

1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

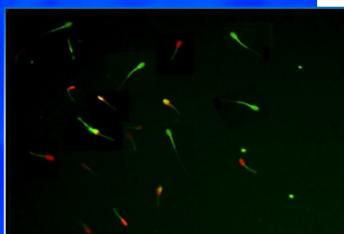
I.6. Calidad y valoración del semen.

Cebrián-Pérez, J.A; Pérez-Pé, Rosaura; Casao, Adriana; Muiño-Blanco, Teresa
 Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular - Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza.

La capacidad fecundante de una dosis seminal es un factor fundamental a la hora de diseñar esquemas de mejora productiva adecuados, máxime si estos se basan en el uso de la inseminación artificial. Dado que no existe ningún parámetro de calidad seminal que, por si solo, correlacione con la capacidad fecundante de un eyaculado o dosis seminal, estamos obligados a realizar un estudio de varios parámetros, tratando de aproximarnos en la medida de lo posible a una hipotética capacidad fecundante.

La mayor parte de los parámetros clásicamente utilizados para la valoración de la calidad seminal, incluyendo motilidad individual progresiva, volumen, concentración, respuesta al test de endósmosis (HOS-test), viabilidad, etc., indican poco o muy poco sobre la verdadera capacidad fecundante de una dosis seminal. Por tanto, esta es una cuestión crítica ya que este tipo de ensayos no proporciona información sobre un conjunto de daños espermáticos (“daños subletales”) inherentes al manejo y preparación de las dosis seminales, que determinarían la funcionalidad de membranas celulares, el grado de apoptosis, incluyendo actividades enzimáticas y alteración y/o daño del ADN, la capacidad energética del espermatozoide, etc. Por ello, hoy se considera que una adecuada contrastación de la calidad seminal tendría que incluir estos nuevos parámetros que van a proporcionar información sobre los daños subletales de las dosis seminales.

Hay una serie de aspectos fundamentales que se han de aplicar para obtener dosis seminales con la mayor capacidad fecundante posible. Al margen de aspectos básicos como son el estado nutricional de los moruecos, la higiene, la época estacional, etc., la calidad de los eyaculados obtenidos depende de factores de manejo que tienen obligatoriamente que ser considerados.

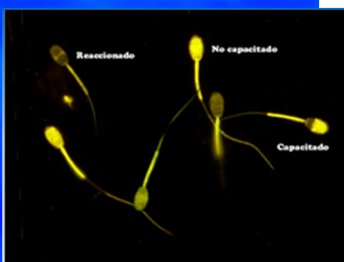


Análisis de viabilidad celular

Muestra la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides. Se suele realizar mediante microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo, permitiendo distinguir los espermatozoides dañados (en rojo) y los espermatozoides con membrana íntegra y funcional (en verde).

Estado de capacitación

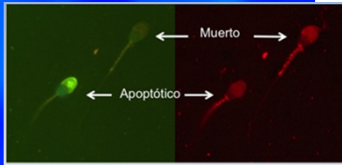
Permite determinar el porcentaje de espermatozoides en las fases fundamentales del proceso previo a la fecundación: capacitados (con acrosoma amarillo y cabeza decolorada), no capacitados (con la cabeza completamente amarilla) y que han experimentado la reacción acrosómica (con acrosoma y cabeza decolorados). Se determina por microscopía de fluorescencia mediante un ensayo con clorotetraciclina (CTC) que muestra diferentes patrones de tinción en función de la distribución del calcio dentro de los espermatozoides.



1. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

Porcentaje de espermatozoides apoptóticos

Muchos de los espermatozoides van a experimentar un proceso de degradación y digestión controlada (apoptosis) y, evidentemente, no podrán llevar adelante el proceso de fecundación. Conocer el porcentaje de este tipo de espermatozoides en una dosis seminal es fundamental para predecir la capacidad fecundante. El proceso apoptótico puede ser determinado a dos niveles diferentes:

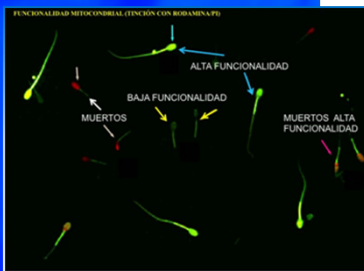


1.-Desorganización de la membrana espermática. Se cuantifica por la presencia de fosfatidil serina en la parte externa de la membrana. Se determina con un ligando específico (Anexina) ligada a una partícula fluorescente que permite su visualización.

2.- Daño en el ADN, roturas o mellas en esta molécula.



Se cuantifica generando la síntesis de una cadena de nucleótidos, a partir de los puntos de rotura en el ADN, utilizando la enzima Desoxinucleotidil transferasa que incorpora una desoxiuridina marcada con fluorescencia a esa cadena en crecimiento. Se puede cuantificar en microscopio de fluorescencia y por citometría de flujo.



Actividad mitocondrial

La funcionalidad mitocondrial es un aspecto muy importante de la calidad seminal, ya que del funcionamiento de las mitocondrias depende la motilidad de los espermatozoides y el vigor adecuado para su posterior unión al ovocito.

Una técnica para determinarla mediante microscopía de fluorescencia es la tinción simultanea de los espermatozoides con rodamina y yoduro de propidio.

También se puede valorar mediante citometría de flujo con diversos fluorocromos como JCI o Mitotracker.

La Citometría de Flujo como método de análisis de la calidad espermática

La capacidad de recuento y análisis de los espermatozoides individualmente mediante microscopía constituye un factor limitante para poder valorar diferentes parámetros de una dosis seminal. Normalmente se recomienda contar 400 espermatozoides como mínimo, para cada parámetro. Esto condiciona seriamente el estudio de los parámetros que se van a valorar.

La citometría de flujo, tecnología generalizada para el estudio de los espermatozoides en los últimos años, permite el análisis de hasta 10.000 espermatozoides cada 5 minutos, facultando estudiar varios parámetros de calidad seminal en un margen de tiempo que permite la utilización de las dosis seminales preparadas. Además, también permite analizar la existencia de distintas subpoblaciones celulares en una dosis seminal.

