



Imagen 8.4 Microscopio óptico. Fotografía tomada en Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC, UNAM. Méx.

Características microscópicas del semen en perros y gatos

Es de suma importancia para juzgar el destino del eyaculado obtenido. Es necesario para esta evaluación que todo el material y equipo se encuentre a 37° C utilizando el Baño María o las platinas térmicas (pipetas, portaobjetos, cubreobjetos, diluyentes, colorantes, etc.) (10).

Concentración

La concentración de un eyaculado se puede determinar por medio de un hemocitómetro o por espectrofotometría. En la práctica los conteos se hacen a través de las cámaras cuentaglóbulos y en el caso de pequeños animales la Neubauer es la de elección (10).

Vigor / Motilidad masal

Es la fuerza o intensidad y tipo de movimiento que realizan los espermatozoides. Se cuantifica en una escala de 0 a 5. Deben ser observados varios campos microscópicos.

0: espermatozoides sin movimiento

1: espermatozoides con movimientos pobres, cabezas fijas, sólo se mueven las colas, pudiendo girar sobre sí mismos

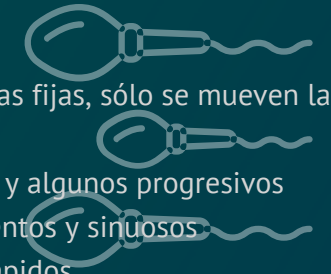
2: espermatozoides con desplazamiento en círculos y algunos progresivos

3: espermatozoides con movimientos progresivos lentos y sinuosos

4: espermatozoides con movimientos progresivos rápidos

5: espermatozoides con movimientos progresivos muy rápidos

Para un semen fresco de buena calidad el vigor debe ser de entre 4 y 5 (10).



Motilidad individual



Este parámetro es utilizado como indicador de la función espermática (6). La movilidad es normal cuando el espermatozoide presenta un movimiento progresivo rectilíneo que le permite avanzar con cierta rapidez, y se mide en porcentaje. Para evaluar la motilidad individual se coloca una gota de semen fresco sin diluir entre un portaobjetos y cubreobjetos (atemperados a 37°C sobre una platina térmica) y se observa espermatozoides en varios campos con un microscopio óptico con aumento de 40X (10), el valor debe ser igual o mayor al 70%, (Sorribas, 2005). La estimación del porcentaje del movimiento es subjetiva y la aproximación real será dependiente de la experiencia adquirida a lo largo de la práctica de lectura microscópica.

Morfología

La morfología espermática es un parámetro indispensable en la evaluación seminal, dado que intrínsecamente está implicada en los problemas de fertilidad tanto en la especie canina como en otras especies (1, 8).

Las anomalías espermáticas caninas se clasificaron como primarias, secundarias y terciarias:

Las primarias son aquellas que se generan en la espermatogénesis: malformaciones de la cabeza, de la pieza intermedia y del flagelo, cabezas y colas dobles, gota citoplasmática proximal, carencia de acrosoma, defecto de Dag visualizándose una cola enrollada alrededor de la cabeza que involucra la pieza intermedia (3).

Y las secundarias aquellas ocurridas durante la maduración en el epididímo: persistencia de la gota citoplasmática distal, flagelos doblados y ruptura del acrosoma (3).

Las alteraciones que se producen en el momento de recolección del semen, tinciones y mala manipulación de la muestra se denominan terciarias (1).



Imagen 8.5 Muestra de semen en perro. Imagen adquirida en Restrepo, J. G. (14 de Julio de 2016). Estándares de calidad para la recolección de semen bovino. Recuperado el 2023, de <https://www.youtube.com/watch?v=0CR2iMo706Y>

La integridad y funcionalidad de la membrana plasmática

Son esenciales para la conservación de la capacidad fertilizante del espermatozoide. Los colorantes vitales, permiten diferenciar espermatozoides vivos de espermatozoides muertos en relación a la permeabilidad de la membrana al permitir el paso o no de los mismos. Células cuya membrana plasmática es funcional y por lo tanto conservan la permeabilidad selectiva, no permiten el paso del colorante y se observan no teñidas. Por el contrario, cuando la membrana plasmática está alterada y pierde la permeabilidad selectiva, permite el paso del colorante y la célula se observa teñida (11).

Pueden utilizarse eosina/nigrosina o eosina/azul de anilina (método simple y económico). Esta técnica tiñe de color rosado aquellos espermatozoides que presentan una membrana alterada mientras que los espermatozoides vivos se observan de color blanco sobre un fondo púrpura (11).



Imagen 8.5 Prueba de integridad de membrana con eosina/nigrosina en espermatozoides de perro. Fotografía tomada en Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Fesc, UNAM, Méx.



HOST: Test hipoosmótico (Hypoosmotic Swelling Test)

También llamada prueba de endósmosis positiva, es sencilla y poco costosa. Evalúa la funcionalidad e integridad de la membrana de los espermatozoides. Se someten los mismos a un medio hiposmótico, esto causa entrada de agua al espermatozoide para equilibrar la presión osmótica celular con la del medio. La entrada de agua provoca en la célula un hinchamiento, y al ser una célula con escaso citoplasma responde con enrollamiento de la cola (cola enrollada), mientras que las células con la membrana dañada no experimentan cambios en la cola (cola lisa o estirada) (3, 4, 10).

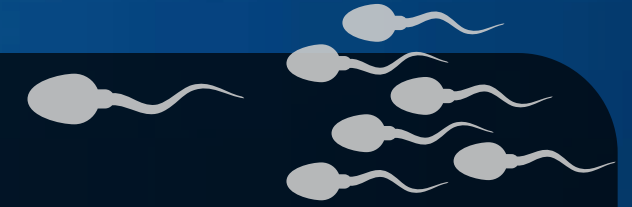
Se encontró que el hinchamiento hipoosmótico estaba relacionado directamente con la movilidad espermática (3, 4).

Integridad acrosomal

El acrosoma debe estar intacto en el momento de la inseminación o servicio debido que la reacción acrosómica debe ocurrir en el sitio donde ocurra la fertilización.

La morfología acrosómica puede ser observada mediante microscopio de contraste de fase, microscopio electrónico de transmisión y con sustancias fluorescentes (5). Dentro de las lectinas marcadas con sustancias fluorescentes, el *Pisum sativum* (PSA) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) es el más usado para detectar cambios acrosomales mediante el uso de pruebas fluorescentes (6, 7). El PSA se une en forma selectiva a las proteínas acrosomales de los espermatozoides de los mamíferos permitiendo visualizar la integridad acrosómica a través de su conjugación con el FITC.

El semen fresco debe poseer no menos un 70% de acrosomas intactos vivos (2).



Bibliografía

1. Alamo S.D. (2007). Crioconservación y viabilidad espermática en la especie canina: utilización de nitrógeno líquido vs. ultracongelador de -152°C (Tesis doctoral). Universidad de las Palmas de Gran Canarias. España.
2. Feldman E., Nelson R. (2004). Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. En: Feldman E.C., Nelson R.W. Canine and feline endocrinology and reproduction. 3era Ed. WB Saunders. Pp: 930-950-. Estados Unidos.
3. Freshman J. L. (2002). Semen collection and evaluation. Clinical techniques in small animal practice, 17(3), 104–107. Estados Unidos.
4. Harrison R.A., Vickers S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility 88(1):343-352. Reino Unido.
5. Hideki F., Masashi I., Takasashi K. (1993). Correlation between the hypoosmotic swelling test and various sperm function tests. International Journal of Fertility 38(5)311–315. Japón.
6. Kawakami E., Vandervoort C. A., Mahi-Brown C.A., Tollner T.L., Overstreet J.W., (1993). Comparison of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrosome reactions of dog sperm. The Journal of Experimental zoology 265(5):599–603. Estados Unidos.
7. Mendoza C., Carreras A., Moos J., Tsarik J. (1992). Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. Journal of Reproduction and Fertility 95(3):755-63. España.
8. Restrepo B.G., Vásquez A.N., García A.E. (2009). Criopreservación de semen canino y su aplicación en la inseminación artificial. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad CES Medellín 4(2):119-129. Colombia.
9. Rodríguez-Gil J.E., Montserrat A., Rigau T. (1994). Effect of hypo-osmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. Theriogenology, 42(5):815–829. España.
10. Tittarelli C.M. (2016). Extracción y evaluación seminal en caninos. En: Stornelli M.A. Manual de reproducción de animales de producción y compañía. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. Editorial de la universidad de Plata. Pp 159-173. Argentina.
11. Watson P.F. (1990). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science, 60-61: 481-492. Reino Unido