



PRÁCTICA 04

EVALUACION DE CALIDAD SEMINAL

El espermatozoide es una célula terminal, cuyo rol principal es el transporte de un paquete, constituido por el genoma nuclear y el centriolo, hasta el ovocito. Para realizar esta tarea, el espermatozoide está equipado con una batería de estructuras especializadas (una membrana plasmática que muestra áreas delimitadas, organelos con disposición específica tales como la vaina mitocondrial, y especializaciones de los mismos tales como el flagelo y el acrosoma) los que garantizan la interacción particular con el tracto genital femenino y el ovocito y sus envolturas. La viabilidad celular espermática decrece rápido y substancialmente luego de la eyaculación.

Muchos investigadores, especialistas en reproducción animal están tratando de diseñar el “análisis seminal ideal”, que valore adecuadamente y prediga la fertilidad de una muestra seminal. Así, el análisis de semen ideal sería aquel que de forma sencilla y eficaz permitiera conocer de manera predictiva la capacidad fecundante de un eyaculado.

Según Graham (1996), las cualidades que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia optima del material genético. Sin embargo este análisis integral es muy difícil de desarrollarlo, debido a la enorme complejidad inherente a la función espermática.

Graham J. 1996. Cryopreservation in stallion spermatozoa. Vet. Clin. North. Ame. 12:131-147

Objetivos.

- a. Valorar reproductores seleccionados, destinados a inseminación artificial y monta natural.
- b. Determinar el número de dosis de inseminación a obtener de un eyaculado.

IV. Evaluación de calidad seminal



Materiales y metodología

1. Se procederá a realizar la colección con vagina artificial de un carnero, toro ó verraco con las precauciones del caso.
2. Se transporta rápidamente el semen colectado al laboratorio.
3. Se procede a realizar la evaluación macroscópica y microscópica del semen, según corresponda.
4. Completar datos en el siguiente tabla:

Calidad de semen	Fecha:.....
Información de eyaculado:	
Especie _____	Nombre /arete _____
Volumen (ml) _____	Color _____
Aspecto _____	
Concentracion (X 10 ⁶) _____	Total Sperm (X 10 ⁹) _____
Motilidad masal (%) _____	
Motilidad Individual (%) _____	
Esperm. Viabiles(%) _____	
Morfologia (%) Normal _____	Anormales _____
Conclusión de evaluación:	
.	
.	
.	
.	
.	
.	

Revisión bibliográfica

Técnicas de análisis de calidad seminal

El análisis seminal o espermiograma incluye una serie de pruebas que evalúan diversos factores o funciones de la célula espermática. Como resultado del análisis seminal podemos calificar a la muestra como apta o no apta para su uso en inseminación artificial. Algunas pruebas disponibles son:

a) Concentración espermática

Es una de las pruebas de análisis seminal más importante. Existe variabilidad muy grande en la concentración de un eyaculado a otro, siendo importante conocer el número de espermatozoides por eyaculado, ya que de este parámetro depende el número de hembras a inseminar.

La concentración puede calcularse por varios métodos a partir de una muestra de semen. Entre estos métodos destaca la espectrofotometría, colorimetría, citometría de flujo y uso de cámara de recuento celular como las de Bürker, Neubauer o Thoma.

La espectrofotometría es un método indirecto, capaz de medir la luz monocromática absorbida por las partículas en suspensión o los espermatozoides. La medición de la densidad óptica de la muestra es comparada frente a una curva estándar patrón previamente validada.

El método de citometría de flujo, es también un método indirecto, y determina el número de partículas por unidad de volumen, aunque no puede asegurar que todas las partículas son realmente espermatozoide. Esta técnica utilizada en eyaculados de conejo puede inducir a error debido a la gran cantidad de impurezas que presente el semen (Gonzales-Urdiales, 2002).

Gonzales-Urdiales R. 2002. Contrastación seminal. Cunicultura, 160: 394-399.

El método más extendido es la utilización de la cámara de recuento celular. Este análisis se lleva a cabo mediante el conteo en microscopio óptico a 100X o 400X, empleando por comodidad un contador manual.

Paulenz and Hofino (1996) determinó la concentración espermática de semen de verraco por diferentes métodos, siendo el coeficiente de variación de 12,3% en cámara de recuento, 2,9% en el espectrofotómetro y 2,3% en el citómetro de flujo.

Paulenz H., Hofino P.O. 1996. Routine Assessment of sperm concentration at boar AI station a coulter counter. Reprod. Dom. Anim.; 31(1):257-258

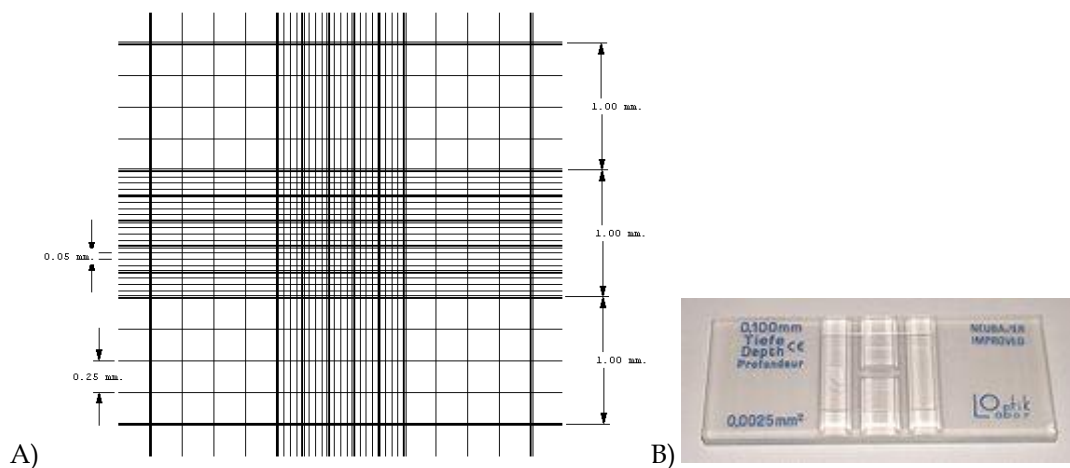


Figura 1: Conteo de espermatozoides en Camara Neubauer. A) Cuadriculas 5 x 5 y B) cámara neubauer

b) Motilidad total

La motilidad es uno de los parámetros más importantes del análisis seminal. Existen varias técnicas de estudio de motilidad, pero la más utilizada y a la vez la más simple es la valoración visual subjetiva del porcentaje de espermatozoides móviles y la calidad de su movimiento. Para la realización de esta valoración todo material usado debe estar en condiciones de normocinesis (temperatura 37° C).

Los espermatozoides pueden presentar 2 tipos de movimientos:

Movimiento de rotación (alrededor de su eje)

Movimiento progresivo (desplazamiento de la célula), el cual a su vez puede ser lineal o circular.

Dentro de la motilidad total un caso especial hace referencia a la denominada “motilidad masal” que es únicamente evaluable en eyaculaciones de mamíferos con concentraciones espermáticas elevadas, como es el caso de rumiantes.

Primero se estima, el porcentaje de espermatozoides que muestran algún tipo de movimiento o “motilidad total”, segundo, el porcentaje de espermatozoides motiles que presentan un movimiento progresivo o “motilidad progresiva”.

c) Integridad de la membrana espermática

La integridad de la membrana espermática ha sido uno de los parámetros más estudiados, por su papel clave en la función espermática. De hecho, el estado de la membrana espermática marca la integridad morfológica y funcional de la célula. La evaluación morfológica se realiza usando la óptica de contraste diferencial de interferencia, la óptica de contraste de fase o las tinciones supravitales como el verde rápido/eosina, la eosina/azul de anilina, el azul tripan/gramíneo o el amarillo de naftol/eritrocina.

Tinción eosina-nigrosina: la proporción de espermatozoides vivos pueden ser determinados por el uso de técnicas de tinción basados en el cual la membrana de células dañadas o muertas pueden tomar algunos colorantes

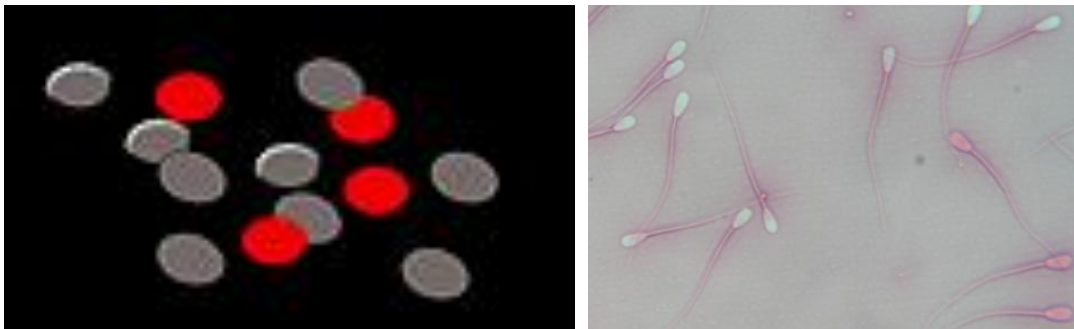


Figura 2 : Tinción Eosina-nigrosina Test

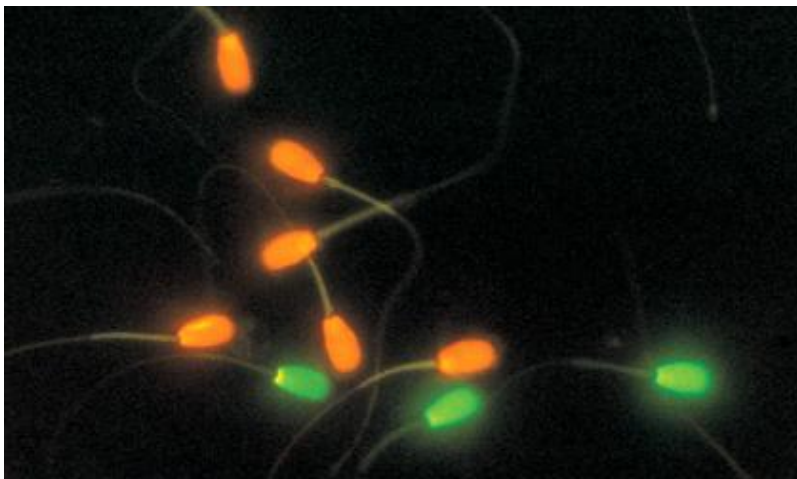


Figura 3: Mezcla de células espermatozoides vivos y muertos, teñidos con LIVE/DEAD® Sperm Viability Kit (Cat. no. L7011). El espermatozoide vivo tiene membrana intacta y tienen la capacidad de teñir con verde fluorescente, y los espermatozoides muertos se pueden teñir con fluorescente rojo-naranja (Imagen de L. Garner, School of Veterinary Medicine, University of Nevada, USDA)

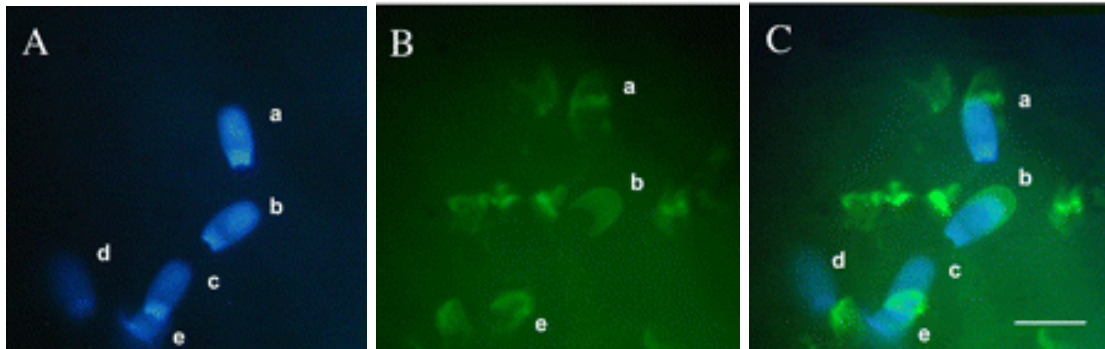


Figura 3: Reacción del acrosoma en la superficie de la zona pelúcida a 400X. A) tinción de ADN. B) tinción del acrosoma C) imágenes combinadas. a y e: espermatozoides con reacción acrosomal; b: espermatozoide con acrosoma intacto; c y d: espermatozoide sin acrosoma

d) Test hipo osmótico.

La prueba de endosmosis (hypoosmotic swelling test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica mas baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un inchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentara cambios en la forma del flagelo

La Prueba- Hypo Osmotic Swelling Test; es una simple prueba basada en la semipermeabilidad de la membrana de una célula intacta en presencia de agua, expandiendo el volumen de la célula

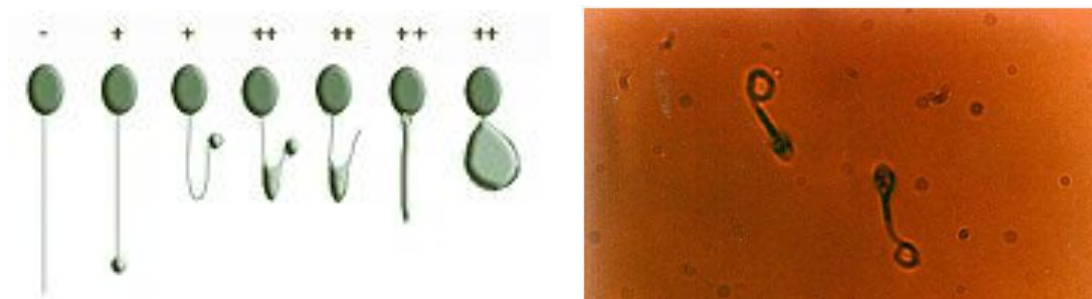


Figura 4: - Hypo Osmotic Swelling Test

Tabla 1: Características del eyaculado - Fracciones

Especie	Tiempo (lapso) de eyaculación	Composición del eyaculado
Toro	1 segundo	Fracción simple
Carnero	1 segundo	Fracción simple
Verraco	5-25 minutos	Fraccionado <ul style="list-style-type: none"> • Libre - espermática • Rica – espermática • Coágulo
Potro	30-60 segundos	Fraccionado <ul style="list-style-type: none"> • Libre - espermática • Rica – espermática • Mucus
Hombre	10-30 segundos	Fracción simple pero coagulado

Fuente: J. Parrish, Department of Animal Science, University of Wisconsin-Madison

Tabla 2: Características del eyaculado - especies

Especie	Eyaculado Volumen (ml)	Concentración Espermática (X 10^9 /ml)	Total Espermatozoides por Eyaculado (10^9)	% Motilidad	% Normales
Toro	8.0	1.5	12	75	95
Carnero	1.0	3.0	3	95	95
Verraco	200	0.25	50	70	90
Potro	80	0.15	12	70	40 - 90
Hombre	2-6	0.15	0.9	65	30 - 70

Fuente: J. Parrish, Department of Animal Science, University of Wisconsin-Madison

CUESTIONARIO

- 1- Completar la información de la calidad de semen de la practica
- 2- Metabolismo del espermatozoide, explique
- 3- Características seminales de alpaca, llama, cuy
- 4- A qué tipo de anormalidades se les considera anormalidades primarias, y por qué?
- 5- ¿Qué parámetros considera el análisis computarizado de semen, CASA?
- 6- ¿Cuál es la correlación de los análisis de semen de laboratorio con la fertilidad?