

44



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

FILTRACIÓN DE SEMEN
DE CARNERO
A TRAVÉS DE BOROSILICATO
EN DOS DILUENTES CON
GLICEROL Y DOS
PESOS DEL FILTRO

289567

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTAN
GENARO HERNÁNDEZ JIMÉNEZ
JUAN ROGELIO JUÁREZ LEAL

ASESORES:
PhD. JOSÉ ALFREDO MEDRANO HERNÁNDEZ
M.V.Z. M.C. ROSALBA SOTO GONZÁLEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2001.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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

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

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

"Filtración de semen de carnero a través de borosilicato en
 dos diluyentes con glicerol y dos pesos del filtro".

que presenta el pasante: Genaro Hernández Jiménez
 con número de cuenta: 3557248-9 para obtener el TÍTULO de
 Médico Veterinario Zootecnista.

Considerando que dicho trabajo 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 27 de Octubre de 2000

PRESIDENTE	M.V.Z. Rubén Trejo Rodríguez	
VOCAL	Dra. Citlali V. Hernández Valle	
SECRETARIO	M.V.Z. M.C. Rosalba Soto González	
PRIMER SUPLENTE	M.V.Z. Miguel Angel Pérez Razo	
SEGUNDO SUPLENTE	M.V.Z. Ma. Luz Montero Villeda	



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS

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

ASUNTO VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

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

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

"Filtración de semen de carnero a través de borosilicato en dos diluentes con glicerol y dos pesos del filtro".

que presenta el pasante: Juan Rogelio Juárez Leal
con número de cuenta: 3557142-0 para obtener el TITULO de
Médico Veterinario Zootecnista

Considerando que dicho trabajo 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 HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Mex., a 27 de Octubre de 2008

PRESIDENTE M.V.Z. Rubén Trejo Rodríguez

VOCAL Dra. Citlali V. Hernández Valle

SECRETARIO M.V.Z. M.C. Rosaiba Soto González

PRIMER SUPLENTE M.V.Z. Miguel Angel Pérez Razo

SEGUNDO SUPLENTE M.V.Z. Ma. Luz Montero Villalón

DEDICATORIAS.

A mis padres : (qepd) por darme el precioso don de la vida.

**A mis Hermanos: Celso, Rene(qepd), Memo, Nila, Jaime, Juan, Martha, Luis, Saúl, Rosario.
Por el apoyo que siempre me han brindado.**

**A mis sobrinos: Rosita, Celso, Aby, Elvia, Renesín, Manolo, Javi, Angélica, Brianda,
Nestor, Gus, Anel, Fanny, Jessy y en especial a Dany. Para ellos con todo el cariño del mundo.**

A mis cuñados: Javier, Nacho.

**A mis cuñadas: Rosa, Elvia, Verónica, Elvira, Edith. Para que sigan guiando a mis sobrinos
para que triunfen en la vida.**

A mis amigos: Gerardo, Ricardo, Rogelio, José Luis. Por su apoyo desinteresado.

**A mis asesores de tesis. Alfredo, Rosalba, por su paciencia y atinados consejos para la
realización de esta tesis ¡gracias!**

A el honorable jurado por su enriquecimiento a esta tesis.

CUANDO FUI A LA UNIVERSIDAD.....

Cuando fui a la universidad no sabía que...

No importaba a qué hora fuera mi primera clase, siempre tenía sueño.

Que podía madurar tanto sin darme cuenta.

Que en la universidad todavía se hacen aviones de papel.

Que todos los relojes de la universidad tienen una hora diferente.

Que no importaba haber sacado puros 10's desde Kinder.

Que cuando sabes todo, puedes reprobar un examen.

Que cuando no sabes nada, a veces sacas 10 en el examen.

Que la mayoría de mi aprendizaje lo hice fuera de las aulas de clase.

Que la amistad es más que jugar fútbol y salir a fiestas.

Que las materias que creía inútiles, si sirven.

Que mis maestros podían ser amigos.

Que podía sentirme solo a pesar de estar rodeado de miles de personas.

Que las 24 horas del domingo equivalen a una hora del lunes.

Que de ahí son los mejores amigos.

Que fueron mis mejores años.

AGRADECIMIENTOS.

A mis padres por darme la vida , por esforzarse para que yo obtuviese una profesión

A mis hermanos gracias por el apoyo incondicional durante mis estudios en la facultad.

Gracias a mis profesores por su enseñanza dentro de las aulas.

A mis asesores gracias por brindarme parte de su tiempo y conocimientos para la realización de esta tesis.

Gracias a todos mis amigos por su apoyo moral.

A dios le doy gracias por darme la capacidad y sabiduría para alcanzar todas mis metas.

Rogelio.

INDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVOS	10
3. -MATERIALES Y MÉTODOS	11
4. RESULTADOS.....	14
5. DISCUSION	23
6. CONCLUSIONES	26
7. LITERATURA CONSULTADA	27

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la filtración de semen de carnero en borosilicato, sobre la motilidad progresiva, las anomalías primarias y secundarias así como la integridad del acrosoma. Se utilizaron doce eyaculados mezcla de tres carneros recolectados por el método de la vagina artificial. Las muestras se diluyeron en partes iguales (dilución 1:1) en un diluyente a base de leche con 8% de glicerol y otro a base de tris-yema de huevo con 5% de glicerol, y se asignaron a los siguientes tratamientos:

Tratamiento 1.1. dilución 1:1 de semen y diluyente de leche, filtrados a través de una pipeta Pasteur con 30 mg de borosilicato.

Tratamiento 1.2. dilución 1:1 de semen y diluyente de leche, filtrados a través de una pipeta Pasteur con 50 mg de borosilicato.

Tratamiento 1.3. dilución 1:1 de semen y diluyente de leche sin filtrar.

Tratamiento 2.1. dilución 1:1 de semen y diluyente de tris-yema de huevo, filtrados a través de una pipeta con 30 mg de borosilicato.

Tratamiento 2.2. dilución 1:1 de semen y diluyente de tris-yema de huevo, filtrados a través de una pipeta Pasteur con 50 mg de borosilicato.

Tratamiento 2.3. dilución 1:1 de semen y diluyente de tris-yema de huevo sin filtrar.

La filtración se realizó en una estufa de cultivo a 37°C durante 5 minutos, el semen fue recuperado en tubos graduados de recolección. Después de la filtración se registraron las siguientes variables: volumen, motilidad progresiva; del semen filtrado se hizo en una dilución 1:100 en citrato de sodio al 2.9%. Para evaluar las anomalías espermáticas y la integridad acrosomal, se utilizó una dilución 1:200 en solución de Hancock-Eosina. La concentración se evaluó en la cámara de Neubauer. La integridad del acrosoma se evaluó en un microscopio de contraste de fases con un aumento total de 1000X. Para evaluar la motilidad de los espermatozoides retenidos en el filtro, se lavó éste con 2 ml de citrato de sodio al 2.9%.

El análisis estadístico se realizó en base a un diseño factorial 2 X 2, con los factores diluyente y peso del filtro. Los datos expresados en porcentaje fueron transformados al arcoseno antes de realizar el análisis de varianza respectivo.

El porcentaje de espermatozoides motiles de las muestras filtradas fue de 42.5% y 45.0%, y fue superior al de la muestra sin filtrar, 32.5% ($P < 0.03$). Este aumento en el porcentaje de espermatozoides motiles se puede deber a que la mayoría de los que son retenidos en los filtros son inmóviles por lo que en la población resultante el número de motiles es mayor. Sin embargo entre los diluyentes no hubo diferencia.

La motilidad progresiva de la muestra diluida en Tris filtrada en 30 mg (41.7%) fue similar a la muestra filtrada en 50 mg (45.8%) y a la muestra sin filtrar (30.0%); sin embargo se encontró una diferencia significativa ($P < 0.04$) entre los dos últimos tratamientos. En relación al diluyente de leche no hubo diferencia entre las muestras filtradas y sin filtrar.

Se observó que la muestra diluida en Tris tuvo un mayor porcentaje de espermatozoides normales, 87.6%, que la diluida en leche, 81.8% ($P < 0.02$), y en relación a los filtros no existieron diferencias. En cuanto al porcentaje de anomalías primarias, se observó que la muestra diluida en leche tuvo una mayor cantidad, 2.0%, que la muestra diluida en Tris, 1.4% ($P < 0.04$). En relación a los filtros no hubo diferencia significativa en el porcentaje de anomalías primarias. También se observó que la muestra diluida en leche presentó una

mayor cantidad de anomalías secundarias, 16.2%, que la muestra diluida en Tris 11.1% ($P < 0.004$). En relación a los filtros no se encontraron diferencias para esta variable.

No existieron diferencias significativas en el porcentaje de acrosomas normales ocasionada por el diluyente o por la filtración. En relación a las alteraciones del acrosoma observadas, tampoco existieron diferencias atribuibles al diluyente empleado o a la filtración. También se observó que las muestras diluidas en Tris y en leche filtradas en 30 y 50 mg de borosilicato no presentaron diferencias significativas en relación a las muestras sin filtrar.

La motilidad promedio de la fracción retenida en los filtros de las muestras diluidas en Tris fue 28.8% y para las diluidas en leche fue 27.5%. Estos valores no son diferentes entre sí. Tampoco existieron diferencias causadas por los filtros.

El porcentaje de espermatozoides normales encontrados después de la filtración y en cada diluyente no fueron diferentes. En cuanto al porcentaje de anomalías primarias y secundarias en la fracción retenida en los filtros, no se observaron diferencias significativas debidas al efecto del diluyente.

INTRODUCCION.

La filtración del semen consiste en la separación física de los espermatozoides motiles y no motiles. Inicialmente, la técnica de filtración se reportó como un método para separar a los espermatozoides vivos y muertos (Bangham y Hancock, 1955; Maki-Laurila y Graham, 1968). Por lo general, la separación resulta exitosa, fraccionando al semen en una porción de espermatozoides motiles que pasan a través del filtro y otra porción de espermatozoides inmóviles y/o muertos que son retenidos, independientemente del filtro utilizado.

Se ha sugerido practicar la filtración del semen para seleccionar una población de espermatozoides más aptos para la fertilización, para concentrarlos, para reducir la viscosidad del semen, y para remover partículas extrañas o espermatozoides aglutinados (Paulson y Polakoski, 1977; Marmor *et al.*, 1980; Lechtzin *et al.*, 1991; Vyas *et al.*, 1991). La finalidad principal de la filtración del semen es tratar de aumentar su resistencia al proceso de congelación-descongelación, sin embargo también se ha utilizado 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 filtrado soporta mejor la criopreservación y subsecuente descongelación que el no filtrado (Fjallabrant y Ackerman, 1969., citados por Krishnamurthi *et al.*, 1983; Paulson y Polakoski, 1977; Chandrahasan *et al.*, 1986); sin embargo, esta resistencia solo se ha medido en base a la motilidad pre y poscongelación, y son pocas las pruebas de fertilidad realizadas con semen filtrado. Por otro lado, Shalgi *et al.* (1981), señalan que los espermatozoides filtrados, aunque mostraron excelente morfología y motilidad, su capacidad funcional se afectó negativamente. Esto es, no fueron 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 *in vitro* obtenida fue la más baja de ese trabajo.

Los primeros filtros utilizados fueron las perlas de vidrio de diferente diámetro, y la fibra de vidrio (borosilicato). Salamon (1987), reportó que con el uso de los filtros anteriores, la separación de los espermatozoides motiles e inmóviles fue incompleta o errática. Asimismo, Marmor *et al.* (1980), reportaron que la fibra de vidrio no seleccionó 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 el proceso de filtración, y que más adelante se tratarán. No obstante, la fibra de vidrio es el filtro más utilizado y actualmente sigue en uso (Krishnamurthi *et al.*, 1983; Chandrahasan *et al.*, 1986; Vyas *et al.*, 1991). Otra alternativa, también muy utilizada desde hace varios años, el sephadex, además de separar a los espermatozoides motiles de los no motiles, permite el paso de aquellos con acrosoma intacto y retiene los alterados (Fayemi *et al.*, 1979; Lodhi y Crabo, 1984; Samper *et al.*, 1988; Vyas *et al.*, 1991). Sin embargo, Landa *et al.* (1980), concluyeron que la filtración de semen en sephadex no está relacionada directamente al porcentaje de espermatozoides motiles en la muestra de semen, o a la integridad de la membrana acrosómica. Por otro lado, Graham y Graham (1990), observaron grandes diferencias en el porcentaje de espermatozoides motiles antes y después de la filtración, mientras que en la morfología se vieron solo pequeñas diferencias.

Considerando que la mayoría de los reportes de filtración de semen son favorables a esta práctica, cabe recomendar que se continúe experimentando con la combinación de los filtros más utilizados, fibra de vidrio-sephadex, como lo recomiendan Samper y Crabo (1988).

Además, recientemente se ha reportado que el procedimiento de filtración no es dañino para los espermatozoides y los procesos subsecuentes de capacitación espermática, reacción acrosomal, fijación a la zona pelúcida y fertilización *in vitro* tampoco se afectan (Lechtzin *et al.*, 1991). Finalmente, siguiendo las recomendaciones de Vyas *et al.* (1991), la filtración de semen puede ser utilizada como un procedimiento de rutina en bancos de semen para mejorar la calidad de los eyaculados, inicialmente pobres, de machos valiosos.

El semen de toros fue el primero, según los reportes disponibles, en ser filtrado (Bangham y Hancock, 1955). Quizá, por ser la especie en que la inseminación artificial ha alcanzado su mayor desarrollo y difusión. La mayor cantidad de los reportes disponibles sobre filtración, son con semen de bovino, y se han utilizado en orden de importancia los siguientes filtros: fibra de vidrio, sephadex, y perlas de vidrio (Krishnamurthi *et al.*, 1983; Lodhi y Crabo, 1984; Chandrahasan *et al.*, 1986; Graham y Graham, 1990). En porcinos y equinos, especies en que la congelación afecta severamente al semen, la filtración se ha realizado principalmente con sephadex, buscando favorecer la motilidad progresiva y el porcentaje de acrosomas intactos (Fayemi *et al.*, 1979; Samper y Crabo, 1988; Samper *et al.*, 1988).

Las especies de animales de laboratorio, cuyo semen se ha filtrado, incluyen al ratón (McGrath *et al.*, 1977; Lechtzin *et al.*, 1991), la rata (Shalgi *et al.*, 1981), y al conejo (Guerrero, 1981). En estas especies se han hecho pruebas de fertilidad *in vitro* principalmente, para probar el semen filtrado. En pequeños rumiantes, son muy escasos los reportes. Landa *et al.* (1980), filtraron semen de ovino en sephadex, y Trejo *et al.* (1986), semen de caprino en borosilicato. La finalidad principal de los trabajos anteriores ha sido mejorar la criosobrevivencia y criointegridad del semen. En contraste, Salamon (1987), recomienda la filtración de semen de carnero a la descongelación.

El primer reporte disponible, en que se usó la fibra de vidrio como filtro para semen, lo hicieron Maki-Laurila y Graham (1968), con semen de toro. Desde entonces, se ha usado continuamente sobre todo en bovinos (Krishnamurthi *et al.*, 1983; Chandrahasan *et al.*, 1986; Vyas *et al.*, 1991). Comparando el filtro de fibra de vidrio contra sephadex, poliacrilamida, y gel de sílice, Lodhi y Crabo (1984) encontraron que el primero fue el más efectivo en atrapar espermatozoides muertos, y que el porcentaje de espermatozoides que pasó a través de este filtro fue estadísticamente menor que en los otros tres filtros. Krishnamurthi *et al.* (1983), observaron que el 61% de los espermatozoides retenidos en el filtro estaban muertos. El semen de caprino también ha sido filtrado en borosilicato obteniéndose una importante reducción en el porcentaje de anormalidades secundarias (Trejo *et al.*, 1986).

El peso del filtro parece ser la variable más importante cuando se usa borosilicato. Paulson y Polakoski (1977), recomiendan utilizar de 20 a 60 miligramos de borosilicato en los filtros. Los reportes disponibles, manejan de 20 a 100 miligramos, con buenos resultados (Vyas *et al.*, 1991). La altura de la columna que forma el filtro varía de 2 a 6 centímetros (Lodhi y Crabo, 1984; Chandrahasan *et al.*, 1986), y el diámetro de la fibra, que reportan Fukui *et al.* (1983), es de 10 a 12 micrómetros. La mayoría de los reportes sobre filtración señalan la dilución previa del semen. Los diluentes a base de Tris-yema de huevo o Test-yema de huevo se han utilizado frecuentemente, asimismo el citrato de sodio y la leche descremada (Landa *et al.*, 1980; Samper *et al.*, 1988; Lechtzin *et al.*, 1991). Los azúcares adicionados al diluyente, que se reportan son: fructuosa, glucosa, y lactosa (McGrath *et al.*, 1977; Lodhi y Crabo, 1984). Otros diluentes menos utilizados son la solución salina y la solución de Ringer (Bangham y Hancock, 1955; McGrath *et al.*, 1977). En otros casos, se han usado medios específicos como fluido folicular bovino, medio de fertilización de rata, medio tyrodes, y fluido tubal humano;

utilizados con semen de toro, de rata, de caballo, y de hombre, respectivamente (Fukui *et al.*, 1983; Shalgi *et al.*, 1981; Samper y Crabo, 1988).

Por lo general, la filtración se ha hecho por gravedad, colocando los filtros en posición vertical, y permitiendo que la muestra fluya libremente (Marmor *et al.*, 1980; Krishnamurthi *et al.*, 1983). Los espermatozoides motiles dentro del filtro se orientan hacia abajo debido a la fuerza de gravedad, mientras que los muertos flotan debido a que perdieron su poder de orientación (Roberts, 1972., citado por Chandrahasan *et al.*, 1986). Por otro lado, Maki-Laurila y Graham (1968), utilizaron presión negativa para filtrar semen de bovino en fibra de vidrio. El volumen de semen diluido a filtrar, varia de acuerdo al tipo de filtro elegido. Con semen diluido de ratón, el volumen que se ha reportado varia de 1.0 a 1.3 ml (McGrath *et al.*, 1977; Lechtzin *et al.*, 1991). Para semen de rata, se utilizó de 1.5 a 1.8 ml (Shalgi *et al.*, 1981), y para semen de bovino diluido a una tasa de 1:200, se puso a filtrar 10 ml de esa suspensión (Bangham y Hancock, 1955). El filtro utilizado en los trabajos mencionados fue de perlas de vidrio. Los trabajos de filtración de semen a través de sephadex, por lo general manejan un bajo volumen de semen diluido. Con semen de verraco y toro se colocó en el filtro 0.1 ml (Fayemi *et al.*, 1979; Lodhi y Crabo, 1984). Por otro lado, Guerrero (1981), utilizó 3.0 ml de semen de conejo diluido y realizó doble filtración.

El manejo del filtro antes de ser utilizado, esta encaminado a favorecer el paso de los espermatozoides, evitando cambios bruscos de temperatura y posibles contaminaciones. 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). Marmor *et al.* (1980), compararon la eficiencia de la filtración del filtro seco contra dos filtros embebidos

con distintas soluciones tampon, y observaron que la motilidad de los espermatozoides filtrados a través del filtro embebido con medio tyrodes, fue mucho mayor que la motilidad de los filtrados a través del filtro seco, y del filtro embebido en medio PBS (solución buffer fosfato).

La utilización de las técnicas anteriores en el mejoramiento de la calidad del semen destinado a ser empleado en inseminación artificial motivó la realización de este trabajo, además de contribuir a elevar la fertilidad con el uso del semen descongelado y filtrado.

OBJETIVOS.

Los objetivos del presente trabajo son evaluar el efecto de la filtración de semen de carnero, sobre la motilidad progresiva, el porcentaje de las anormalidades primarias y secundarias así como la integridad del acrosoma antes y después de la filtración.

MATERIALES Y METODOS.

El presente trabajo se realizó en el Modulo de Ovinos y en el laboratorio de Reproducción Animal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Se utilizaron doce eyaculados mezclados de tres carneros: dos de la raza Rambouillet y uno de la raza Suffolk con una edad promedio de cinco años, los cuales se asignaron a diferentes tratamientos.

Cada muestra consistió de 6 mililitros de semen fresco recolectado por el método de la vagina artificial, el cual se diluyó en partes iguales (dilución 1:1) en un diluyente a base de leche con 8% de glicerol (Corteel, 1981), y otro a base de tris-yema de huevo con 5% de glicerol (Evans y Maxwell, 1987).

La filtración se realizó en pipetas Pasteur de 14.5 cm de longitud y 0.6 cm de diámetro interno. El borosilicato se compactó a una altura de tres centímetros, el diámetro de las fibras de borosilicato fue de 20 micrómetros. Inmediatamente después de la recolección se realizó la dilución del semen. Enseguida se procedió a filtrar el semen.

Los tratamientos experimentales fueron los siguientes:

Tratamiento A: dilución 1:1 de semen y diluyente de leche, filtrados a través de una pipeta Pasteur con 30 mg. de borosilicato.

Tratamiento B: dilución 1:1 de semen y diluyente de leche, filtrados a través de una pipeta Pasteur con 50 mg. de borosilicato .

Tratamiento C: dilución 1:1 de semen y diluyente de leche sin filtrar.

Tratamiento D: dilución 1:1 de semen y diluyente de tris-yema de huevo, filtrados a través de una pipeta con 30 mg de borosilicato.

Tratamiento E: dilución 1:1 de semen y diluyente de tris-yema de huevo, filtrados a través de una pipeta Pasteur con 50 mg de borosilicato.

Tratamiento F: dilución 1:1 de semen y diluyente de tris-yema de huevo sin filtrar.

Al semen recolectado se le evaluó la motilidad progresiva, en una dilución 1:100 en citrato de sodio al 2.9%, con un microscopio compuesto con un aumento total de 100X.

La filtración se realizó por gravedad en una estufa de cultivo a una temperatura de 37 °C durante 5 minutos, el semen se recuperó en tubos graduados de recolección. Después de la filtración, se midieron las siguientes variables:

a) Volumen antes y después de la filtración.

b) La motilidad progresiva del semen filtrado se evaluó en una dilución 1:100 en citrato de sodio al 2.9% en un microscopio compuesto con un aumento total de 100X en portaobjetos calentados a 37°C.

c) Para evaluar las anomalías e integridad acrosomal, se utilizó una dilución 1:200 en solución de Hancock-Eosina.

d) La concentración se evaluó en la cámara de Neubauer.

e) Las anomalías espermáticas se clasificaron en primarias y secundarias, de acuerdo a Moss *et al.* (1979).

g) La integridad del acrosoma, se evaluó en un microscopio de contraste de fases con un aumento total de 1000 diámetros, utilizando la clasificación propuesta por Wells y Awa

(1970).

h) Para evaluar la motilidad de los espermatozoides retenidos en el filtro, se lavo el filtro con 2 ml de citrato de sodio al 2.9%.

Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó en base a un diseño factorial 2 X 2, con los factores diluyente y peso del filtro (Snedecor y Cochran, 1971). Los datos expresados en porcentaje fueron transformados al arcoseno antes de realizar el análisis de varianza respectivo.

RESULTADOS.

El porcentaje de motilidad progresiva en base al diluyente y al filtro se muestra en el cuadro 1. Se puede observar en este cuadro que la motilidad de las muestras filtradas: 42,5% y 45,0%, fue superior a la de la muestra sin filtrar: 32,5 ($P < 0,03$). Sin embargo entre los diluyentes no hubo diferencia.

En el cuadro 2, se muestra el porcentaje de motilidad progresiva en base a la interacción del diluyente por el filtro, observándose que la motilidad progresiva de la muestra diluida en Tris filtrada en 30 mg (41,7%) fue similar a la muestra filtrada en 50 mg (45,8%) y a la muestra sin filtrar (30,0%); sin embargo, si se encontró una diferencia significativa ($P < 0,04$) entre los dos últimos valores. En relación al diluyente de leche, no hubo diferencia entre las muestras filtradas y sin filtrar.

En el cuadro 3, se presenta la morfología normal y las anomalías en base al diluyente y al filtro. Se observó que la muestra diluida en Tris tuvo mayor porcentaje de espermatozoides normales, 87,6%, que la diluida en leche, 81,8% ($P < 0,02$), y en relación a los filtros no existieron diferencias. En cuanto al porcentaje de anomalías primarias, se observó que la muestra diluida en leche tuvo una mayor cantidad, 2,0%, que la muestra diluida en Tris, 1,4% ($P < 0,04$). En relación a los filtros, no hubo diferencia significativa en el porcentaje de anomalías primarias. También se observó que la muestra diluida en leche presentó mayor cantidad de anomalías secundarias (16,2%) que la muestra diluida en Tris (11,1%) existiendo una diferencia significativa ($P < 0,004$). En relación a los filtros, no se encontraron diferencias.

En el cuadro 4 se presenta el porcentaje de acrosomas normales, hinchados, rotos y ausentes en base al diluyente y al filtro. En este cuadro se puede observar que no existió diferencia significativa en el porcentaje de acrosomas normales ocasionada por el diluyente o la filtración. En relación a las alteraciones del acrosoma observadas, tampoco existieron diferencias atribuibles al diluyente empleado o a la filtración.

En el cuadro 5 se presenta la concentración espermática en base a la interacción del diluyente por el filtro. En este cuadro se puede observar que las muestras diluidas en Tris y en leche filtradas en 30 y 50 mg de borosilicato, y sin filtrar no presentaron diferencias significativas.

La motilidad de la fracción retenida en los filtros se presenta en el cuadro 6. La motilidad promedio para las muestras diluidas en Tris fue $28.8 \pm 2.21\%$ y para las diluidas en leche fue $27.5 \pm 2.21\%$. Estos valores no son diferentes entre sí. Tampoco existieron diferencias causadas por los filtros.

El porcentaje de espermatozoides normales y anomalías espermáticas observadas en la fracción retenida en los filtros se presenta en el cuadro 7. El porcentaje de espermatozoides normales encontrados después de la filtración y en cada diluyente no presentaron diferencias significativas entre ellas. En cuanto al porcentaje de anomalías primarias y secundarias en la fracción retenida en los filtros, se observó que la relación de los diluyentes Tris y leche con los filtros no presentaron diferencias significativas.

CUADROS DE RESULTADOS.

Cuadro 1. Porcentaje de motilidad progresiva en base al diluyente y al filtro.

Diluyente	Media	Error Estándar
Tris	39.2	2.62
Leche	40.8	2.62
Filtros		
30mg	42.5 a	3.21
50mg	45.0 a	3.21
sin filtrar	32.5 b	3.21

Letras diferentes indican diferencias significativas($p < 0.03$)

Cuadro 2. Porcentaje de motilidad progresiva en base a la interacción del diluyente por el filtro.

Filtro	Diluyente	
	Tris	Leche
	media \pm e.e.	media \pm e.e.
30 mg	41.7 \pm 4.54 ab	43.3 \pm 4.54 a
50 mg	45.8 \pm 4.54 a	44.2 \pm 4.54 a
sin filtrar	30.0 \pm 4.54 b	35.0 \pm 4.54 ab

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.04$)

Cuadro 4. Porcentaje de acrosomas normales, hinchados, rotos y ausentes en base al diluyente y al filtro.

Diluyente	Estado del acrosoma			
	normal	hinchado	roto	ausente
Tris	85.4 ± 0.80	8.6 ± 0.41	4.9 ± 0.38	1.1 ± 0.22
Leche	84.6 ± 0.83	8.2 ± 0.42	5.9 ± 0.39	1.3 ± 0.23
Filtros				
30mg	85.2 ± 0.99	8.0 ± 0.50	5.5 ± 0.47	1.3 ± 0.27
50mg	85.3 ± 1.03	8.3 ± 0.52	5.3 ± 0.50	1.1 ± 0.28
sin filtrar	84.4 ± 0.99	8.8 ± 0.50	5.5 ± 0.47	1.3 ± 0.27

Los valores son media ± e.e.

Cuadro 5. Concentración espermática (miles de millones por mililitro) en base al diluyente y al filtro.

Filtro	Diluyente	
	Tris	Leche
30 mg	4217.8 ± 382.91	3735.3 ± 382.91
50 mg	4206.2 ± 382.91	3885.7 ± 382.91
sin filtrar	3976.2 ± 382.91	3898.7 ± 382.91

Los valores son media ± e.e.

Cuadro 6. Motilidad de la fracción retenida en los filtros en base al diluyente y al filtro.

Diluyente	Media	Error estándar
Tris	28.8	2.21
Leche	27.5	2.21
Filtros		
30mg	28.6	2.22
50mg	27.7	2.22

Cuadro 7. Porcentaje de espermatozoides normales, anomalidades primarias y secundarias en la fracción retenida en los filtros.

	Espermatozoides normales	Anomalidades	
		primarias	secundarias
Diluyente			
Tris	79.0 ± 1.93	3.4 ± 0.45	17.6 ± 1.73
Leche	76.3 ± 1.97	3.3 ± 0.46	20.5 ± 1.77
Filtros			
30mg	77.7 ± 1.93	3.3 ± 0.45	19.0 ± 1.73
50mg	77.6 ± 1.97	3.4 ± 0.46	19.1 ± 1.77

DISCUSIÓN.

Los resultados de motilidad progresiva encontrados en este trabajo: 43% en semen filtrado y 32.5% en semen sin filtrar, son similares a los reportados por Landa *et al.* (1980), que señalan un valor de 55% en semen fresco de ovino filtrado a través de sephadex. En este caso, el tipo de filtro utilizado no fue determinante en la diferencia. Por su parte, Trejo *et al.* (1986), reportan un valor de 54% de motilidad progresiva en semen de caprino filtrado en borosilicato. Los trabajos realizados con semen de bovino, filtrado a través de borosilicato, por lo general indican mejoras notables en la motilidad progresiva. Chandrahasan *et al.* (1986), reportan que el semen con 77.5% de motilidad antes de filtrado aumento a 87.2% después de filtrado.

Las diferencias en la morfología espermática observadas en el presente trabajo, atribuibles al diluyente utilizado, son contradictorias a lo reportado por otros autores. Peña y Melesio (1984), no encontraron diferencias en el porcentaje de anormalidades primarias y secundarias en el semen fresco, ni entre diluentes: Tris, glucosa y lactosa. Sin embargo, en un trabajo similar al presente se observó que el porcentaje de anormalidades también fue diferente por el efecto del diluyente (Medrano, 1993). Las observaciones anteriores probablemente fueron causadas por un aumento en el porcentaje de anormalidades terciarias, causadas por el diluyente, y que no se distinguieron de las secundarias (Hafez, 1987).

En otro tipo de trabajos con semen de bovino, filtrado a través de sephadex, se reporta un aumento en el porcentaje de cabezas espermáticas desprendidas. Se observó en el semen pre-

filtrado 8.3% de ellas, mientras que en el semen filtrado con citrato de sodio aumentó a 15.2%, y se mantuvo sin cambio significativo en el semen filtrado con Test-yema de huevo, 10.9% (Graham y Graham, 1990). En estas observaciones queda manifiesto el papel del diluyente utilizado. En el presente trabajo, existió diferencia entre el porcentaje de anomalías primarias y secundarias del semen diluido en Tris y del diluido en leche (1.4% vs 2.0% y 11.1% vs 16.2% respectivamente).

En lo referente al efecto de la filtración sobre la cantidad de anomalías espermáticas, Trejo *et al.* (1986), reportan 8.5% de anomalías secundarias en semen de caprino filtrado a través de borosilicato, y 14.5% en el semen sin filtrar. En el presente trabajo de tesis se encontró un valor de 13.5% para el semen filtrado y 14.3% para el grupo testigo sin filtrar. En contraste, Marmor *et al.* (1980), no observaron cambios en el porcentaje de anomalías, en semen de humano, entre el semen filtrado y el sin filtrar. Concluyen estos autores, que la fibra de vidrio no selecciona *a priori* las formas más aptas para la fecundación.

En trabajos de filtración de semen de bovino a través de borosilicato, siempre se reporta una disminución significativa en el porcentaje de anomalías espermáticas. Krishnamurthi *et al.* (1983), observaron 19.8% de anomalías antes de la filtración, y 10.2% después. En cambio en el presente trabajo, el porcentaje de anomalías en el semen sin filtrar fue 15.6% y en el filtrado 15.3%.

En relación al diluyente empleado, en el presente trabajo no se encontró diferencia en el porcentaje de acrosomas dañados entre el semen diluido en Tris (14.6%) y el diluido en leche

(15.4%); esta misma tendencia es reportada por Bernabe y Tello (1985), y por Landa *et al.* (1980), este último trabajo realizado con semen de bovino. Sin embargo, Peña y Melesio (1984), y El-Gaafary (1990), observaron menor daño cuando se utiliza un diluyente a base de Tris que a base de lactosa.

En cuanto al efecto de la filtración sobre el porcentaje de acrosomas intactos, Landa *et al.* (1980), reportan 74.7% en semen fresco de ovino filtrado a través de sephadex. El valor que se obtuvo en el presente trabajo de tesis fue de 85.2%, que es ligeramente superior al anterior pero con un filtro diferente.

En el presente trabajo no existieron diferencias en cuanto a concentración se refiere. Aunque en relación a trabajos de filtración de semen de bovino, a través de borosilicato, la disminución de la concentración varía desde 8% hasta 59% (Lodhi y Crabo, 1984; Krishnamurthi *et al.*, 1983; Chandrabasan *et al.*, 1986).

Otro factor que interviene en la disminución de la concentración, es la dilución empleada. Samper *et al.* (1988), señalan una disminución de 52% cuando se usa una tasa de dilución de 1:10, 63% con una tasa de 1:4, y 68% con 1:1. La motilidad de los espermatozoides retenidos en los filtros, encontrada en el presente trabajo fue 27.6% en promedio, este valor es similar al reportado por Trejo *et al.* (1986), 26%, con semen de caprino.

El porcentaje de anomalías secundarias reportado por Trejo *et al.* (1986), de la fracción de semen que es retenida en los filtros, es similar al observado en el presente trabajo, 16.8% y 19.0% respectivamente.

CONCLUSIONES.

Las principales variaciones en la motilidad progresiva del semen fueron causadas por el efecto del filtro.

La morfología espermática no se afectó por la filtración, pero sí por el diluyente.

La integridad del acrosoma no fue afectada por el tratamiento del semen.

La concentración espermática no disminuyó después de la filtración en borosilicato.

Se recomienda proseguir con los trabajos de filtración de semen en borosilicato de diferente diámetro o con otro tipo de filtros para establecer la mejor opción en cuanto a la retención de los espermatozoides menos aptos en términos de motilidad progresiva y morfología, y en consecuencia seleccionar una población con mayor capacidad para la fertilización.

LITERATURA CONSULTADA.

1. **Bangham, A. D. y Hancock, J. L. 1955. A new method for counting live and dead bull spermatozoa. Nature 176: 656.**
2. **Bernabe, S.M. y Tello, A.B. 1985. Correlaciones entre la motilidad progresiva y las anomalías acrosómicas en el semen de carnero fresco y congelado en pastillas en tres diferentes diluentes. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlán UNAM. México. 22p.**
3. **Chandrasekhar, C., Pattabiraman, S. R. y Venkataswami, V. 1986. Studies on the effect of glass wool column filtration on the quality of semen of cross bred bulls. Indian Vet. J. 63: 913-918.**
4. **El-Gaafary, M. N. 1990. A diluent for freezing of ram semen. Indian J. Ani. Sci. 60 (7): 769-772.**
5. **Fayemi, E. O., Crabo, B. G. y Graham, E.F. 1979. Assay of frozen board semen with sephadex filtration. Theriogenology. 12 (1): 13-17.**
6. **Fukui, Y., Fukushima, M. y Ono, H. 1983. Fertilization *in vitro* of bovine oocytes after various sperm procedures. Theriogenology. 20 (6): 651-660.**
7. **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.**
8. **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.**
9. **Hafez, E. S. E. 1987. Semen evaluation. En Reproduction in farm animals. E. S. E. Hafez (Ed). Lea y Febiger. Filadelfia. E.U.A. 455-480.**

10. Krishnamurthi, P. S., Pattabiraman, S. R. y Venkataswami, V. 1983. A physical method to improve semen quality. *Cheiron*. 12 (1): 49-51.
11. 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.
12. 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.
13. 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. Illinois. EUA. Vol. II: 59.*
14. Maki-Laurila, M. y Graham, E. F. 1968. Separation of dead and live spermatozoa in bovine semen. *J. Dairy Sci.* 51 (6): 965.
15. Marmor, D., Delafontaine, D., Prieur, B., Fourcat, C., Moing, M. y Porta, F. 1980. La filtration in vitro du sperme sur laine de verre. *J. Gyn. Obst. Biol. Reprod.* 9(6): 705-711.
16. McGrath, J., Hillman, N. y Nadijcka, M. 1977. Separation of dead and live mouse spermatozoa. *Develop. Biol.* 61: 114-117.
17. Medrano, H. J. A. 1993. Congelación de semen de carnero diluido en Tris y en leche, filtrado a través de borosilicato. Tesis de Maestría. FES-Cuautitlán UNAM. México. 86p.
18. Moss, J. A., Melrose, D.R., Reed, H. C. y Vandeplassche, M. 1979. Spermatozoa, semen and artificial insemination. En *Fertility and infertility in domestic animals*. J.A. Laing (Ed). Bailliere Tindall. Londres, G.B. 59-91.
19. 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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

29

20. Peña, V. M. y Melesio, A. F. 1984. Comparación de la motilidad progresiva y anormalidades 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. FES-Cuautitlán UNAM. México. 22p.
21. 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.
22. 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, Irlanda. 3: 294.
23. Samper, J. C., Loseth, K.J. y Crabo, B.G. 1988. Evaluation of horse spermatozoa with sephadex filtration using three extenders and three dilutions. 11th. Int. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. Dublin, Irlanda. 3: 295.
24. 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.
25. Snedecor, G. W. y Cochran, W. G. 1971. Métodos Estadísticos. Compañía Editorial Continental. S.A. México. 703p.
26. Trejo, G. A., Esquivel, C. A. Rodríguez, M. A. y Martínez, 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.
27. Vyas, S., Dharni, 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.