



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESTABLECIMIENTO DE UNA TÉCNICA DE DOBLE TINCIÓN ALTERNATIVA  
PARA LA EVALUACIÓN MORFOLÓGICA, VITAL Y ACROSOMAL,  
SIMULTÁNEA, DE LOS ESPERMATOZOIDES DE CANINOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ANGEL JONATHAN BALDERRAMA GAMBOA

Asesor: M en MVZ Rafael Eduardo Paz Benito

Ciudad Universitaria, Cd.Mx.

2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

*A mi madre Virginia y a mi padre Gregorio,*

*¡GRACIAS!*

*A mis amigos por su apoyo.*

*A Ban con amor.*

AGRADECIMIENTOS

- A mi Asesor - Maestro - Amigo, Rafael Paz.
- A la doctora Hilda Guerrero del Departamento de Reproducción.
- A mi jurado de examen
- A mis amigos de la clínica de reproducción canina: Guillermo Estudillo, Celeste Valdez, Wendy Pérez.
- A Paola Vélez, reto aceptado.

## CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO	5
JUSTIFICACIÓN	31
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO	32
MATERIAL Y MÉTODOS	32
RESULTADOS	46
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	57
ANEXO	59
LITERATURA CITADA	60

**RESUMEN**

**BALDERRAMA GAMBOA ANGEL JONATHAN. ESTABLECIMIENTO DE UNA TÉCNICA DE DOBLE TINCIÓN ALTERNATIVA PARA LA EVALUACIÓN MORFOLÓGICA, VITAL Y ACROSOMAL SIMULTÁNEA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE CANINOS. Bajo la supervisión del M. en MVZ Rafael Eduardo Paz Benito.**

La tinción de eosina-nigrosina es la técnica de rutina más ampliamente empleada para el análisis de la morfología y de la vitalidad espermática. Ésta tinción es práctica, sencilla y permite una buena visualización de los espermatozoides en un microscopio fotónico de campo claro. Sin embargo, con ella no es posible visualizar estructuras especializadas del espermatozoide como el acrosoma, para lo cual es necesario llevar a cabo otras técnicas, como la tinción de azul de coomassie, la cual es laboriosa, costosa y conlleva un tiempo de realización de aproximadamente 1 hora.

En el presente trabajo se elaboró una doble tinción que consta de azul tripán y rosa de bengala, la cual tiene como finalidad identificar en un mismo momento y campo visual del microscopio de fondo claro la vitalidad, las anomalías espermáticas y la presencia de acrosoma.

Para ello se obtuvo el semen de 30 perros que acudieron a la Clínica de reproducción canina de la FMVZ-UNAM y cada eyaculado fue separado en 3 partes iguales para procesarlos con 3 tinciones distintas: la tinción de eosina-nigrosina, la de azul de coomassie y la de azul tripán-rosa de bengala. Los datos se analizaron por el método estadístico de correlación el cual mostró una correlación positiva entre la tinción de eosina-nigrosina y la de tripán-bengala para evaluar la mortalidad ( $r_p = 0.90$ ) y las anomalías espermáticas ( $r_p = 0.87$ ). La tinción de azul de coomassie también mostró una correlación positiva con la tinción tripán-bengala ( $r_p = 0.92$ ) para la valoración del acrosoma. En conclusión, el presente trabajo demostró la tinción azul tripán-rosa de bengala puede ser empleada como una tinción para evaluar simultáneamente la morfología, la viabilidad y el estado del acrosoma en el semen del perro doméstico.

## INTRODUCCIÓN

El espermatozoide es una célula altamente modificada y especializada cuya finalidad es propagar los genes paternos. Para cumplir dicha función realiza adaptaciones durante su formación y maduración en el aparato reproductivo del macho.

La evaluación del semen es parte fundamental en el examen de la capacidad reproductiva del macho canino, el cual nos permite predecir la fertilidad actual y futura en un periodo corto de tiempo. Ello nos ayuda a seleccionar a los ejemplares aptos para la reproducción, y tratar a los individuos enfermos, por afecciones como: prostatitis, epididimitis, orquitis, aplasia segmentaria, e infertilidad, entre otras.

Dentro de la evaluación del semen (espermiograma o seminograma) se analizan las características macroscópicas y las microscópicas, entre las que se incluyen los diagnósticos: de morfología, de vitalidad y de integridad del acrosoma (Cerezo *et al.*, 2014).

Una buena evaluación del semen resulta esencial, pues se ha determinado que la fertilización y el desarrollo embrionario temprano exitoso dependen de un buen porcentaje de espermatozoides normales, vivos y móviles; mientras que un mayor número de anomalías espermáticas reduce la fertilidad (Oettlé, 1993; Hafez y Hafez, 2000; Feldman y Nelson, 2004; Aksoy y Aktan, 2012; Cerezo *et al.*, 2014).

La valoración del estado acrosomal es otro punto crítico en la evaluación del semen, aunque en la práctica cotidiana es poco o nulumamente evaluado en perros. Se ha demostrado una alta correlación entre la capacidad del espermatozoide para unirse a la zona pelúcida del ovocito y realizar la reacción acrosomal, con el buen estado del acrosoma (Cerezo *et al.*, 2014).

Entre las tinciones complementarias para la evaluación del semen se utilizan las de azul de coomassie o rosa de bengala para evaluar acrosoma de los espermatozoides de diferentes mamíferos (Croos, 1989; Brum, 2006).

La doble tinción que se propone en el presente trabajo, que consta de los colorantes azul tripán y rosa de bengala, tiene como finalidad poder identificar en un solo paso espermatozoides vivos y muertos, anomalías y presencia o ausencia del acrosoma. Todo ello con el propósito de

realizar una evaluación más detallada en forma sencilla, que ayude a estimar mejor la fertilidad en perros.

## **MARCO TEÓRICO**

El examen morfológico de las anormalidades en los espermatozoides, se realiza contabilizando el porcentaje de espermatozoides que presentan alguna malformación (Las anormalidades pueden encontrarse principalmente en la cabeza y en la cola de la célula, ya que las alteraciones del cuello son poco frecuentes) (Oettlé, 1993).

Dependiendo del momento en el que se origine una anormalidad, pueden clasificarse como de tipo primario -las provocadas durante la espermatogénesis- o de tipo secundario -ocasionadas durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo al momento de la eyaculación o bien por la manipulación durante el análisis de la muestra- (Kolster, 2018).

### **❖ Espermatogénesis**

La espermatogénesis es el proceso por el cual la espermatogonia da origen a los espermatozoides, y al mismo tiempo mantiene constante su número de población, siendo un proceso continuo desde el inicio de la pubertad. El

propósito principal de la espermatogénesis es producir de manera constante espermatozoides móviles y capaces de fecundar. Los rangos de producción espermática varían de acuerdo a la especie, en el caso de los caninos es de 200 a 300 millones de espermatozoides por mililitro (England y Harvey, 1998; De Jonge y Barrat, 2006; Glover, 2012; Rangel y Hernández, 2018).

Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales se originan en el endodermo del saco vitelino y migran por el mesenterio dorsal hacia las gónadas indiferenciadas. Desde su migración llevan a cabo la mitosis, dando origen a un gran número de gonocitos, células que se diferencian y que en la pubertad dan origen a las espermatogonias tipo  $A_0$  (Hafez y Hafez 2002; McGeady et al., 2006).

Las espermatogonias ( $A_0$ ) son células relativamente indiferenciadas que se localizan junto a la membrana basal de los túbulos seminíferos, las cuales se activan al llegar a la pubertad y originan a más espermatogonias  $A_0$ . En este punto existen dos caminos para las células hijas:

- Se mantienen como espermatogonias  $A_0$  de reserva o
- Se diferencian a espermatogonias  $A_1$  que continúan dividiéndose hasta alcanzar el estadio de espermatoцитos primarios para dar origen a los

espermatozoides (England y Harvey, 1998; Rangel y Hernández, 2018).

La espermatogénesis tiene 3 fases bien diferenciadas: espermatocitogénesis o fase proliferativa (espermatogonias), fase meiótica (espermatocitos) y fase de espermiogénesis o diferenciación (espermátides) (Russell *et al.*, 1990).

- **Espermatocitogénesis o fase proliferativa**

En ésta etapa la espermatogonia que abandona el estadio de reserva, realiza múltiples divisiones mitóticas. En cada división la célula hija permanece unida a la célula madre mediante un puente citoplasmático, formándose lo que se denomina clona, que es un conjunto de células que realizan mitosis de manera sincronizada. Cada célula hija continúa siendo una espermatogonia, pero se les identifica como A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> (Russell *et al.*, 1990; Rangel y Hernández, 2018).

Al llegar al estadio de A<sub>4</sub>, la espermatogonia realiza una mitosis más y se convierte en espermatogonia I o intermedia, y se vuelve a dividir por mitosis para dar origen a una espermatogonia B. Ésta última célula se diferencia a espermatocito primario, concluyendo así

con la etapa de espermatocitogénesis (Hafez y Hafez 2002; Rangel y Hernández 2018).

Durante toda la etapa proliferativa se realiza la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN), de tal forma que el espermatocito primario ingresa a la fase meiótica con un número normal de cromosomas,  $2n$  ( $n$ , es el número de cromosomas de la especie) pero con el doble en la cantidad de ADN,  $4c$  ( $c$ , es la cantidad de ADN en un par de cromosomas, siendo  $2c$  la cantidad normal) (Carlson, 2001).

- **Fase meiótica**

En esta etapa el espermatocito primario inicia la meiosis, proceso por el cual el número de cromosomas se reduce a la mitad.

- Meiosis I

La primera división meiótica tiene como característica una profase excepcionalmente larga, y es en paquiteno, sub etapa de la profase, donde se da la recombinación, entrecruzamiento o crossing over del material genético. Esto permite que las células germinales adquieran una recombinación genética única, distinta al resto de las células somáticas. Cada célula resultante de la meiosis I tiene una configuración  $1n\ 2c$ , es decir, son células

haploides, pero cada cromosoma consta de 2 cromátides unidas aún por el centrómero (Russell *et al.*, 1990; Carlson, 2001).

➤ Meiosis II

La célula que se origina de la meiosis I es el espermatocito secundario y es ésta célula la que inicia la meiosis II. Como características de esta meiosis se puede mencionar que es significativamente más corta que la meiosis I y las células resultantes tienen la mitad del número de cromosomas (en el caso del perro es de 39 pares), es decir son células haploides verdaderas ( $1n\ 1c$ ), llamadas espermatidas (Russell *et al.*, 1990; Carlson, 2001).

● **Fase de diferenciación o espermiogénesis**

Las espermatidas resultantes de la meiosis II son las que entran en esta etapa de metamorfosis, en la que ya no ocurren divisiones celulares. Son células redondas que llevan a cabo cambios morfológicos como: eliminación de citoplasma, condensación de la cromatina nuclear, formación del flagelo, desarrollo del acrosoma, etc. Dichos cambios están enfocados a formar una célula con capacidad de movimiento. Las etapas reconocidas de la espermiogénesis son 4 (Hafez y Hafez 2002).

**1) Fase de Golgi:** primero se forman gránulos pro-acrosomales en el aparato de Golgi que empiezan a unirse en la envoltura nuclear para formar un gránulo acrosómico. El centriolo proximal migra hacia el núcleo, polo basal, para formar la unión de la cabeza con el flagelo (Hafez y Hafez, 2002).

**2) Fase de encasquetamiento:** el gránulo pro-acrosomal comienza a expandirse sobre el núcleo de la espermatida, hasta cubrir aproximadamente dos tercios de la superficie del núcleo, adhiriéndose íntimamente a la envoltura nuclear. El centriolo distal desarrolla los componentes axonémicos del flagelo, con dos túbulos centrales rodeados de nueve pares de microtúbulos (Hafez y Hafez, 2002).

**3) Fase acrosómica:** el núcleo cambia de su forma redonda a plana y alargada, la cromatina se condensa y las histonas son reemplazadas por protaminas, el acrosoma adherido al núcleo se condensa y alarga junto con el núcleo; los cambios ocurridos en la forma del núcleo y del acrosoma son regulados por la célula de Sertoli. A la par del cambio en la morfología del núcleo, la membrana plasmática se repliega hacia la parte caudal del núcleo, donde rodea al flagelo en desarrollo. En esta estructura los microtúbulos se asocian y forman

una vaina cilíndrica, al tiempo que el cuerpo cromatoide (RNAm que sirve para la diferenciación celular pos meiosis) se condensa en el axonema y da origen al anillo citoplasmático. Las mitocondrias se concentran cerca del axonema, donde más tarde en el desarrollo formarán la pieza media (Hafez y Hafez, 2002).

**4) Fase de maduración:** en el núcleo la cromatina se condensa aún más, las histonas son completamente sustituidas por las protaminas, llenando de manera uniforme al núcleo de la espermátida. Se forma una vaina fibrosa que cubre al axonema y a los 9 pares de microtúbulos que lo rodean. El anillo citoplasmático migra de la parte caudal del núcleo a la parte final del segmento medio. Las mitocondrias se acomodan de forma helicoidal y se extienden desde el cuello hasta el anillo citoplasmático. Por último, la célula de Sertoli reabsorbe el exceso de citoplasma proveniente del espermatozoide en una estructura redonda llamada cuerpo residual, y a las espermátides mal formadas o muertas. La presencia del cuerpo residual marca el final de la espermiogénesis y el comienzo de la espermiación (Hafez y Hafez, 2002).

- **Espermiación**

Es la liberación de los espermatozoides de las células de Sertoli hacia la luz del túbulo. El cuerpo residual representa aproximadamente un cuarto del volumen total del espermatozoide, contiene: ARN, organelos, cuerpos de inclusión y citoplasma. Se encuentra unido por un filamento de citoplasma a la pieza media del espermatozoide, cabe mencionar que es la última estructura que se encuentra dentro de las células de Sertoli. Cuando el filamento se rompe, el espermatozoide es liberado y se forma la gota citoplasmática proximal (Russell et al., 1990; Hafez y Hafez, 2002).

- **Maduración**

Los cambios que tiene el espermatozoide durante su tránsito por el epidídimo son necesarios para adquirir la capacidad fecundante; este proceso dura aproximadamente de 10 a 15 días en el perro. Entre los cambios más importantes se encuentran:

- A. Desarrollo de movilidad anterógrado.
- B. Cambio en el arreglo y metabolismo de las mitocondrias en el flagelo.
- C. Compactación final de la cromatina nuclear espermática
- D. Estabilización de la membrana plasmática del espermatozoide.
- E. Movimiento y eliminación de la gota citoplasmática

F. Reducción del tamaño del acrosoma (Hafez y Hafez, 2002).

### ❖ Estructura y función del espermatozoide

Los espermatozoides de los mamíferos son células con una arquitectura muy particular; tienen una cabeza, un cuello, la pieza media y el flagelo. Éste último se divide en pieza principal y pieza terminal, y tiene una longitud total de  $68 \pm 0.3 \mu\text{m}$ . Esta estructura tan especializada de los espermatozoides tiene la finalidad de permitirle moverse, alcanzar y penetrar las envolturas del ovocito, traspasar su material genético, y fertilizar al mismo (England y Harvey, 1998; Abou-Haila y Tulsiani, 2000).

#### **Cabeza**

El espermatozoide del perro tiene una cabeza con forma de espátula (similar a la del gato, el conejo y el toro), la cual mide  $7 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$  (England y Harvey, 1998).

La cabeza contiene:

- **Núcleo.** Compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN) súper condensado, gracias a la ayuda de proteínas cargadas positivamente, llamadas protaminas, que han reemplazado a las histonas durante la espermiogénesis. Este cambio compacta el material genético y por lo tanto al núcleo, lo que le confiere a la célula una

forma hidrodinámica. El núcleo del espermatozoide se encuentra envuelto por la membrana nuclear modificada, ya que se han eliminado la mayoría de los complejos de poros nucleares, estructuras formadas de proteínas llamadas nucleoporinas, que funcionan como compuertas para la entrada y la salida, del núcleo, de moléculas como: RNAm, RNAt, hormonas, iones, vitaminas, ácidos grasos y proteínas menores a 20 kDa (De Jonge y Barrat, 2006; Ortega et al., 2010).

- **Teca perinuclear o matriz perinuclear.** Escudo rígido compuesto de proteínas conglomeradas, unidas por puentes disulfuro. También permite anclar la membrana acrosomal interna y dar estabilidad al acrosoma. En la línea ecuatorial, la teca perinuclear y la membrana acrosomal externa e interna se pliegan; es en ésta área donde se encuentran las adhesinas -proteínas encargadas de la unión del espermatozoide con a la membrana del óvulo- (De Jonge y Barrat, 2006).
  
- **Acrosoma.** Estructura sacular, membranosa y secretora, derivada del aparato de golgi, presente en el espermatozoide de todos los mamíferos, que cubre la porción anterior de la cabeza. Se compone de una membrana acrosomal interna, inmediatamente arriba del núcleo espermático y una membrana acrosomal externa,

que yace debajo de la membrana plasmática del espermatozoide. El acrosoma tiene 2 funciones principales:

1. Ayudar a la fusión de la membrana espermática con la membrana del ovocito u oolemma (Foster y Gerton, 2016).
2. Sitio de almacenaje y liberación de enzimas, necesarias para la unión y penetración del espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito (Foster y Gerton, 2016).

Entre las múltiples enzimas acrosomales que ayudan al espermatozoide a penetrar la zona pelúcida, para fertilizar al ovocito, tenemos:

- glicohidrolasas
- proteasas
- esterases
- fosfatasas
- arilsulfatasas (Abou-Haila y Tulsiani, 2000; Zeginiadou *et al.*, 2000).

## **Cuello**

El cuello es la región donde se conecta la cabeza con el flagelo. Debajo del núcleo espermático se encuentran la placa basal y la fosa de implantación, estructuras formadas

por el centriolo proximal -rodeado de 9 fibras estriadas, prolongaciones de los microtúbulos que forman al flagelo- el cual también funciona como sitio de anclaje del flagelo al núcleo. Esta región recibe el nombre de capitulum (De Jonge y Barrat, 2006; Bragina y Bocharova, 2017).

### **Pieza Media**

Lugar donde se inserta el flagelo, tiene una longitud de  $11\pm 0.2\mu\text{m}$ . Es una estructura rígida, cubierta por mitocondrias en forma de hélice (de 75 a 100 mitocondrias). Es la encargada de producir la energía necesaria para activar al flagelo y generar el movimiento anterogrado del espermatozoide (De Jonge y Barrat, 2006; Glover, 2012).

### **Flagelo**

El flagelo tiene una longitud de  $50\pm 0.3\mu\text{m}$ . Está formado por un núcleo o axonema, el cual está compuesto por 2 microtúbulos centrales rodeados por 9 pares de microtúbulos, cada pareja de microtúbulos está unida a otra, por una proteína llamada nexina; el microtúbulo interno de cada uno de los 9 pares de microtúbulos contiene los "brazos de dineína", proteína esencial para el movimiento flagelar.

El flagelo se divide en 2 partes:

- **Pieza principal:** representa  $2/3$  de la longitud del flagelo. En la parte más externa del axonema y rodeando a los 9 pares de microtúbulos se encuentra un escudo fibroso de 9 túbulos, que le otorgan rigidez a esta sección. En ésta región también encontramos enzimas glucolíticas (hexoquinasa 1, lactato deshidrogenasa, gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa) encargadas de proporcionar la energía necesaria para el movimiento flagelar.
- **Pieza terminal:** representa el último tercio del flagelo. Ésta parte del tiene un movimiento fluido, ya que no todos los túbulos que conforman el escudo fibroso del la pieza principal se extienden hasta la parte final (England y Harvey 1998; Glover, 2012; Bragina y Bocharova, 2017).

### ❖ **Evaluación del semen canino o Espermograma**

El espermograma es una herramienta de alto valor en el manejo reproductivo de los caninos, ya que permite seleccionar al semental, con el consecuente incremento en la tasa de preñez y de las pariciones. La calidad del semen es reflejo del estado de salud general, y en específico del testículo, el epidídimo y la próstata (Corrada *et al.* 2002; Kolster, 2018).

El espermograma, como herramienta diagnóstica en la práctica de la clínica reproductiva de las pequeñas especies, se emplea cuando:

- Se utiliza la inseminación artificial para gestar a una perra.
- Un macho realiza servicios repetitivos y la hembra no queda gestante.
- Se desea emplear herramientas de conservación de semen por refrigeración o congelación, para saber si el semen elegido puede soportar el proceso.
- Hay sospecha de enfermedades del tracto genitourinario (Corrada *et al.* 2002).

Las principales evaluaciones que se le realizan al semen para dar un criterio de calidad, son:

- 1) Evaluación macroscópica (Volumen, color y pH).
- 2) Evaluación microscópica (Movilidad, concentración, morfología y mortalidad) (Kolster, 2018).

### **Evaluación macroscópica:**

1. **Volumen:** la eyaculación del perro se lleva a cabo de forma fraccionada, y es posible reconocer 3 partes a simple vista, la primera fracción proviene de la próstata, con un volumen de 0.5 a 2 ml, y representa aproximadamente entre el 2 y el 3% del eyaculado. La segunda fracción o epididimaria tiene

un volumen de 0.5 a 2 ml y representa entre el 6 y el 7 % del eyaculado, y la tercera o fracción prostática representa entre el 70 y el 90 % del eyaculado, con un volumen de 0.5 ml a 20 ml.

2. **Color:** Es una evaluación subjetiva, que puede orientar en la concentración del eyaculado, así como para detectar contaminaciones o afecciones del aparato reproductor. El color blanco opalescente es común en la segunda fracción por ser la porción rica en espermatozoides, y el color traslúcido es característico en las fracciones primera y tercera. Se puede inferir que una muestra traslúcida no contiene espermatozoides y una muestra lechosa contiene espermatozoides, sin embargo, no quiere decir que los espermatozoides en una muestra de color blanco estén vivos lo cual debe corroborarse al microscopio. Una muestra amarilla indica orina en el semen, el color café sugiere sangrado interno uretral o prostático, mientras que el color rojo cereza se relaciona con sangre fresca, mayormente asociada a afecciones agudas en próstata o traumatismos en el pene.

Es importante identificar en qué fracción del eyaculado se presenta la coloración anormal para determinar dónde se encuentra la alteración que origina el cambio de color.

3. **Ph:** El ph del líquido seminal del perro oscila entre 6 y 7.3, con un valor promedio de 6.8. Está fuertemente influenciado por la secreción prostática, de naturaleza ácida, y el metabolismo espermático, en el que al realizar la fructólisis y la glucólisis se forma ácido láctico.

### **Evaluación microscópica:**

4. **Motilidad y vigor:** Es una evaluación dinámica que se realiza inmediatamente después de haber colectado al perro. Los espermatozoides deben tener un movimiento anterógrado y rápido. Al mismo tiempo, requieren ser capaces de atravesar el campo en un tiempo de 2 a 5 segundos. La motilidad se clasifica, de acuerdo al porcentaje de espermatozoides que atraviesan el campo, como:

■ *Excelente:* 80 - 100%

■ *Buena:* 60 - 70%

■ *Regular:* 40 - 50%

■ *Mala:* >40%

(Corrada *et al*, 2002; Kustritz, 2007; Buriticá *et al*, 2009; Cerezo *et al*, 2014).

5. **Morfología:** Si bien la morfología de los espermatozoides no es el único factor que determina la fertilidad o infertilidad en los caninos, las anomalías espermáticas están relacionadas con

alteraciones en la movilidad y por lo tanto en la capacidad de fertilización. Las anomalías morfológicas son de tipo primario (ocasionadas durante la espermatogénesis en el testículo), o de tipo secundario (ocurridas durante la maduración del espermatozoide en el epidídimo o en el manejo de la muestra). Los criterios de calidad del eyaculado varían de acuerdo al autor, por ejemplo:

1.- <10% de anomalías primarias y 20% de anomalías secundarias, con un total del 30% (Corrada *et al.*, 2002).

2.- <5% de anomalías primarias y 15% de anomalías secundarias, con un total del 20% (Páramo, 2009).

**6. Vitalidad:** Se realiza empleando tinciones vitales (eosina-nigrosina, azul tripán) y obteniendo la proporción de espermatozoides vivos (sin teñir) y muertos (teñidos). El porcentaje de espermatozoides vivos deber ser entre el 70% (Corrada *et al.*, 2002) y el 95% (Buritica *et al.*, 2009).

**7. Acrosoma:** Para poder evaluar ésta estructura con el microscopio de campo claro es necesario emplear tinciones como la de azul de coomassie, el cual se une a las enzimas del acrosoma, permitiendo así su detección y la determinación de la capacidad

fecundante de la muestra evaluada (Brum y Thomas, 2006).

### ● **Anormalidades espermáticas**

Parte fundamental de esta evaluación es realizar un diagnóstico morfológico y de integridad de la membrana ya que se ha reportado una gran cantidad de anomalías morfológicas. Para poder observar al espermatozoide con el microscopio óptico, con el fin de realizar una evaluación, es necesario añadir un contraste diferencial que nos permita distinguir la anatomía y la morfología de la célula, a la par que se tiñen estructuras celulares concretas. También es posible clasificar algunas anomalías que ocurren por aglutinación (cabeza-cabeza, cabeza-cola, cola-cola o aglutinado a otra célula) (Oettlé, 1993).

Ejemplos de anomalías según su localización, son:

- ❖ **Acrosoma:** quistes, distribución anormal, reacción acrosomal, acrosoma hinchado, daño severo, ausencia de acrosoma.

- ❖ **Cabeza:** macrocéfalos, microcéfalos, piriformes, vacuolado, puntiagudo, pleomorfo, estrecho, cabeza suelta.
- ❖ **Pieza media:** gota citoplasmática proximal y distal, ruptura de la pieza media, pieza media retorcida.
- ❖ **Cola:** doble cola, cola doblada, enroscada, punta enroscada.

Las anormalidades también pueden clasificarse de acuerdo al momento en el que se originan:

- **Primarias:** anormalidades ocurridas durante la espermatogénesis (Tabla 1.1).
- **Secundarias:** anormalidades no específicas que pueden ocurrir durante la eyaculación de los espermatozoides, en su paso desde el epidídimo, y hasta el conducto deferente y la uretra. O bien pueden ser ocasionadas por infecciones, traumas o estados febriles, así como por el manejo del semen después de su obtención (Aksoy y Aktan, 2012) (Tabla 1.1 y 1.2).

Tabla 1.1 **Anormalidades primarias frecuentes en el espermograma de los caninos**

	<b>Localización</b>	<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Efecto negativo en la fertilidad</b>
<b>Anormalidad Primaria</b>	Cabeza	Defecto del acrosoma	Superficie irregular, abombado o abollado	Si
		Cabeza piriforme	Estrechamiento en la porción distal de la cabeza	Sin datos
		Macrocéfalo	Cabeza muy grande	Sin datos
		Microcéfalo	Cabeza muy pequeña	Si
	Pieza media	Pieza media doblada	Doblamiento del flagelo de 180° a partir de porción distal de la pieza media	Si

		Gota citoplasmática proximal	Retención de la gota citoplasmática en la porción proximal y la pieza media	Si
	Flagelo	Doble flagelo	Presencia de dos flagelos y una cabeza	Si
		Inserción asimétrica	Desplazamiento de la cola del centro de la cabeza	Si

Modificado de Kolster K, 2018.

Tabla 1.2 **Anormalidades secundarias frecuentes en el espermograma de los caninos**

	Localización	Nombre	Descripción	Efecto negativo en la fertilidad
<b>Anormalidad Secundaria</b>	Cabeza	Cabeza desprendida	Cabeza desprendida de la pieza media y cola	Si
	Pieza media	Gota citoplasmática distal	Retención de la gota citoplasmática en la porción distal de la pieza media	Sin datos
		Pieza media ancha	Pieza media abombada y curvada	Si
	Flagelo	Cola enrollada	Enrollamiento del flagelo a partir de la pieza media	Sin datos

		Cola doblada	Flexionamiento del flagelo	Si
--	--	--------------	-------------------------------	----

Modificado de Kolster K, 2018.

### ❖ **Tinciones**

Las técnicas de tinción adquieren relevancia ya que una mejor evaluación morfológica y de vitalidad determina una fertilización y desarrollo embrionario temprano exitoso. Por el contrario, un mayor número de anomalías espermáticas y un mayor número de espermatozoides muertos, reduce la fertilidad (Hafez y Hafez, 2002; Aksoy y Aktan, 2012).

Para la evaluación de la morfología y de la vitalidad se utiliza de manera rutinaria la tinción de eosina-nigrosina. La nigrosina (tinción negativa, ya que las células expulsan el colorante) permite una buena visualización de los espermatozoides en un microscopio fotónico de campo claro, y la eosina (tinción supravital, por que se aplica el colorante a células, tejidos, secreciones provenientes de organismos vivos) atraviesa la membrana plasmática alterada de los espermatozoides muertos alcanzando el núcleo, por lo que estos adquieren un color rosa pálido a rojo, mientras que los espermatozoides sin teñir, es decir vivos, contrastan contra el fondo teñido por la nigrosina

(Montalvo, 2010; Cerezo *et al.*, 2014; Montuenga *et al.*, 2014).

A pesar de las bondades de la tinción de eosina-nigrosina para la evaluación de las características morfológicas y de la viabilidad, es necesario llevar a cabo otras técnicas de tinción si se desea valorar de forma certera el estado del acrosoma.

El acrosoma es necesario para la penetración del ovocito, ya que éste se encuentra rodeado por la zona pelúcida (complejo bioquímico compuesto por colesterol, fosfolípidos, ácido hialurónico, glicoproteínas y albumina); por lo que el espermatozoide debe llevar a cabo la reacción acrosomal y liberar todas las enzimas que le permitirán atravesar la zona pelúcida, para fusionar la membrana espermática con la membrana del ovocito (oolema) y fertilizarlo. Las técnicas de tinción para acrosoma adquieren relevancia para el manejo reproductivo y la medicina de la reproducción de los caninos, ya que esta estructura es de gran importancia para penetrar y fertilizar al ovocito. Entre las tinciones más frecuentes para evidenciar el estado del acrosoma se encuentran: giemsa, azul de coomassie, spermac, rojo congo y triple tinción (Zeginiadou *et al.*, 2000; Brum y Thomas, 2006; Restrepo *et al.*, 2013).

Una estrategia empleada para evaluar de forma simultánea la vitalidad y la integridad acrosomal, es el uso de más de un colorante para que contrasten entre sí. Se han desarrollado diferentes combinaciones, una de las más utilizadas es la triple tinción compuesta por:

- café de bismarck: tinción de la región post acrosomal
- rosa de bengala: tinción de la región acrosomal
- tripan azul: tinción supravital

Esta técnica se ha empleado en semen de humano, ratón, cabra, cerdo, caballo y borrego (Cross y Meizel, 1989; Vázquez *et al.*, 1992; Zeginiadou *et al.*, 2000).

### **Azul Tripán**

Es un colorante ácido o aniónico, con carga negativa, considerado como colorante de exclusión, es decir, la célula viva, cuya membrana y capacidad osmoreguladora se encuentren intactas, evita la entrada del colorante. Es una técnica de tinción simple, que puede ser usada rutinariamente para valorar el estado de la cromatina en el espermatozoide (WHO, 2001; Montuenga *et al.*, 2014).

Durante la espermiación y el paso de los espermatozoides por el epidídimo, los residuos de cisteína de las protaminas se comienzan a entrecruzar por medio de puentes

disulfuro, con el fin de darle resistencia al núcleo y proteger al material genético de factores físico-químicos contra los que se enfrentará en su camino al sitio de fecundación. El colorante se introduce en las células muertas o dañadas a causa de la disrupción de la membrana citoplasmática y tiñe las porciones de cromatina nuclear que han perdido la compactación debido a la ruptura de los puentes disulfuro (Hernández y Ballesteros, 1998).

Esta tinción es utilizada para cuantificar el número de células vivas en muestras celulares, estudios de oncología y mortalidad en cultivos celulares. Empleada en la evaluación de semen, permite evaluar la morfología espermática y al mismo tiempo diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos (Restrepo *et al.*, 2013; Cerezo *et al.*, 2014; Montuenga *et al.*, 2014).

### **Rosa de Bengala**

Es un colorante derivado del xanteno, ácido y fluorescente, empleado para teñir células muertas o degeneradas y lesiones oftalmológicas en el epitelio superficial de la córnea. En la evaluación reproductiva del macho, esta tinción se emplea sola o en combinación (triple tinción), para teñir el contenido acrosomal (enzimas acrosomales) (Conn, 1953; Restrepo *et al.*, 2013; Montuenga *et al.*, 2014).

**Eosina**

Es un colorante ácido o aniónico, derivado del xanteno. Tinción citoplasmática y de fibras de tejido conectivo, en diferentes tonos e intensidades de rosa, naranja y rojo. Empleado ampliamente para teñir citoplasma, colágeno y en general la arquitectura histológica y tisular (Bancroft y Layton, 2013; Montuenga *et al.*, 2014).

**Nigrosina**

Tinción negativa (expulsión del colorante por las células) que proporciona un aumento del contraste para poder visualizar mejor a los espermatozoides (Montuenga *et al.*, 2014).

**Azul de coomassie**

Colorante aniónico, derivado del triarilmetano, que muestra una gran afinidad por aminoácidos como: tirosina, arginina, lisina e histidina. Cuando la membrana acrosomal se disrumpe o realiza exocitosis, éste se une a través de sus grupos sulfúricos con proteínas y enzimas acrosomales, adquiriendo una tonalidad azul índigo en el polo apical del espermatozoide; esta tinción no permite discriminar espermatozoides vivos de muertos, ni diferenciar si la exocitosis es por un proceso fisiológico (reacción acrosomal) o por uno degenerativo (muerte). Se ha empleado

para evaluar el acrosoma de diferentes especies como humanos, rumiantes, cerdos, conejos, cobayos y ratones. Ésta tinción permite evaluar el acrosoma empleando un microscopio óptico, que es el más común y accesible al médico veterinario que realiza manejo reproductivo (De moreno *et al.*, 1986; Zeginiadou *et al.*, 2000; Brum y Thomas, 2006; Montuenga *et al.*, 2014).

Evaluar la integridad del acrosoma tiene relevancia, ya que es un factor determinante de la capacidad de fertilización del espermatozoide (Brum, 2006).

## **JUSTIFICACIÓN**

Varias tinciones que evalúan por separado la vitalidad, la integridad espermática y el acrosoma, se han desarrollado para hacer una evaluación completa del semen. Se sabe que una de las tinciones más utilizadas es eosina-nigrosina para vitalidad y morfología, así como el azul de coomassie para evaluar la integridad acrosomal.

Tradicionalmente no se evalúa acrosoma, a menos que se sospeche de infertilidad, sin embargo, determinar desde un inicio su integridad daría la ventaja de evaluar

espermatozoides, no solamente vivos y morfológicamente normales, sino también, capaces de penetrar y fertilizar al ovocito. Luego entonces en el presente trabajo se postula una doble tinción con azul tripán y rosa de bengala que permitirá identificar vitalidad espermática, anormalidades morfológicas, y al mismo tiempo la integridad acrosomal.

### **HIPÓTESIS**

La tinción doble con azul tripan y rosa de bengala permite evaluar simultáneamente la morfología, la vitalidad y la integridad acrosomal en semen de perros, con la misma eficiencia que las tinciones de eosina-nigrosina y de azul de coomassie, por separado.

### **OBJETIVO**

El objetivo de esta tesis es establecer una técnica de doble tinción, alternativa a las tinciones de eosina-nigrosina y coomassie, empleando la tinción de tripán azul -como tinción vital- y la tinción de rosa de bengala -como tinción específica para el acrosoma- para la evaluación de los espermatozoides en la especie *Canis lupus familiaris* (perro doméstico).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **• Animales y colección de semen**

Se obtuvieron muestras de semen de 30 perros, que acudieron a la Clínica de Reproducción Canina del Departamento de Reproducción, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM. Los animales eran llevados para las prácticas de reproducción animal, profundización en manejo reproductivo en perros, y temas selectos en reproducción del macho en los animales domésticos, o llegaban como pacientes externos que se presentaban a consulta para evaluación de la capacidad reproductiva.

Para el estudio se seleccionaron perros machos con edades entre 1 y 10 años, sin distinción de raza ni peso. Los cuales debían encontrarse clínicamente sanos y con buena libido.

### **• Técnica para la obtención de semen**

La colección del semen se realizó mediante estimulación manual por masturbación. Para la obtención se utilizaron conos de plástico, guantes de látex y lubricante en gel a base agua.

Para lograr la eyaculación se estimuló al perro manualmente a lo largo de todo el pene, y al momento de sentir y observar el crecimiento del bulbo o la salida de la punta del glande por el orificio prepucial, se desenvainó el pene y se retrajo el prepucio hasta la parte caudal del bulbo, continuando el masaje de forma vigorosa hasta lograr la erección completa. Con la mano opuesta se sujetó el cono colector frente al pene para recibir el semen; una vez que el perro tiene una erección completa y comienza a eyacular, se rota el pene  $180^{\circ}$  hacia caudal para simular el abotonamiento, y se aplica ligera presión sobre el bulbo, dando un masaje de forma intermitente hasta lograr obtener la segunda fracción del eyaculado (Páramo, 2009).

Para obtener los espermatozoides, solamente se colectaron la primera y la segunda fracción del eyaculado. La tercera fracción no se colectó, para evitar la dilución innecesaria de la muestra (Conn, 1953).

#### ● **Procedimiento de tinción y evaluación**

Para determinar la eficiencia de la tinción doble propuesta para la evaluación espermática de los perros, se ocuparon como referencia 2 tinciones ya reconocidas por sus características para la valoración de viabilidad, morfología, e integridad acrosomal, evaluando cada

eyaculado con las 3 tinciones. Las tinciones se realizaron inmediatamente después de la colección del semen.

En cada laminilla se contaron y evaluaron 100 espermatozoides para establecer los porcentajes de vivos y muertos, anormalidades primarias y secundarias, así como reacciones acrosomales positivas (ausencia de acrosoma) o negativas (presencia de acrosoma), y se anotaron en la hoja de registro (Anexo).

Se emplearon las siguientes tinciones: azul tripan-rosa de bengala (AT-RB), eosina-nigrosina (E-N) y azul de coomassie (AC).

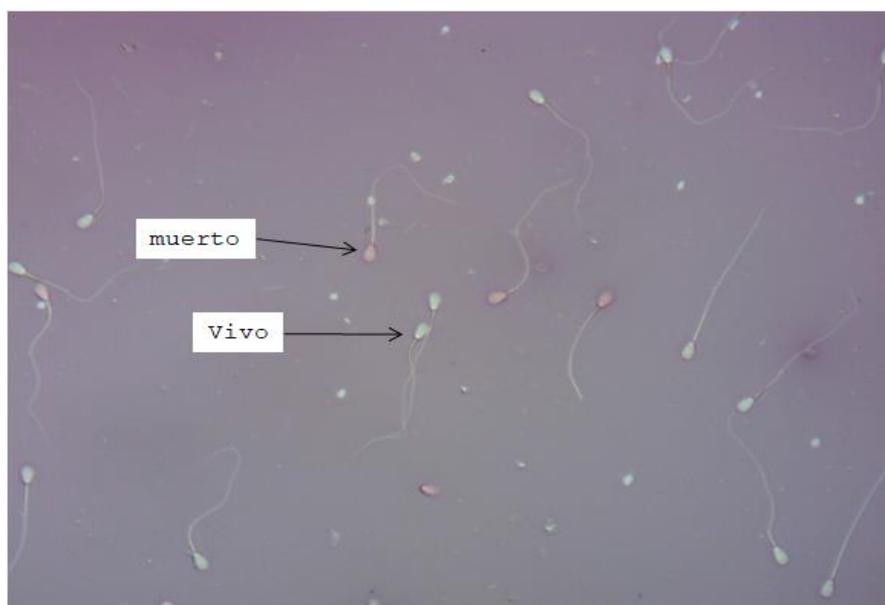
➤ **Tinción doble AT-RB:** la tinción se elaboró combinando azul tripan (AT) al 2.5% con rosa de bengala (RB) al 2%.

Para ésta tinción se emplearon 10 microlitros (0.01ml) de semen que se colocaron sobre un portaobjetos en el que se añadieron 0.01 ml. de la tinción. Ambas gotas se homogenizaron suavemente con la pipeta y se dejaron repasar por un minuto. Con la ayuda de otro portaobjetos se realizó un frótis y se observó al microscopio óptico con el objetivo 10x o seco débil (más el aumento 10x dado por el ocular, con un aumento total de 100x), y 40x o seco fuerte (más el aumento 10x dado por el ocular, con un

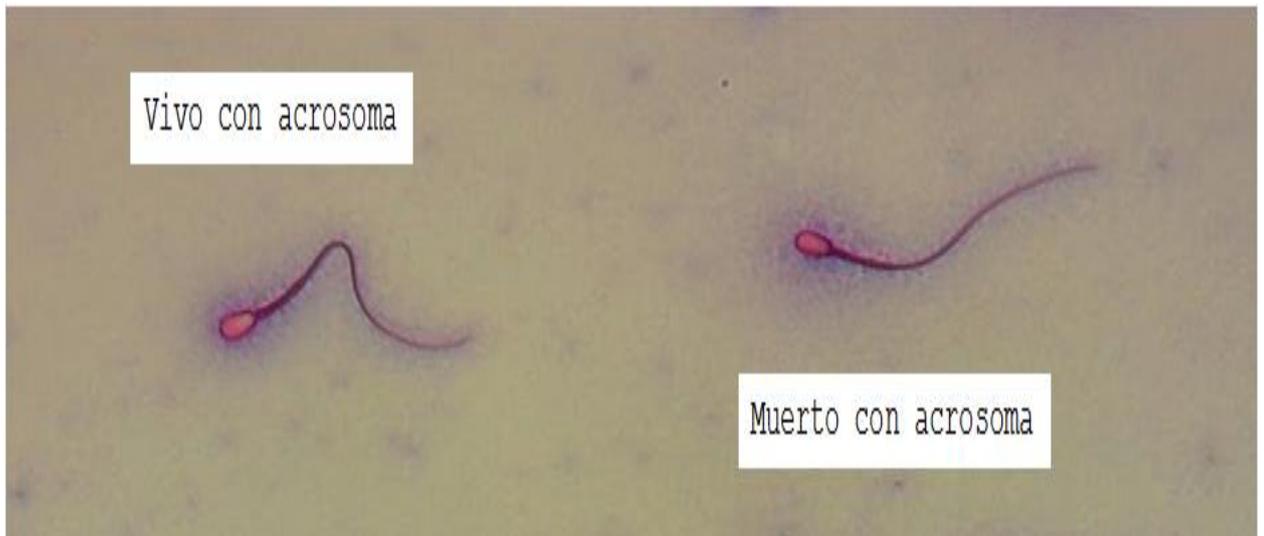
aumento total de 400x) (Suttiyotin y Thaites, 1991; Strober, 2015).

En la tinción de AT:RB, los espermatozoides teñidos de color azul intenso en la región post ecuatorial, se clasificaron como muertos, y los no teñidos o parcialmente teñidos de un color azul pálido se consideraron como vivos. Mientras que con la tinción E:N, los espermatozoides muertos se tiñen de color rosa a rojo, y los vivos no se tiñen (**Imagen 1 y 2**).

**Imagen 1.** Espermatozoides de canino teñidos con eosina-nigrosina (400X), realizada para vitalidad y morfología espermática.



**Imagen 2.** Espermatozoides de canino. Tinción azul tripan-rosa de bengala (400x).



La región acrosomal, que se observa como un capuchón en la región apical de la célula se tiñe de un color rosa intenso cuando el acrosoma se encuentra intacto, mientras que no se tiñe o se observa difuminado cuando está alterado. En la tinción de azul de coomassie (AC) el acrosoma intacto se tiñe de color azul intenso en la parte apical de la cabeza del espermatozoide, y cuando hay daño acrosomal no se tiñe o se observa difuminado (**Imagen 2 y 3**).

**Imagen 3.** Espermatozoides de canino teñidos con azul de Coomassie (400X), realizada para corroborar la presencia de acrosoma.



- **Tinción E:N:** Ésta tinción se utilizó como referencia para la evaluación de la viabilidad y de la morfología. Se elaboró combinando eosina amarillenta (E) al 2%, con nigrosina (N) al 10%.

En un portaobjetos se colocaron 0.01 ml. de semen y 0.01 ml. de tinción eosina-nigrosina, se homogenizó se dejó reposar un minuto. Con otro portaobjetos se realizó un frótis y se observó al microscopio óptico con el objetivo 10x o seco débil (para aumento total de 100x), y 40x o seco fuerte (para aumento total de 400x).

Se consideraron como espermatozoides vivos aquellos que no se tiñeron, y muertos los que presentaron una coloración de

rosa a roja (Imagen 1) (Cerezo, 2014; Buriticá et al., 2009).

Las anomalías espermáticas, utilizando las tinciones AT:RB y E:N, se clasificaron de acuerdo a la tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación morfológica del espermatozoide de perro.

1	Espermatozoide con morfología normal
2	Anormalidades de cabeza
	1° Macrocéfalo, microcéfalo, cabeza piriforme, cabeza vacuolada, doble cabeza
	2° Cabezas desprendidas
3	Anormalidades de la pieza media

1° Gota citoplasmática proximal, pieza media rota, pieza media doblada, pieza media incompleta	
2° Gota citoplasmática medial, pieza media engrosada	
4	Anormalidades del Flagelo
1° Doble cola, inserción asimétrica, cola deshilachada	
2° Cola doblada, cola enrollada	
5	Acrosoma anormal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausente o anormal</li> </ul>	

Modificado de Kolster K, 2018

➤ **Tinción AC:** Se utilizó para referir la evaluación de la integridad acrosomal. La concentración empleada fue al 0.14%.

Primeramente se realizaron 2 lavados del semen por centrifugación. En el primer lavado al semen se le agregaron 0.3 ml. de PBS y se centrifugó a 3500 rpm por 5 minutos. Para el segundo lavado retiró el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido y fijado en una solución de paraformaldehído al 2% y PBS por 30 minutos. En el tercer lavado realizó una última centrifugación a 3500 rpm durante 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió con 0.4 ml. de solución PBS. Se hizo el frotis en una

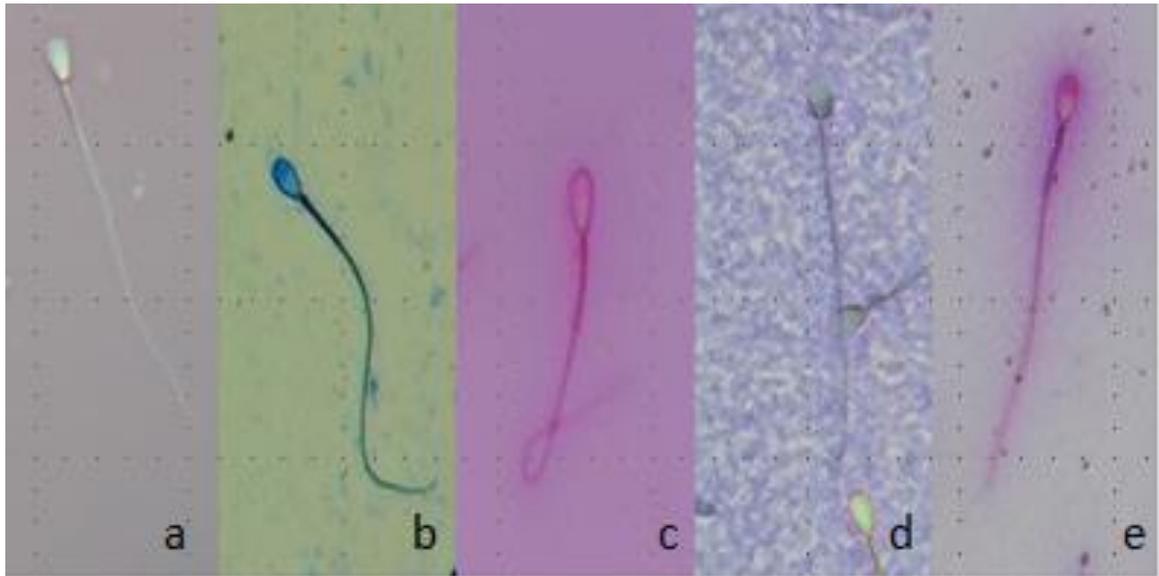
laminilla previamente desengrasada con alcohol, se secó al aire y se tiñó 10 minutos por inmersión en un vaso de coplin con azul de coomassie, el cual se colocó en baño maría a 37 °C. Se observó con el objetivo 10x o seco débil (aumento total de 100x), y 40x o seco fuerte (aumento total 400x) (Imagen 3) (Brum y Thomas, 2006).

Se consideraron como espermatozoides con el acrosoma intacto aquellos que se tiñeron de color azul intenso en la parte apical de la cabeza, mientras que se clasificaron como espermatozoides con daño acrosomal, a aquellos que no se tiñeron o la tinción se observó difuminada.

#### • **Comparativo de la doble tinción AT-RB**

En las siguientes imágenes se ejemplifica y comparan espermatozoides con diferentes condiciones en las distintas tinciones. (Imágenes 4 a 11).

**Imagen 4.** Espermatozoide de canino sin alteraciones, de izquierda a derecha: **a:** eosina-nigrosina, **b:** azul de coomassie, **c:** rosa de bengala, **d:** azul tripan, **e:** tripan-bengala (400x).



**Imagen 5.** Espermatozoides de canino con acrosoma y sin acrosoma. Tinción tripan-bengala (400x).



**Imagen 6.** Ejemplificación de anomalías espermatozoide de canino, vivo con acrosoma y cola doblada. Tinción tripan-bengala (400x)



**Imagen 7.** Espermatozoides de canino muertos y con anomalías. Tinción tripan-bengala (400x).



**Imagen 8.** Espermatozoides de canino vivo con acrosoma y una cabeza suelta. Tinción tripán-bengala (400x).



**Imagen 9.** Espermatozoides de canino vivo con acrosoma y anomalía secundaria y muerto con acrosoma y anomalía secundaria. Tinción tripan-bengala (400x)



**Imagen 10.** Espermatozoide de canino vivo con acrosoma y muerto macrocéfalo con cola doblada. Tinción tripan-bengala (400x).



**Imagen 11.** Espermatozoide de canino, microcéfalo, muerto con pieza incompleta. Tinción tripan-bengala (400x).



## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

La información recabada en los formatos de registro se capturó en una base de datos de Excel y para la evaluación y análisis de las variables de vivos muertos, anormalidades y presencia o ausencia de acrosoma, se utilizó la prueba de correlación de Pearson.

El registro y análisis de los datos se realizó en el software estadístico The statistical discovery software - 2002.

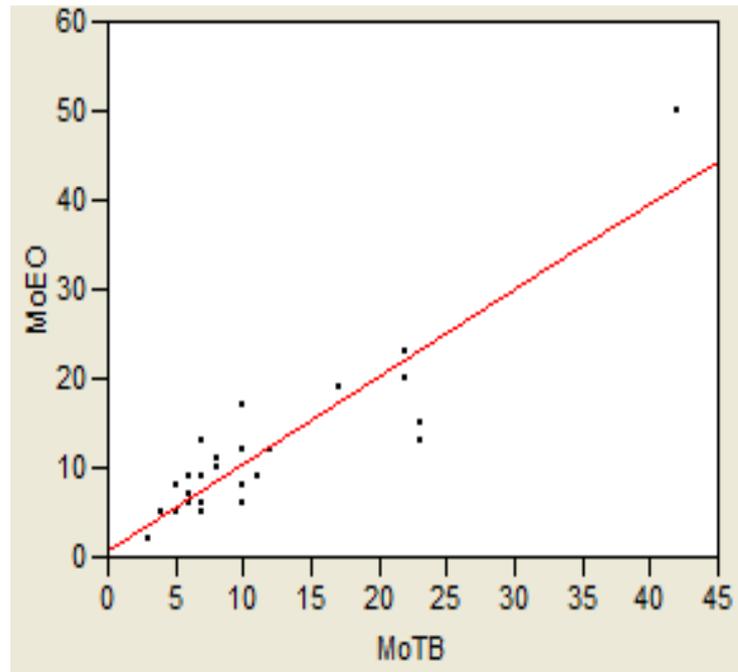
## **RESULTADOS**

En el cuadro 1 se presenta el ajuste bivariado de las tinciones evaluadas, en el que podemos observar una correlación, estadísticamente significativa ( $r_p=0.90$ ,  $p < 0.05$ ), entre la tinción de E:N y la de AT:RB, para evaluar la mortalidad espermática.

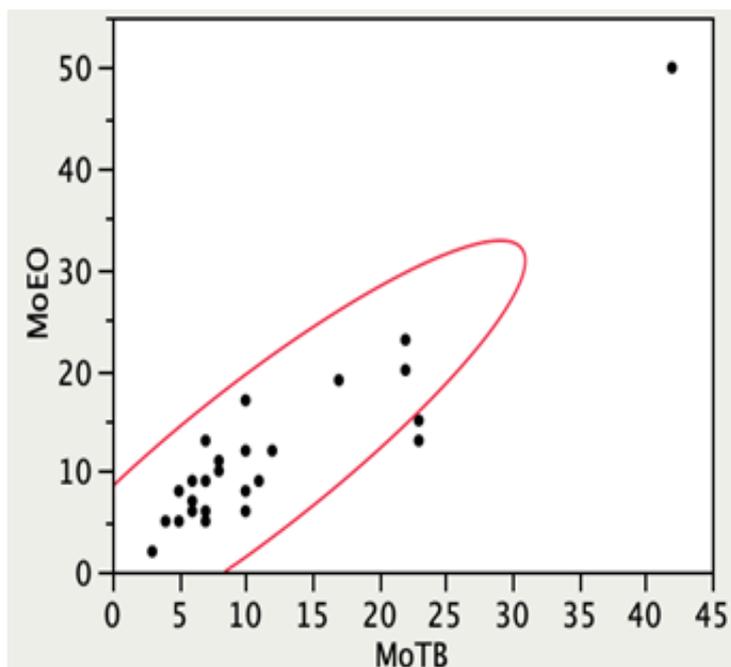
**Cuadro 1.** Prueba de pearson para la correlación de 2 tinciones que evalúan mortalidad espermática. E-N (eosina-nigrosina) y AT:RB (azul tripan-rosa de bengala)

Mortalidad	Media	Desv. Est.	Correlación	Significancia	Muestra
<b>E-N</b>	11.2	8.81	0.90	<0.0001*	30
<b>AT-RB</b>	10.8	8.24			

En las gráficas 1 y 2 podemos observar la correlación entre las 2 tinciones que evalúan mortalidad espermática.



**Gráfica 1.** Diagrama de dispersión de puntos superpuestos, donde se muestra la línea de ajuste y correlación positiva entre la mortalidad espermática evaluada con la tinción eosina-nigrosina y la de tripan-bengala, correlación  $r=0.90$ .



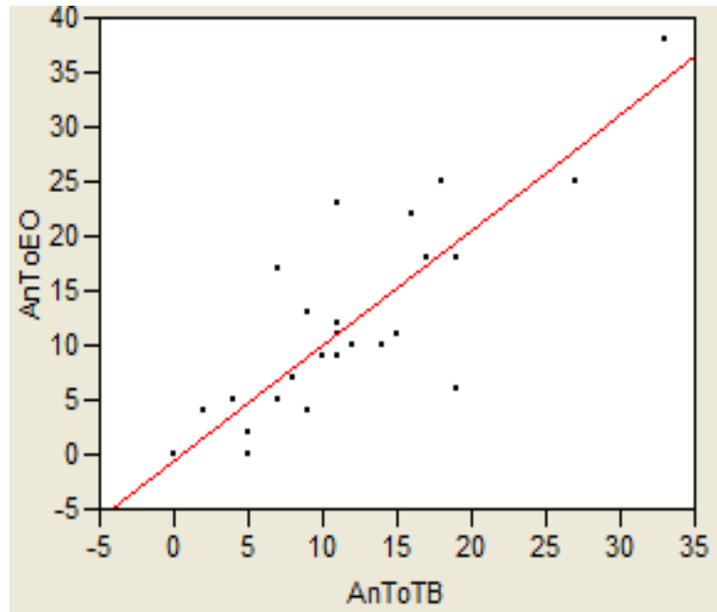
**Gráfica 2.** Diagrama de dispersión de puntos superpuestos, que muestra una correlación positiva, entre la mortalidad espermática determinada con la tinción de eosina-nigrosina y la de tripan-bengala, densidad  $P= 0.95$ .

En el cuadro 2 se presenta el ajuste bivariado de las tinciones evaluadas, en el que podemos observar la correlación, estadísticamente significativa ( $r_p=0.87$ ,  $p < 0.05$ ), entre las tinciones de eosina-nigrosina y tripan-bengala, para evaluar anomalías espermáticas.

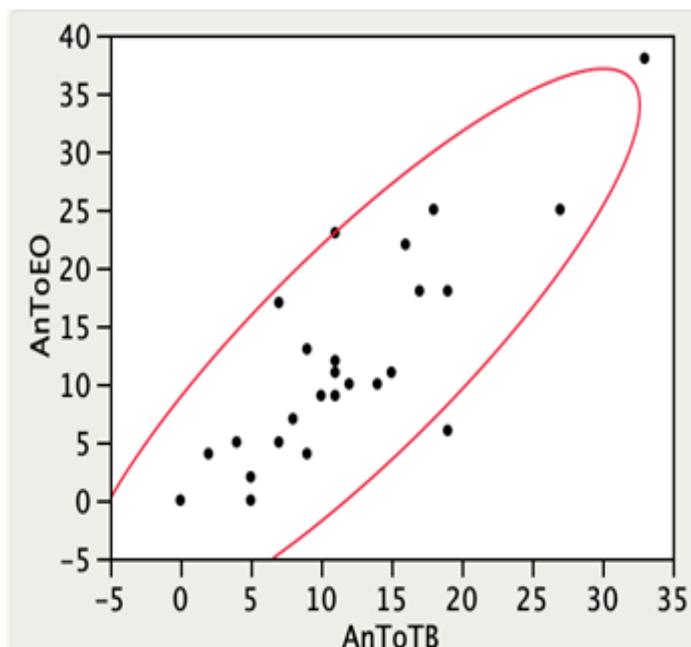
**Cuadro 2.** Prueba de pearson para la correlación de 2 tinciones que evalúan anomalías espermáticas. E-N (eosina-nigrosina) y AT:RB (azul tripan-rosa de bengala)

<b>Variable</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. Est.</b>	<b>Correlación</b>	<b>Significancia</b>	<b>Muestra</b>
<b>E-N</b>	12.66	9.98	0.872	<0.0001*	30
<b>AT-RB</b>	12.5	8.23			

En las gráficas 3 y 4 podemos observar la correlación entre las 2 tinciones utilizadas para la evaluación de las anomalías espermáticas.



**Gráfico 3.** Diagrama de dispersión de puntos superpuestos, con línea de ajuste, que muestra una correlación positiva entre las anomalías espermáticas detectadas con la tinción de eosina-nigrosina y la de la tinción de tripan-bengala, correlación  $r=0.872$ .



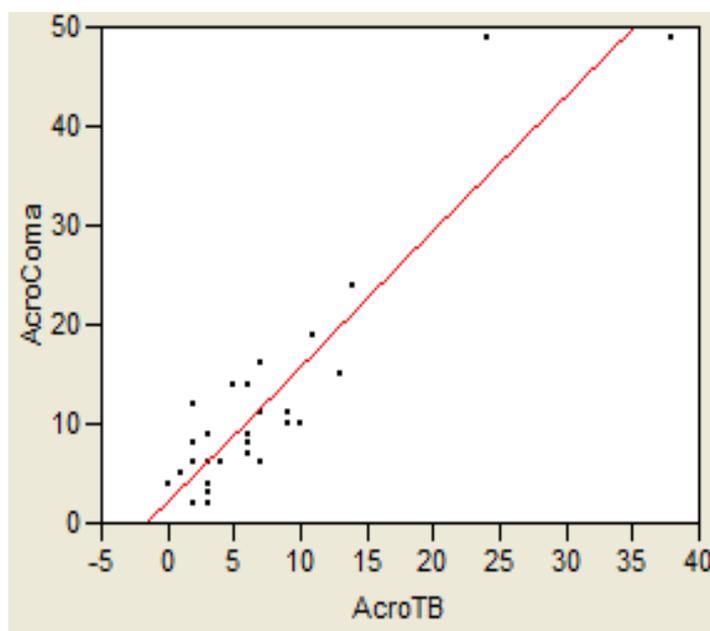
**Gráfico 4.** Diagrama de dispersión de puntos superpuestos que muestra una correlación positiva entre las anomalías espermáticas detectadas con la tinción eosina-nigrosina y la de tripan-bengala. Densidad  $P= 0.95$ .

En el cuadro 3 se presenta el ajuste bivariado de las tinciones evaluadas, en el que podemos observar la correlación, estadísticamente significativa ( $r_p=0.92$ ,  $p < 0.05$ ), entre la tinción azul de coomassie y la de tripan-bengala, para evaluar la presencia o ausencia de acrosoma.

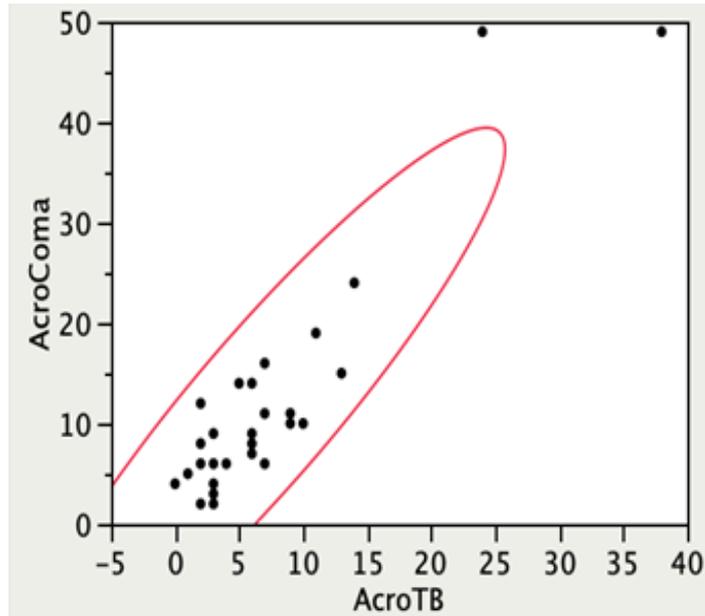
**Cuadro 3.** Prueba de pearson para la correlación de 2 tinciones que evalúan el acrosoma del espermatozoide. Ac (azul de coomassie) y AT:RB (azul tripan-rosa de bengala).

Acrosoma	Media	Desv. Est.	Correlación	Significancia	Muestra
<b>Ac</b>	11.66	11.34	0.92	<0.0001*	30
<b>AT-RB</b>	6.96	7.68			

En la gráfica 5 y 6 podemos observar la correlación entre las 2 tinciones que evalúan el acrosoma.



**Gráfico 5.** Diagrama de dispersión de puntos superpuestos que muestra una correlación positiva entre la presencia de acrosoma, detectado con la tinción azul de coomassie, en comparación con la de tripan-bengala,  $r= 0.92$ .



**Gráfico 6.** Diagrama de dispersión de puntos superpuestos que muestra una correlación positiva entre la presencia de acrosoma detectado con las tinciones de azul de coomassie y de tripan-bengala. Densidad  $P= 0.95$ .

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo se demostró la capacidad de la tinción AT:RB para evaluar de forma simultánea y en un solo paso, la viabilidad, morfología e integridad acrosomal en semen de perros, con resultados similares a los obtenidos con las tinciones tradicionalmente empleadas de forma independiente.

Un buen análisis de viabilidad y morfología espermática permitirá seleccionar machos reproductores caninos y/o eyaculados de óptima calidad, que por lo tanto propicien buenos resultados en la capacidad fecundante, debido a la alta relación que existe entre la movilidad espermática y la fertilización. Esta especie también se ha comprobado que un gran número de anomalías espermáticas afecta la fertilidad y el tamaño de la camada (Cerezo *et al.*, 2014; Kustritz, 2007; Buriticá *et al.*, 2009).

Al evaluar la viabilidad y la morfología espermáticas, la tinción AT:RB mostró correlaciones positivas estrechas con los resultados obtenidos contra la tinción E:N, de  $r=0.90$  y  $r=0.87$  respectivamente. Una correlación  $>0.5$  indica una relación lineal entre las 2 variables, es decir, existe una asociación entre las tinciones. Autores como WHO

(1992,1999) y posteriormente Björndahl *et al.* (2003), concluyeron que la tinción de eosina-nigrosina tiene un nivel de confianza alto para evaluar los criterios de vitalidad y morfología. Por su parte Suttiyotin y Thwaites (1991), Montuenga *et al.* (2014), y Strober (2015), también demostraron la habilidad de la tinción Azul tripan para evaluar y diferenciar espermatozoides vivos y muertos como se observó en el presente trabajo. (Vinuesa, 2016; Restrepo y González, 2007)

La tinción E:N es empleada en laboratorios y/o clínicas donde se realiza manejo reproductivo, para evaluar la viabilidad y la morfología espermática, en especies como: bovinos, equinos, conejos, aves, cerdos, pequeños rumiantes, caninos, felinos y el hombre (Corrada *et al.*, 2002; Kustritz, 2007; Buriticá *et al.*, 2009; Cerezo *et al.*, 2014; Daub, 2016; Feldman y Nelson, 2004).

En éste trabajo al obtener una correlación positiva estrecha y valores similares con la tinción AT:RB, se le postula como una buena opción para la determinación de anormalidades espermáticas y de espermatozoides muertos.

Para la evaluación del estado del acrosoma, la tinción AT-RB mostró una correlación positiva estrecha, de  $r=0.92$ , con los resultados obtenidos en la tinción AC, por lo que

existe asociación entre ambas tinciones. Larson y Miller (1999) demostraron y concluyeron que la tinción AC tiñe y permite visualizar el acrosoma de diferentes tipos de mamíferos. Brum *et al.* (2006) mencionan que la tinción AC es de gran utilidad para evaluar la integridad del acrosoma lo cual pudo observarse en la tinción propuesta de AT:RB. Trabajos previos sugieren agregar a la tinción AC un colorante que permita evaluar vitalidad, en la práctica clínica. Nuestro trabajo propone una tinción con dichas características al adicionar AT al RB (Vinuesa, 2016; Restrepo y González, 2007).

Una de las ventajas que tiene el protocolo de tinción de AT-RB es que no requiere el uso del objetivo 100X para la evaluación de la muestra. Aunque es recomendable, sin importar la técnica empleada analizar la célula espermática con el objetivo de inmersión, por falta de pericia, conocimiento de la técnica, capacitación o equipos, es raro que se lleve a cabo el espermograma bajo estas condiciones en la clínica diaria (Feldman y Nelson, 2004).

No existen reportes anteriores de evaluación acrosomal en conjunto con la morfología y vitalidad espermática en esta especie, por lo que al obtener una alternativa con alta correlación con otras técnicas empleadas se disminuye el tiempo en la evaluación de semen y se hace más eficiente el

obtener un resultado para predecir la fertilidad a corto plazo en un macho reproductor.

Con base a lo anterior se puede concluir que la doble tinción azul tripan-rosa de bengala, propuesta en este trabajo, puede ser utilizada como tinción alternativa para evaluar el semen en caninos.

### **CONCLUSIONES**

Al intervenir en la reproducción de los caninos por técnicas de reproducción asistida agregamos un obstáculo más a esta larga travesía, donde los espermatozoides soportan condiciones extremas durante la realización de técnicas como la inseminación artificial, evaluación y preservación por medio de la refrigeración o criopreservación.

La doble tinción con azul tripan-rosa de bengala, tiene la ventaja de brindar información de tres aspectos relevantes (vitalidad, morfología y presencia de acrosoma) para valorar la calidad espermática en un solo momento, por lo que se puede recomendar su utilización en la clínica diaria de pequeñas especies, debido a que requiere poco tiempo,

material e inversión. Como cualquier otra técnica de diagnóstico o procedimiento clínico el médico debe ser previamente capacitado para desarrollar las habilidades competentes para llegar a un diagnóstico certero.

Una desventaja de las técnicas para el conteo de acrosomas intactos o células reaccionadas es que no existen reportes previos en la literatura que indiquen cuales son los parámetros de normalidad en cuanto al porcentaje de espermatozoides con acrosoma en una muestra para considerarla de buena calidad.

**Anexo**

Hoja de registro de la evaluación de semen para la tinción E-N,  
AT-RB y AC.

Nombre del perro:	
Raza	
Edad:	
<b>Tinción de Eosina - Nigrosina</b>	
Anormalidades 1°	Anormalidades 2°
Vitalidad:	
Fecha:	Observaciones:
<b>Tinción Azul tripan-Rosa de bengala</b>	
Anormalidades 1°	Anormalidades 2°
Vitalidad	
Acrosoma (+)	Acrosoma (-)
Observaciones:	
<b>Tinción Azul de coomassie</b>	
Acrosoma (+)	Acrosoma (-)
Observaciones:	

**LITERATURA CITADA**

- 1.-Abou-Haila A, Tulsiani D. *The sperm acrosome: formation, contents and function*. Archives of biochemistry and biophysics. 2000; 379: 173-182.
- 2.- Aksoy E, Aktan TM. *Evaluación de la morfología de los espermatozoides bajo microscopía óptica con diferentes tinciones histológicas y comparación de las mediciones morfométricas*. Int.J.Morphol. 2012; 30(4):1544-1550.
- 3.-Bancroft J, Layton C. En: Suvarna, Kim S., et al. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. UK: Elsevier Health Sciences; 2013. p. 173-174.
- 4.- Bragina E, Bocharova E. (2017). *Ultrastructure of Spermatozoa from Infertility Patients, Spermatozoa - Facts and Perspectives*. 3 de Junio 2019, de IntechOpen. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/spermatozoa-facts-and-perspectives/ultrastructure-of-spermatozoa-from-infertility-patients>
- 5.-Brum A, Thomas A. *Evaluation of coomassie blue staining of the acrosome of equine and canine spermatozoa*. AJVR. 2006; 67:358-362.
- 6.-Buriticá E, Villanueva C, Hernández L. *¿Cómo hacer una evaluación espermática en caninos?* Revista colombiana de ciencia animal. 2009; 2:69-72.

- 7.-Carlson B. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 2 ed. USA: Harcourt; 2001. p. 4-9.
- 8.- Cerezo G, Castilla J, Rodríguez H. *Manual para el análisis básico de semen, una guía práctica*. México: Prado; 2014. P.31-33.
- 9.-Conn HJ. *Biological stains, a handbook on the nature and uses for the dyes employed in the biological laboratory*. USA: Biological stain commission, 6°ed. 1953.
- 10.-Corrada Y, De la sota p, Giménez A, Fernández L, Gobello C. (2002). *El espermograma en la reproducción canina*. 11 de Enero 2019, de UNP-FV. Disponible en: [http://cvpba.org.ar/assets/pdf/pdf st/36\\_reprod canina .pdf](http://cvpba.org.ar/assets/pdf/pdf_st/36_reprod_canina.pdf)
- 11.-Cross N, Meizel S. *Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm*. *Biology of reproduction*. 1989; 41: 635-641.
- 12.-Daub L, Geyer A, Reese S, Braun J, Otzdorff. *Sperm membrane integrity in fresh and frozen- thawed canine semen samples: a comparison of vital stains with nucleocounter SP-100*. *Theriogenology*. 2016; 86:651-656.
- 13.-De Jonge C, Barrat C. *The sperm cell production, maturation, fertilization, regeneration*. UK: Cambridge university press., 2006. P. 7-13.

- 14.-De moreno M, Smith J, Smith R. *Mechanism studies of coomassie blue and silver staining of proteins*. Journal of pharmaceutical sciences. 1986; 75:907-911.
- 15.-England G, Harvey M. *Manual of small animal reproduction and neonatology*. UK: BSAVA., 1998. P.64-67
- 16.-Feldman EC, Nelson R. *Canine and feline endocrinology and reproduction*. USA: Saunders, 3ra ed.; 2004. P.930-951.
- 17.-Foster J, Gerton G. *The acrosomal matrix*. Adv Anat Embryol Cell Biol. 2016; 220:15-33.
- 18.-Glover T. *Mating males an evolutionary perspective on mammalian reproduction*. Australia: Cambridge university press; 2012. P.52-62.
- 19.-Hafez E, Hafez B. *Reproducción e inseminación artificial en animales*. USA: McGraw-Hill Interamericana, 7ma ed. 2002. P98-105
- 20.-Hernández O, Ballesteros L. *Biología molecular del espermatozoide de mamíferos*. En: Moctezuma J. *Biología de la reproducción*. México: UAM; 1998. p. 193-214.
- 21.-Kolster K. *Evaluation of canine sperm and management of semen disorders*. Vet clin small anim. 2018; 48:533-545.
- 22.-Kustritz R. *The value of canine semen evaluation for practitioners*. Theriogenology. 2007; 68:329-337.
- 23.-Larson J, Miller D. *Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species*. Molecular reproduction and development. 1999; 52:445-449.

- 24.-McGeady T, Quinn P, FitzPatrick E, Ryan M. *Veterinary Embryology*. UK: Blackwell Publishing; 2006. P.10-24.
- 25.-Montalvo C. (2010). Técnica Histológica. 10 de Octubre 2018, de UNAM-FACMED. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3\\_tecnica\\_histologica.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf)
- 26.-Montuenga A, Esteban F, Calvo A. *Técnicas en histología y biología celular*. 2ed. Elsevier Masson., 61-101, 2014.
- 27.-Oettlé E. *Sperm morphology and fertility in the dog*. Journal of reproduction and fertility ltd. 1993; 47:257-260.
- 28.-Ortega B, Herrera M, Tecalco A. *Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma*. Revista especializada en ciencias químicas biológicas. 2015; 18(2): 131-143.
- 29.-Páramo R, Porrás A. *Manual de prácticas de reproducción animal*. México: UNAM; 2009. p. 193-209.
- 30.-Rangel L, Hernández J. *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. México: UNAM., 2018. p. 53-60.
- 31.- Restrepo G, Úsuga A, Rojano BA. *Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino*. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia [Internet]. 2013; 8(1):69-81.
- 32.-Restrepo L, González J. *De Pearson a Spearman*. Revista colombiana de ciencias pecuarias. 2007; 20:183-192.

- 33.-Russell L, Ettlin R, Sinha A, Clegg E. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache river press. 1990. P.4-28.
- 34.-Strober W. *Trypan blue exclusion test of cell viability*. *Protoc. Immunol.* 2015; 111:A3.B.1.-A3.B.3.
- 35.-Suttiyotin P, Thwaites C. *The ability of trypan blue to differentiate live and dead ram spermatozoa*. *Animal reproduction science.* 1991; 25:209-224.
- 36.-Vázquez JM, Martínez J, Roca J, Coy P, Ruíz S. *Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa*. *Theriogenology.* 1992; 38:843-852.
- 37.-Vinuesa P. (2016). *Correlación: teoría y práctica*. 20 de Junio 2019, CCG-UNAM. Disponible en: [http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/R4biosciences/docs/Tema8\\_correlacion.pdf](http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/R4biosciences/docs/Tema8_correlacion.pdf)
- 38.-Zeginiadou T, Papadima J, Mantalenakis S. *Acrosome reaction: methods for detection and clinical significance*. *Andrología.* 2000; 32:335-343.