de semen + 4 partes
de diluyente).

Ingredientes:	Cantidad:
- Tris (Hidroximetil)amino-metano.	3.634 g.
- Glucosa	0.500 g.
- Acido Cítrico (Monohidrato)	1.990 g.
- Yema de huevo fresca	15.000 g.
- Glicerol	5.000 g.
- Penicilina	100,000 UI.
- Estreptomicina	100 mg.
- Agua destilada c.b.p.	100 ml.

Tomado de Evans y Maxwell (1990).

IX. ANEXO II.

Tinción y soluciones fijadoras.

Las tinciones de Azul tripán y rojo congo, que sirven para pruebas de viabilidad, consisten en:

- Azul tripán al 0.25% (Lab. sigma), en cloruro de sodio al 0.81%, o
- Rojo congo al 0.18% (Lab. sigma) en cloruro de sodio al 0.81%.

La solución de azul tripán, se mantiene estable durante mucho tiempo. El colorante rojo congo, se debe preparar a diario a partir de una solución "madre" de rojo congo al 1.8% en agua destilada en una dilución 1:9 con cloruro de sodio al 0.9%. El pH de ambos colorantes debe ser neutro (6.9- 7.2).

El fijador estuvo compuesto de: 1) 86 ml de HCl plus 1.0 N. 2) 14 ml de solución de formaldehído (37% v/v). y 3) 0.2g de rojo neutro (Lab. sigma).

La solución se debe sobresaturar con el rojo neutro y poner a un pH de 0.4. El fijador se mantiene estable por mucho tiempo y puede ser utilizado repetidamente.

La tinción para acrosoma, se prepara a partir de una solución "madre" del colorante Giemsa al 5%, aunque puede emplearse desde el 2.5 al 7.5% (Lab. sigma), en agua destilada (pH 6.9) preparada en fresco antes de utilizarla.

Procedimiento de tinción.

A temperatura de cuarto se mezcla igual cantidad de gotas de semen diluído (filtrado o sin filtrar) y azul tripán o rojo Congo e inmediatamente se preparan los frotis, distribuyendo la mezcla uniformemente en todo el portaobjetos.

Las laminillas son secadas al aire, en una posición cercana a la vertical, manteniendo el final del frotado del portaobjetos en papel absorbente. El tiempo de secado puede ser afectado por la temperatura ambiente y la humedad.

La fijación de los frotis se realiza en un recipiente conteniendo la solución rojo neutro-HCl-formaldehído (fijador), sumergiéndolos durante 2 a 5 minutos.

Se enjuagan las laminillas por ambos lados, utilizando agua corriente y un enjuagado final con agua destilada.

Posteriormente se sumergen en colorante Giemsa al 5%, durante 20 a 24 horas, para obtener un teñido satisfactorio.

Variantes: se puede teñir con una solución de Giemsa al 2.5%, a una temperatura de 40°C, dejando sumergidas las laminillas durante toda la noche, o en Giemsa al 7.5% por 2 a 4 horas.

Los frotis se enjuagan con agua destilada corriente, después se mantienen en un recipiente con agua destilada por otros 2 minutos, seguidos de un segundo enjuague.

Después se dejan secar al aire y se pueden examinar utilizando los objetivos de 40x o 100x.

Notas técnicas.

En el presente trabajo, evaluando espermatozoides muertos de carnero, se logró identificar claramente las 5 clases de espermatozoides descritas por Kovács y Foote (1992), en base al estado de su acrosoma.

Los resultados revelan que, la región postacrosomal de los espermatozoides muertos se tiñen de un color azul oscuro, violeta oscuro o morado.

El anillo postacrosomal es de color rosa a rojo.

La parte anterior de la cabeza de los espermatozoides con acrosoma intacto se aprecia de un color rosa intenso o lavanda oscuro, de aspecto uniforme y de contorno bien delimitado.

La parte anterior de la cabeza de los espermatozoides con acrosoma hinchado es de un color rosa pálido en algunos casos y rosa intenso en otros, la parte anterior de la cabeza se ve aumentada de tamaño a manera de un capuchón, además en algunos espermatozoides se aprecian una especie de gránulos o bandas de color café oscuro.

En los espermatozoides con acrosoma dañado, se aprecia como éste se va desprendiendo, formando cuarteaduras como si se estuviera despellejando.

El color de la parte anterior de la cabeza de los espermatozoides sin acrosoma es rosa pálido o lavanda pálido; se confunden fácilmente con los espermatozoides de acrosoma intacto; lo que los diferencia es la intensidad de los colores y la forma del límite posterior del anillo postacrosomal, que en los espermatozoides con acrosoma intacto es recto y bien formado y en los que carecen de acrosoma, el límite es en forma de arco y en ocasiones no está bien delimitado.

En espermatozoides que no presentan acrosoma ni anillo postacrosomal, la región postacrosomal está incompleta, y en ocasiones puede faltar totalmente.