

Ejemplo:

EVALUACIÓN DEL ACROSOMA DEL ESPERMATOZOIDE CAPRINO UTILIZANDO LA TÉCNICA DE TRIPLE TINCIÓN

Raúl Navarrete Méndez*¹, María Guadalupe Orozco Benítez¹, Zuriana Vianey López Corona², José Alfredo Benítez Meza¹ y Juan Antonio Hernández Ballesteros¹.

¹Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit. ²Clínica Veterinaria.

Resumen. El objetivo fue evaluar el acrosoma del espermatozoide caprino mediante la técnica de triple tinción. Se utilizó un macho caprino de la raza Boer con una edad aproximada de un año. Se realizaron cinco colectas de semen, con un intervalo de siete días. En los cinco eyaculados las evaluaciones se realizaron por triplicado, las variables analizadas fueron: 1) motilidad, y 2) porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma y muertos sin acrosoma. Para realizar la evaluación de espermatozoides vivos/muertos e integridad acrosomal se utilizó la técnica de triple tinción. Los datos de las variables fueron analizados con un diseño con bloques completos al azar ($P < 0.05$). Para la variable motilidad, los resultados demostraron que hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los eyaculados, aún cuando se encontró diferencia estadística significativa para la variable motilidad, los cinco eyaculados evaluados presentaron valores que se encuentran dentro del límite permitido (70 a 90%) para su utilización en IA. En la variable espermatozoides VCA se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$), los porcentajes más altos se obtuvieron en los eyaculados dos y cuatro, con 84.6 y 82.6%, respectivamente. Se concluye que el eyaculado número cuatro fue el que mostró la motilidad más baja (70%), sin embargo en la triple tinción mostró un porcentaje de espermatozoides VCA alto (82.6%), lo cual justifica la utilización de la triple tinción para la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides.

Palabras clave: evaluación, acrosoma, espermatozoide, triple tinción.

EVALUATION OF THE ACROSOME OF THE SPERMATOZOON OF THE GOAT UTILIZING THE TRIPLE TINT TECHNIQUE

Abstract. The objective was to evaluate the acrosome of the spermatozoon of the goat by using the triple tint technique. To achieve this goal it was utilized a one year old Boer goat. Five semen samples were collected every seven days. In the five samples, the evaluations were made three times and the variables analyzed were: 1) motility, and 2) percentage of alive spermatozoa with an acrosome (ASA) and dead spermatozoa without an acrosome. It was utilized the triple tint technique to evaluate the live/dead spermatozoa and the acrosomal integrity. The results were analyzed with blocks assays completely randomized design ($P < 0.05$). For motility, the result showed significant

differences ($P < 0.05$), between the ejaculates. The five ejaculates evaluated were in the limit permitted (70 to 90%) for their usage in AI. In the alive spermatozoa with an acrosome, it was found significant difference between treatments ($P < 0.05$), the highest percents were obtained in the second and fourth ejaculates, with 84.6 y 82.6%, respectively. In conclusion the ejaculate number four showed the worse motility (70%), but in the triple tint technique showed a high percent ASA (82.6%), this is a justifying in the utilization of the triple tint technique to evaluate the viability in the spermatozoon.

Key words: evaluation, acrosomal, spermatozoon, triple tint.

Introducción. Actualmente la mayoría de los centros de inseminación no consideran todos los estudios para el cálculo de dosis y solo se basan en el volumen y concentración, incurriendo de esta manera en serios errores, ya que incluyen espermatozoides anormales, inmóviles, muertos o con daño acrosomal, que como se ha demostrado son incapaces de fecundar¹. El acrosoma es un organelo espermático que cumple una función esencial en el proceso de fecundación, la importancia se debe a su rol en la fijación y penetración espermática de la zona pelúcida y en la fusión entre gametos². No se puede escoger un futuro semental, solamente considerando su tamaño y diámetro escrotal, porque en su prueba de comportamiento, puede en algún momento, reflejar negativamente su potencial de apareamiento y afectar la fertilidad del rebaño. Por lo que es necesario realizar periódicamente evaluaciones seminales, con la finalidad de determinar porcentaje de motilidad, relación de espermatozoides vivos/muertos, porcentaje de anormalidades, así como la integridad del acrosoma, todo ello con la finalidad de reunir los elementos necesarios para el cálculo de dosis, además para poder determinar si el semen es viable para su uso dentro de un programa de inseminación artificial (IA), o si el semental es apto para un programa de empadre³.

Objetivo. Evaluar el acrosoma del espermatozoide caprino mediante la técnica de triple tinción.

Material y métodos. El estudio se realizó en la Unidad de Producción Ovicaprina y en el laboratorio de Biotecnología de la Reproducción de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UAMVZ) de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN), que se encuentran ubicados en la ciudad de Compostela, Nayarit. Se utilizó un macho caprino de la raza Boer con una edad aproximada de un año. El semental fue previamente entrenado para realizar la monta, para poder llevar a cabo la colección de semen por medio de vagina artificial. Su manejo fue acorde al programa de la unidad, se le suministró una dieta a base de concentrado, minerales y agua a libre acceso. Se realizaron cinco colectas de semen, con un intervalo de siete días. Después de la obtención del semen, se procedió a evaluarlo por medio de técnicas de laboratorio, con el propósito de determinar su calidad. El examen comprendió la evaluación de características macroscópicas y microscópicas⁴. En los cinco eyaculados las evaluaciones se realizaron por triplicado, las variables analizadas fueron: 1) motilidad, y 2) porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma y muertos sin acrosoma. Para realizar la evaluación de espermatozoides vivos/muertos e integridad acrosomal con la triple tinción, se

tomó el volumen de muestra que contenía 25 millones de espermatozoides y se colocó el mismo volumen de azul Tripan, se incubó a 37° C durante 15 minutos. Posteriormente se tiró el azul Tripan, y se lavó con PBS hasta que la pastilla quedo de color azul claro, para posteriormente tirar el sobrenadante y agregar v/v glutaraldehido y se refrigeró por una hora tapado, se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos a 37° C, posteriormente se tiró el sobrenadante y se resuspendió con PBS v/v se hizo el frotis dejando secar a temperatura ambiente, para después lavar con PBS directamente sobre el portaobjeto. Posteriormente se introdujo el frotis en un vaso de Copplin que contenía Café Bismack y se mantuvo a 37° C durante 50 minutos. Se sacó y enjuagó con PBS y se dejó secar a temperatura ambiente, para después teñirla con Rosa de Bengala durante 30 minutos, se lavó con PBS y posteriormente con agua destilada y se montó con resina cubriendo con un cubreobjetos. Se observó con objetivo de 100X, para contar 100 células⁵. La interpretación que se utiliza para triple tinción, se basa en la coloración de la cabeza del espermatozoide: Cabeza rosa-café: espermatozoide vivo con acrosoma intacto. Cabeza blanca-azul: espermatozoide muerto sin acrosoma. Los datos de las variables fueron analizados con un diseño con bloques completos al azar (P<0.05).

Resultados. Para la variable motilidad, los resultados demostraron que hubo diferencias estadísticas significativas (P<0.05, cuadro 1) entre los eyaculados. Los eyaculados dos, tres y cinco resultaron estadísticamente iguales pero mayores a los eyaculados uno y cuatro. El eyaculado número cuatro fue el que mostró la motilidad más baja. (70%); Para la variable porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma y muertos sin acrosoma se encontró diferencia estadística (P<0.05, cuadro 2), los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma (VCA) más altos se obtuvieron en los eyaculados dos y cuatro, con 84.6% y 82.6%, respectivamente; no encontrándose diferencia estadística entre estos dos valores. En lo que respecta a los espermatozoides muertos sin acrosoma (MSA), el mayor porcentaje se presentó en los eyaculados uno y cinco, con 30 y 28.3%, respectivamente; no existiendo diferencia entre estos resultados.

Discusión. Aun cuando el eyaculado número cuatro mostró la motilidad más baja, todos los resultados obtenidos se encuentran dentro del rango (70 a 90%) que han sido reportados por otros investigadores, al respecto Martínez⁶ Eiman *et al*⁷, señalan que las muestras de semen caprino deben tener un mínimo de 70% de motilidad para poder ser consideradas en los programas de IA. De los cinco resultados obtenidos, sólo el eyaculado número cuatro coincide con los resultados que obtuvieron Amoah y Gelaye⁸, estos investigadores evaluaron la motilidad espermática en las cuatro estaciones del año, obteniendo los siguientes resultados: 62%, 65%, 71% y 73% en primavera, verano, otoño e invierno, respectivamente. En lo que respecta a los espermatozoides VCA, el resultado obtenido en la presente investigación coincide con el que reportó Cortés⁹, quien evaluó el porcentaje de espermatozoides VCA en diferentes horas después de haber colectado el semen, obteniendo los siguientes valores 81.6, 77.9, 73.6, 72.1, 69.6 y 57.4%, a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 horas, respectivamente. Cabe señalar que en el presente trabajo, sólo fue evaluado el semen a las cero horas (inmediatamente después de la colección). El único resultado que no coincide, es el que obtuvieron a las 24 horas de evaluación

(57.4% de espermatozoides VCA), lo cual viene a confirmar lo que ha sido mencionado por otros autores⁴, quienes han señalado que conforma avanzan las horas de colección del semen, se va perdiendo la viabilidad de los espermatozoides debido a los cambios que se suceden fuera del organismo.

Conclusiones. Aun cuando se encontró diferencia estadística significativa para la variable motilidad, los cinco eyaculados evaluados presentaron valores que se encuentran dentro del límite permitido (70 a 90%) para que una muestra pueda ser procesada para su utilización en un programa de IA. En lo que respecta a la variable espermatozoides VCA se encontró diferencia estadística ($P < 0.05$), los porcentajes más altos se obtuvieron en los eyaculados dos y cuatro, con 84.6 y 82.6%, respectivamente. Cabe señalar que el eyaculado número cuatro fue el que mostró la motilidad más baja (70%), sin embargo en la triple tinción mostró uno de los porcentajes de espermatozoides VCA más altos, con 82.6%, lo cual justifica la utilización de la triple tinción para la evaluación de la viabilidad de los espermatozoides.

Referencias bibliográficas.

¹**Levis, D. G. 1995.** Procedures for collecting, evaluating and diluting boar semen. Department of animal sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE. USA.

²**Knobil, E., y Neill, J. 1988.** The physiology of reproduction. Raven Press, LTD. New York. USA.

³**Cox, J. F., Fernández, P., y Saravia, F. 2006.** Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. Arch. Med. Vet.30: 93–99.

⁴**Hafez E. S. E., y Hafez, B. 2002.** Reproducción e inseminación artificial en animales. 7 ed. Editorial Mc Graw Hill Interamericana. México, D.F.

⁵**Talbot, P., and Chacon, R. S. 1981.** Observation on the acrosome reaction of human sperm “in vitro”. Am. J. Primatol. 1: 211 – 219 (1981).

⁶**Martínez V. A., Rebolledo S. R., Castellanos P. D. E., Torres D. C. A., y Copean J. O. P. 2002.** La Caprinocultura en México. México Ganadero. 485: 5– 8.

⁷**Eiman, M.; Abógala E., and Terada, T. 2003.** Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrana and its protection during freezing. Biology of Reproduction. 69: 1245 – 1250.

⁸**Amoah, E.A. y Celaye, S. 1997.** Biotechnological advances in goat reproduction. J. Anim. Sci. 75: 578 – 585.

⁹**Cortés, G. S. 1998.** Efecto de la conservación sobre la fisiología espermática de semen caprino. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Biológicas.

Anexo.

Cuadro 1. Resultados encontrados en los porcentajes de motilidad de los cinco eyaculados.

EYACULADO	PORCENTAJE DE MOTILIDAD
1	80b
2	90 ^a
3	90 ^a
4	70c
5	90 ^a

Literales distintas en la columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).

Cuadro 2. Resultados encontrados en los porcentajes de espermatozoides vivos con acrosoma (VCA) y espermatozoides muertos sin acrosoma (MSA) con la triple tinción en los cinco eyaculados.

EYACULADO	TRIPLE TINCIÓN	
	Espermatozoides VCA	Espermatozoides MSA
1	70b	30
2	84.6a	15.3
3	77ab	23
4	82.6a	17.3
5	71.6b	28.3

Literales distintas en la columna indican diferencia estadística significativa (P<0.05).