

Práctica VIII. Pruebas de evaluación de semen

Materiales biológicos

- Muestras de semen de perro

Instrumental y equipo

- Baño María
- Termómetro de altas
- 2 gradillas
- 3 pipetas de 10 ml
- 3 pipetas de 1 ml
- 5 tubos de ensayo
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas Pasteur
- Chupones propipeta
- Microscopio óptico
- Parafilm
- Microscopio óptico
- Contador
- Solución salina fisiológica (NaCl 0.9%)

Material del alumno

- Bata
- Guantes de exploración
- Toallas de papel

Manual Virtual de Reproducción animal en
perros y gatos

M. en C. Alicia Alcántar Rodríguez

MVZ Francisco Javier Carbajal Merchant

MVZ Demmy Grisha De los Santos Castro



Procedimiento

1. Se prepara previamente el baño María a una temperatura de 32° a 34°, esto se puede regular con la ayuda de un termómetro de altas; se coloca una gradilla en el interior para colocar los tubos de ensayo con 9.9 ml de solución salina fisiológica (para medir utilizar las pipetas de 10 ml), la tinción de Eosina-Nigrosina y las muestras de semen (tubos colectores).
2. En la platina térmica se colocarán portaobjetos, cubreobjetos, pipetas Pasteur, pipetas de 1 ml para que mantengan a una temperatura promedio de entre 32° y 34°
3. Recolectar semen de machos adultos como se describe en la práctica de colección de semen

Evaluación macroscópica

1. Medir el volumen del eyaculado directamente del tubo colector
2. Determinar el color y consistencia del eyaculado

Evaluación microscópica

1. Para evaluar la **motilidad masal** se deposita una gota de semen fresco el portaobjetos y se observa en el microscopio en el objetivo de 10x. Se observan los movimientos en forma de torbellino o en ondas
2. Para la **motilidad progresiva**
Se coloca una gota de semen en un portaobjetos y se le coloca un cubreobjetos; se observa al microscopio con el objetivo 10x. Se expresa en porcentaje, 0-100%. Se debe estimar visualmente que porcentaje de células se mueven hacia delante de forma rectilínea
3. Para **evaluar vivos y muertos**, sobre la platina térmica se coloca un portaobjetos, en éste se pone una gota de dilución 1:100 y al lado una gota de Eosina—Nigrosina, se mezclan con ayuda de otro portaobjetos, se corre hacia el frotis, y se seca. En el campo de observación se cuentan los espermatozoides blancos y los rosas hasta llegar a 100 o 200 células entre ambos; el resultado se expresa en porcentaje

-
4. Éste frotis también se utiliza para evaluar morfología de las células espermáticas; se cuentan todos los espermatozoides del campo, los normales y anormales hasta llegar a 100 o 200, el resultado se expresa en porcentaje
 5. Para evaluar la concentración se utiliza la cámara de Neubauer; para llenarla se realiza una dilución de 1:200, ésta se hace mezclando 1 ml de disolución 1:100 con una solución formulada. Se espera 5 min. Para que las células se sedimenten. Se realiza el conteo de la siguiente manera:
 - Se localiza la cuadrícula central que está dividida en 25 cuadros, que a su vez están divididos en 16 cuadros pequeños cada uno
 - Se realiza el conteo de los 4 cuadros de las esquinas y el central, se suman las células y el resultado se multiplica por 10,000,000
 - Los espermatozoides que tocan alguna de las líneas del lado izquierdo o de las de la parte superior del cuadro se incluyen en la cuenta; los que toquen alguna línea del lado derecho o de la sección inferior del cuadro, no se contabilizan
 6. Para determinar el número de dosis por eyaculado se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Número de dosis} = \text{Volumen} \times \text{concentración} \times \% \text{ de motilidad progresiva} / (\text{concentración espermática por dosis})$$
 7. **EI HOST** (Test hipoosmótico): Se colocan 50 µl de semen en 450 µl de solución hiposmótica, se incuba a 37°C en baño maría y luego se lee, colocando una gota de la dilución entre porta y cubreobjetos y observando con objetivo de inmersión. Se cuentan 100 células tomando como positivo cualquier grado de enrollamiento. Un semen fresco de buena calidad debe tener al menos un 70% de colas enrolladas
 8. Al finalizar se limpiará todo el material que se utilizó y se limpiará y se desinfectarán las mesas, se entregará el material de laboratorio.

Tabla 1. Características de semen fresco obtenido de perros de diferentes razas.

Variable seminal	Promedio $\pm$ DE
Volumen (ml)	1,7 $\pm$ 0,5
	1,2 $\pm$ 0,2
	1,9 $\pm$ 0,87
Concentración (x10 ⁶)	260,4 $\pm$ 72,9
	610,5 $\pm$ 87,6
	324 $\pm$ 188,6
Movilidad progresiva (%)	95,7 $\pm$ 3,6
	88,7 $\pm$ 1,2
	83,8% $\pm$ 9,5
Espermatozoides vivos (%)	86,5 $\pm$ 4,5
	94,5 $\pm$ 0,6
	92 $\pm$ 4,7
Espermatozoides normales (%)	87,7 $\pm$ 6,9
	93,4 $\pm$ 0
	83,5 $\pm$ 20
Integridad de membrana (%)	87,9% $\pm$ 8,1
	79.8% $\pm$ 6.6