

Capítulo 4

Procedimientos para la evaluación de semen utilizado en la producción de embriones bovinos

Autores: Ariel Marcel Tarazona Morales, David Andrey Cadavid Betancur, Martha Olivera Angel y Ángela Patricia López Cardona

En un laboratorio de producción de embriones in vitro, así como en centros de reproducción animal, la calidad del semen empleado en las diferentes técnicas de fertilización es fundamental para obtener resultados exitosos. Antes de emprender cualquier procedimiento, es necesario determinar cuáles son los mejores reproductores y cuáles son los que ofrecen mejores resultados en los procesos realizados en cada laboratorio.

La fisiología del espermatozoide ha sido una línea importante en el desarrollo científico del Grupo de Investigación Biogénesis.

Una de nuestras motivaciones principales ha estado orientada a la conservación de especies autóctonas o en peligro de extinción, con el fin de aportar información básica y aplicada sobre la conservación de bancos de germoplasma y sobre el desarrollo de técnicas de inseminación artificial, por ejemplo: caracterizaciones seminales en peces como la sabaleta (*Brycon henni*), en mamíferos como la guagua o el tapir (*Agouti paca*) o en ganado criollo bovino blanco orejinegro. También en especies con interés productivo, como el ganado bovino cebú y en razas lecheras especializadas, en peces como la trucha y la tilapia y en caninos y porcinos, para perfeccionar las técnicas de análisis seminal, evaluar con mayor exactitud la fertilidad de sementales y hacer aportes en cuanto a las técnicas de congelación, inseminación artificial y fertilización *in vitro* de embriones. Algunos de los artículos producidos se encuentran en la bibliografía recomendada al final de este capítulo.

Evaluación macroscópica de semen fresco

- **Propósito:** Describir el procedimiento adecuado para evaluar características macroscópicas en muestras de semen fresco.
- **Materiales:** Tubos cónicos de 15 y 50 ml, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos, puntas para micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Microscopio, micropipetas y potenciómetro.
- **Procedimiento:** Una vez recibida la muestra se procede inmediatamente a la evaluación de los parámetros macroscópicos, así:

Volumen: leer directamente en un tubo de centrifuga graduado, o con una pipeta volumétrica. El volumen de semen varía desde uno hasta ocho centímetros cúbicos. La mayoría de los toros en condiciones normales proporcionan de 2 a 6 ml. Para semen obtenido con electroeyaculador, el volumen puede ser de 10 a 20 ml.

Color: depende de la cantidad de espermatozoides; cuando el semen es de buena calidad, presenta una coloración blanca, marfil o amarilla, y cuando es de baja calidad, su color es opalescente o transparente.

Apariencia: se toman como referencia subjetiva los siguientes patrones relacionados con la consistencia: cremosa, lechosa, serosa o acuosa (ver figura 4.1).

pH: se determina mediante el uso del potenciómetro, o con tirilla de papel para pH. Su valor varía entre 6,4 a 6,9; valores por encima de 6,9 son indicativos de semen de baja calidad.



Figura 4.1. Evaluación macroscópica del semen.

Movilidad masal: colocar una gota de 10 μ l de semen en una lámina portaobjetos previamente temperada a 37°C. Observar al microscopio con un aumento de 10X. En toda la gota se debe observar presencia de ondas y remolinos, que se clasifican así:

Semen muy bueno (+++): presenta ondas oscuras marcadas, con movimiento rápido (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=0cPkop9N4-U>).

Semen bueno (++): se observan ondas menos oscuras que el anterior, marcadas con movimiento moderado (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=y6SWYrkjSb8>).

Semen regular (+): presenta ondas claras con movimiento muy ligero (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=uc-avQiZlJc>).

Semen malo (0): no hay ondas (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=Qacz6BTpVXc>).

Cuadro espermático estándar

- **Propósito:** Indicar el procedimiento para la evaluación del cuadro espermático estándar, que incluye movilidad, morfología, viabilidad y concentración espermáticas.
- **Materiales:** Tubos cónicos de 15 y 50 ml, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Microscopio, micropipetas, vórtex, cámara de Neubauer.
- **Reactivos:** Colorante de Giemsa (solución de trabajo), eosina-nigrosina (solución de trabajo) (ver capítulo 2), aceite de inmersión, metanol (96%), solución salina (NaCl 0,9%).

Procedimiento:

- *Morfología de los espermatozoides:* Este parámetro permite determinar si la muestra tiene un número normal de espermatozoides con morfología normal. De acuerdo al tipo de anomalías detectadas se puede determinar si los daños son compensables o no compensables.
- Realizar un extendido del semen sobre una lámina portaobjetos limpia, poner 10 μ l de la muestra en el extremo de esta y colocar otra lámina portaobjetos sobre la gota de muestra; esperar que se extienda por capilaridad e inclinarla en un ángulo de aproximadamente 45°, deslizar suavemente esta lámina sobre la primera y dejar secar el extendido.
- Fijar la muestra extendida sumergiéndola durante diez minutos en metanol (96%) previamente refrigerado a 4°C. Sacar la lámina del metanol y dejarla secar.
- En un tubo de 15 ml o 50 ml, según las láminas a colorear, realizar una dilución del colorante así: por cada lámina, poner 3 ml de agua destilada y 15 gotas del colorante Giemsa, adicionar esta mezcla sobre la lámina y esperar 30 minutos.
- Lavar suavemente con agua del grifo y dejar secar.
- Observar al microscopio con objetivo de 100X, colocando aceite de inmersión.
- Realizar la evaluación morfológica de los espermatozoides, contar 200 espermatozoides y anotar cuántos son normales y cuántos anormales, definiendo el tipo de anomalía. Expresar el resultado en porcentaje (ver figura 4.2).
- *Viabilidad:* Esta prueba permite determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en la muestra.
- Colocar en el extremo de una lámina portaobjetos 10 μ l de semen y 10 μ l de colorante (eosina-nigrosina) y mezclar bien las dos gotas. Tanto la placa como el colorante deben estar temperados a 37°C.
- Colocar otra lámina nueva sobre la gota, esperar a que se extienda por capilaridad e inclinarla en un ángulo de aproximadamente 45°, deslizar suavemente esta lámina sobre la primera y dejar secar.
- Observar al microscopio con objetivo de 100X, contar 200 espermatozoides y clasificarlos según las siguientes características: citoplasma rosado, espermatozoides muertos; citoplasma transparente, espermatozoides vivos.
- La viabilidad se registra en porcentaje de espermatozoides vivos (ver figura 4.3)
- *Movilidad individual:* Evalúa la capacidad de los espermatozoides para moverse en forma rectilínea progresiva.



Figura 4.2. Evaluación de morfología espermática. Coloración de Giemsa.

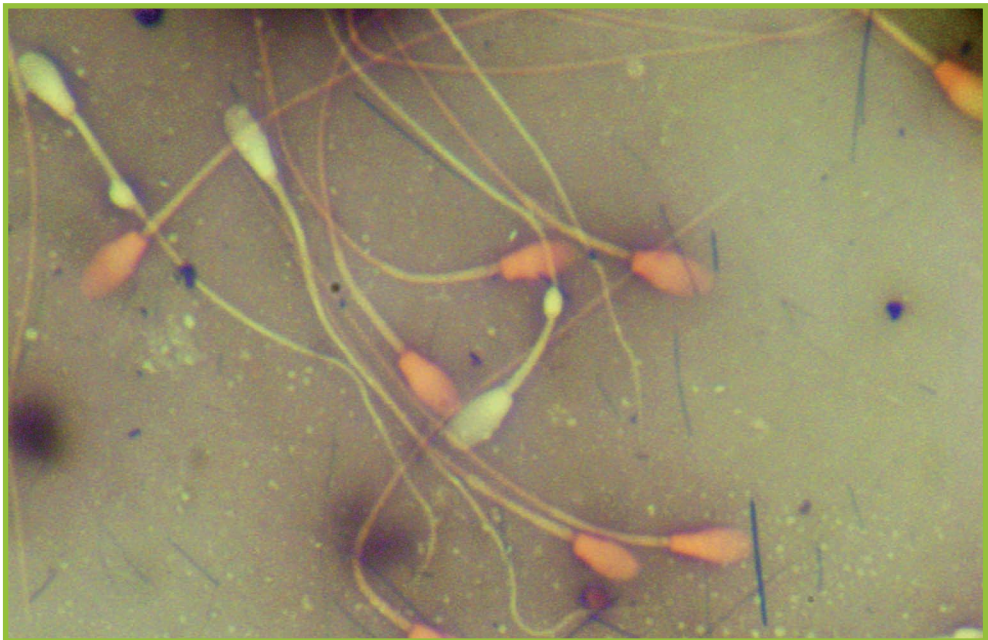


Figura 4.3. Evaluación de viabilidad espermática. Espermatozoides muertos con coloración rosada en la cabeza. Coloración de eosina-nigrosina.

- Hacer una dilución 1:20 del semen fresco, colocando 5 µl de semen y 95 µl de solución salina (0,9%), a 37°C, en un tubo de microcentrífuga. Homogenizar con vórtex. Para el caso de semen congelado, no hacer esta dilución.
- Precalear una lámina cubreobjetos a 37°C, adicionar una gota del semen diluido, colocar la laminilla cubreobjetos, y observar al microscopio en 40X.
- Evaluar a los cero, cinco y diez minutos, determinando, subjetivamente, el porcentaje de espermatozoides con movilidad rectilínea, vigorosa, constante y progresiva hacia delante.
- Para la evaluación a cinco y diez minutos, homogenizar la muestra y montar nuevamente el semen en placas precalentadas. Entre cada montaje, la muestra debe guardarse en la incubadora a 37°C. Reportar la evaluación de la siguiente manera:
Semen muy bueno: igual o mayor de 70% de movilidad individual (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=9w3WNDpeucA>).
Semen bueno: 50-69% de movilidad individual.
Semen regular: 30-49% de movilidad individual.
Semen malo: menos de 29% de movilidad individual (ver enlace <http://www.youtube.com/watch?v=8yXOncouHnQ>).
- *Recuento de espermatozoides:* Permite determinar si la concentración de espermatozoides por mililitro de eyaculado se encuentra dentro de los parámetros normales de acuerdo a las características de cada individuo.
- Realizar una dilución 1:20 del semen, en agua destilada, colocando 95 µl de agua destilada en un tubo de microcentrífuga, y adicionar 5 µl de semen. Homogenizar con un vórtex.
- Colocar, cuidadosamente, con una micropipeta, 10 µl de la dilución en cada uno de los lados de la cámara de Neubauer. Dejar un minuto en reposo.
- Contar los espermatozoides de la siguiente forma: del cuadro central de cada cámara, seleccionar cinco cuadrantes; en cada uno de ellos, contar las cabezas de los espermatozoides que se encuentran adentro y las que están tocando los bordes (línea triple) inferior e izquierdo (ver figura 4.4).
- Calcular con la fórmula de la figura 4.5 la concentración de espermatozoides. El resultado se registra como millones de espermatozoides por mililitro.

Test hiposmótico (HOST)

- **Propósito:** Describir el procedimiento adecuado para realizar el test hiposmótico, que determina la capacidad de la membrana plasmática espermática para realizar endosmosis positiva.

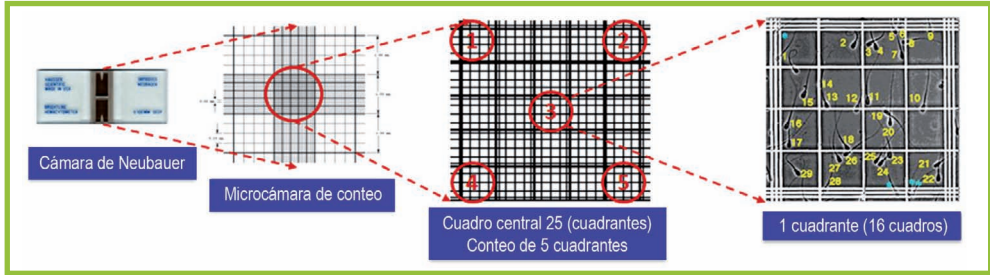


Figura 4.4. Metodología de conteo de células espermáticas en cámara de Neubauer.

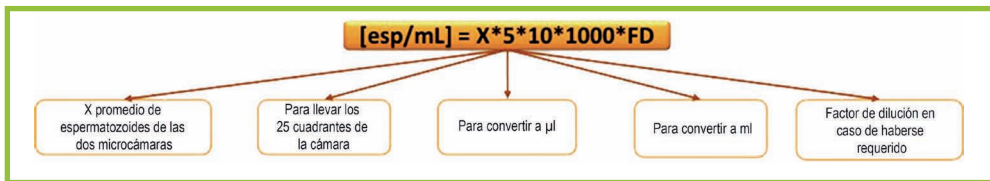


Figura 4.5. Explicación de la fórmula para el cálculo de concentración espermática en una muestra de semen.

- **Materiales:** Tubos cónicos de 15 y 50 ml, láminas portaobjetos y laminillas cubreobjetos, puntas para micropipetas.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Equipos:** Microscopio, micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1000 µl, vórtex.
- **Medios:** Solución hiposmótica para test de Host (ver capítulo 2), solución salina o solución isosmótica (NaCl 0,9%).

Procedimiento:

- Diluir 50 µl de semen en 1 ml de solución hiposmótica. Preparar un control, diluyendo 50 µl de semen en 1 ml de solución salina. Incubar ambos a 37°C durante 30 minutos.
- Realizar un extendido de la muestra y del control, sobre láminas portaobjetos. Dejarlas secar al aire.
- Fijar las placas con metanol al 96%, a 4°C, durante 10 minutos, y luego dejarlas secar al aire (ver figura 4.6).
- Observar bajo microscopio de contraste de fase y realizar conteo de 200 células, teniendo en cuenta que los espermatozoides con endosmosis positiva presentarán la cola hinchada y enroscada. Los espermatozoides con endosmosis negativa presentan un aspecto normal (ver figura 4.7). Los resultados se calculan con la siguiente fórmula:

EP = EPM-EPC

EP: Endosmosis positiva, EPM: Endosmosis positiva de la muestra, EPC: Endosmosis positiva del control

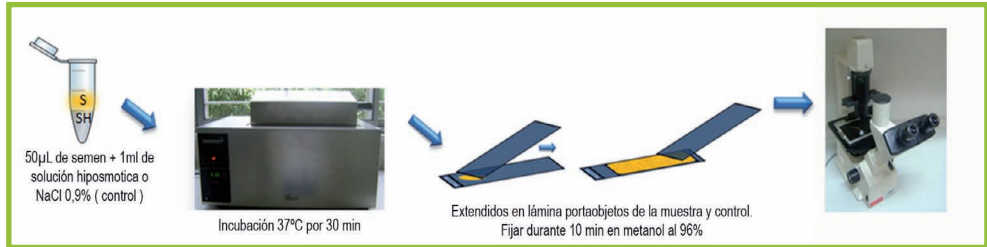


Figura 4.6 Diagrama de la prueba del test hiposmótico.



Figura 4.7. Espermatozoides con endosmosis positiva presentarán la cola hinchada y/o enroscada y espermatozoides con endosmosis negativa presentan un aspecto normal y su cola se observa en forma de látigo.

Los criterios de evaluación (desde muy malo hasta muy bueno) se estiman según el porcentaje de colas hinchadas vistas en la evaluación (ver tabla 4.1.)



Tabla 4.1. Resultados expresados en porcentaje de colas hinchadas y criterios de evaluación.

Muy bueno	> 71%
Bueno	64-71%
Regular	54-63%
Malo	46-53%
Muy malo	< 45%

Prueba de reacción acrosomal

- **Propósito:** Describir el procedimiento adecuado para evaluar la reacción acrosomal de semen bovino.
- **Materiales:** Puntas para micropipetas, tubos de microcentrífuga de 1,5 ml, toallas absorbentes de papel, láminas portaobjetos, laminillas cubreobjetos, agua destilada.
- **Indumentaria:** Trabajo de laboratorio (ver capítulo 1).
- **Medios y reactivos:** Medio de Inducción (MI), Percoll 90 y 45%, PISUM-FITC de trabajo, (ver capítulo 2), alcohol antiséptico, PHE, heparina, Suero Fetal Bovino (SFB), metanol (96%), aceite de inmersión.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, incubadora de CO₂, microcentrífuga, resistencia eléctrica, microscopio de epifluorescencia, gradilla para tubos de microcentrífuga, micropipetas de 10 µl, 100 µl y 1000 µl, tijeras rectas, cámara húmeda.

Procedimiento:

- De cada una de las pajillas, y como control preinducción (0 horas), hacer un extendido (10 µl) de semen recién descongelado o fresco. Marcar muy bien la lámina con un lápiz de cera o un lápiz de punta de diamante.
- Realizar el proceso de separación de la fracción móvil con el gradiente de Percoll. Tener en cuenta que se requiere como mínimo una muestra de 200 µl de semen (ver capítulo 5).
- Para la inducción de la reacción acrosomal, colocar 100 µl del semen recuperado post-Percoll en el medio de inducción (MI). Homogenizar por pipeteo.
- Cerrar bien los tubos de microcentrífuga e incubar a 38°C durante 24 horas.
- Pasadas las 24 horas de incubación, centrifugar los tubos a 210 G por 5 minutos.
- Retirar el sobrenadante con una pipeta sin perturbar el pellet formado.

- Usando 10 µl del pellet de cada tubo, realizar un extendido en cada lámina, marcar muy bien las láminas con el lápiz de cera o de punta de diamante y dejar secar las láminas al aire.
- Fijar las láminas (incluyendo el control del día anterior) en metanol frío a 4°C durante 10 minutos y dejar secar sobre papel absorbente.
- Tinción fluorescente del acrosoma:
- Colocar 50 µl de solución de trabajo de PISUM-FITC sobre la muestra fijada poniendo gotas a lo largo de la lámina.
- Extender con mucho cuidado sobre toda la muestra usando una punta para micropipeta de 100 µl (sin tocar la muestra porque los espermatozoides fijados pueden desprenderse).
- Incubar las muestras durante 30 minutos a temperatura ambiente poniendo las muestras en una cámara húmeda (humedecer toallas de papel y ponerlas en un recipiente plástico pequeño).
- Enjuagar las láminas con mucho cuidado usando agua de grifo y dejar secar en un recipiente oscuro por 15 minutos.
- Leer en el microscopio de fluorescencia. Los acrosomas se deben observar de color verde fluorescente al evaluar la muestra.
- Realizar la evaluación de la reacción acrosomal contando 200 espermatozoides en cada lámina y teniendo en cuenta los siguientes criterios (ver figura 4.8).



Figura 4.8. Diagrama de la prueba de reacción acrosomal con PISUM-FITC

Sin reacción: Se observa el acrosoma intacto. El borde es continuo y liso.

Reacción parcial: Se observa el acrosoma parcialmente o el borde es dentado y discontinuo.



Reacción completa: Se observa solamente una banda fluorescente en la línea ecuatorial de la cabeza espermática (ver figura 4.9).

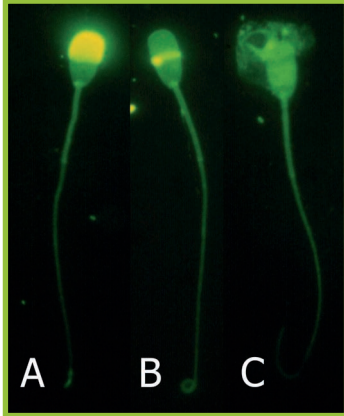


Figura 4.9. Reacción acrosomal con tinción PISUM-FITC.

- A. Espermatozoide sin reacción;
- B. Espermatozoide con reacción parcial;
- C. Espermatozoide reaccionado.

La reacción acrosomal debe ser evaluada a las 0, 24 y 48 horas con el fin de determinar si esta aumenta con el paso de las horas como ocurre normalmente en el tracto reproductivo de la hembra.

El resultado final se reporta en porcentajes de acuerdo a los tres estados de los espermatozoides anteriormente mencionados. A las 0 horas la cantidad de espermatozoides reaccionados debe ser inferior al 15% y se debe incrementar paulatinamente con el paso de las horas.



Bibliografía recomendada

- Berdugo J et al (2000). Perfil espermático de un grupo de pacientes y de voluntarios en Medellín, Colombia. *Rev Urolog Colomb* 9(2): 37-42.
- Betancur J (2008). Estandarización del manejo y la criopreservación de semen de hembras masculinizadas de trucha arco iris. *Rev Col Cienc Pec* 21(3): 340-350.
- Fresneda A et al (2004). Espermiación inducida y criopreservación de semen de Cachama Blanca (*Piaractus brachipomus*). *Rev Col Cienc Pec* 17(2): 46-52.
- Hoyos D et al (2001). Sperm characterization in Agouti paca and Agouti taczanowskii. *Int J Androl* 1(1): 37-41.
- Olivera M et al (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev Col Cienc Pec* 19(4): 426-436.
- Olivera M et al (2006). Evaluación de la reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio: una aproximación más real de la capacidad fecundante del espermatozoide. *Andrologia* 59(5): 501-510.
- Tabares CJ et al (2004). Evaluation of some inhibitor and activator factors in semen from Brycon henni. *Biol reprod* 70(3): 129-129.
- Tabares CJ et al (2005a). Evaluación de algunos iones sobre la activación de la movilidad espermática y potencial de membrana en Brycon henni. *Rev Col Cienc Pec* 18(3): 335-336.
- Tabares CJ et al (2005b). Fisiología de la activación del espermatozoide en peces de agua dulce. *Rev Col Cienc Pec* 18(2): 149-161.
- Tabares CJ et al (2006). Efecto de la pluviosidad y el brillo solar sobre la producción y características del semen en el pez Brycon henni (Pisces: Characidae). *Rev Biol Tropic* 54(1): 179-187.
- Tabares CJ et al (2007). Effect of some ions on sperm activation Brycon henni (Eigenmann 1913). *Acta Biolog Colomb* 12(1): 87-98.
- Urrego R et al (2008). Efecto de la centrifugación sobre la membrana plasmática y el ADN de espermatozoides bovinos. *Rev Col Cienc Pec* 21(1): 19-26.
- World Health Organization (2010), WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5ª ed., WHO.

