

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Características morfológicas de los espermatozoides en caprinos mediante la comparación de dos tinciones; Eosina/Nigrosina y Hemocrom

Por:

Noé Jiménez Rodríguez

TESIS

Presenta como requisito parcial para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Torreón, Coahuila, México
Junio 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Características morfológicas de los espermatozoides en caprinos mediante la
comparación de dos tinciones; Eosina/Nigrosina y Hemocrom

Por:

Noé Jiménez Rodríguez

TESIS

Qué somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial
para obtener el título de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por:



Dr. Alan Sebastián Alvarado Espino
Presidente



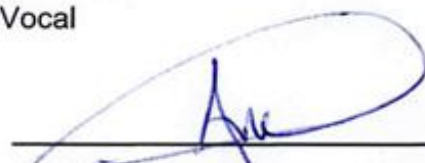
MC. Gerardo Arellano Rodríguez
Vocal



Dr. Fernando Arellano Rodríguez
Vocal



Dr. Oscar Angel García
Vocal suplente



MC. José Luis Francisco Sandoval Elías
Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Junio 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Características morfológicas de los espermatozoides en caprinos mediante la
comparación de dos tinciones; Eosina/Nigrosina y Hemocrom

Por:

Noé Jiménez Rodríguez

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

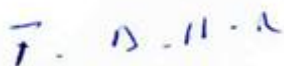
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Aprobada por el comité de Asesoría:



Dr. Alan Sebastián Alvarado Espino

Asesor principal



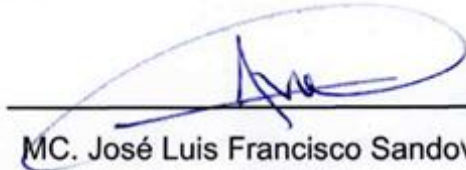
Dr. Fernando Arellano Rodríguez

Coasesor



MC. Gerardo Arellano Rodríguez

Coasesor



MC. José Luis Francisco Sandoval Elías

Coordinador de la División Regional de Ciencia Animal



Torreón, Coahuila, México
Junio 2025

Agradecimiento

A Dios:

A Dios primeramente por haberme dado la vida y con ella darme a mis padres

A mis padres:

A mi padre Enrique Jimenez Martínez gracias por darme su inteligencia confianza, sus enseñanzas, consejos, por orientarme sobre las experiencias de la vida y cuidarme de las personas pero sobre todo demostrarme a nunca rendirme, gracias a mi madre Eufrasia Rodriguez Pérez la persona que más amo y que nunca dejo de creer en mí, darme su comprensión gracias por ser mis padres y hacer de mí una buena persona y nunca olvidar de dónde vengo, además de ser mi mayor motivación gracias por su esfuerzo que hoy junto con el mío está dando resultados cumpliendo una meta más juntos.

A mis hermanos:

Luz, Sabina y Yesenia mis compañeras de vida, gracias por todo su apoyo, por ayudar a mis padres y cuidar de ellos todo este tiempo que estado lejos, gracias por ser las hermanas mayores por cada consejo y regaño que recibí de ustedes además de no dejarme solo y así poder terminar mi carrera.

Agradezco la ayuda de Luis Alberto Martínez y Miguel Moya mis compañeros de la infancia hermanos de la vida y de experiencias, gracias por ayudarme y aconsejarme todo este tiempo académico, por nunca hacerme sentir menos y creer en mí.

A mi asesor:

Al Dr. Alan Sebastián Alvarado Espino por darme la oportunidad de ser su tesista, que, aunque el camino no fue fácil hoy estamos por terminar este proceso lleno de grandes experiencias y aprendizajes, gracias por su amistad y motivación profesional.

A mis amigos:

Agradezco la ayuda de mis amigos Yessi, Jenny, Larrisa, Brenda, Aram, Bryan por su amistad durante toda la carrera y hacer una segunda familia de foráneos, por último, pero más importante Blanca gracias por siempre cuidarnos como una hermana mayor, por todo tu apoyo durante la pandemia por cada consejo y tu ayuda cada que la necesito. A cada uno les deseo el mayor de los éxitos en su vida profesional.

Dedicatoria

A Dios por darme salud y tener con vida a mis padres además por darme fuerzas para seguir adelante a pesar de cada obstáculo.

A mis padres por la crianza que me dieron, por su apoyo y sus consejos para ser una mejor persona.

A mis Hermanas luz, Sabina y Yesenia por todo el apoyo moral y económico y siempre estar al pendiente por que no me faltara nada.

A ti Ximena gracias por todo tu apoyo en momento difíciles y enseñarme las cosas buenas de vida y con ello a tener fe y paciencia.

A los médicos Rafael Dorantes y Miriam Plata, así como también a Fernanda y Viviana de la clínica San Cristóbal por compartirme su conocimiento experiencia además de ser el cimiento para empezar ampliar mi conocimiento sobre la carrera.

A los médicos Liliana Fong y Mario Rodríguez de la clínica Scooby Do por darme la confianza y demostrarme que con dedicación y esfuerzo todo se logra.

Al médico Manuel Trejo por compartir su amplio conocimiento y ofrecerme su amistad.

A los médicos en la clínica de Equinos como lo son Biovet, Clirequi y los Encinos por darme la oportunidad de profundizar mi experiencia sobre la medicina en equinos y empezar mi formación como MVZ.

Al ingeniero Jesús Varela por su apoyo en transcurso del experimento y orientarme con las dudas sobre el experimento.

A mis profesores de mi ALMA TERRA MATER. Dr. Alan Sebastián, Dr. Hugo Zuriel, Dr. Edgar Díaz, Dr. Oscar Banda, Dr. Carlos Ramírez.

Resumen

El objetivo de esta investigación fue comparar la morfología espermática en caprinos teñidos con las tinciones de Eosina-Nigrosina y Hemocrom. El experimento se realizó en el norte de México, en el Centro de Investigación en Producción Animal (CIPA UL) de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en la ciudad de Torreón Coahuila (25° N). Se utilizaron seis machos de la raza Alpina francesa con un promedio de 12 a 14 meses de edad. La recolección del semen se hizo con vagina artificial una vez por semana durante un mes. Se realizó un análisis macro y microscópico de las muestras evaluando el volumen, la concentración y la motilidad de cada eyaculado. La morfología espermática se evaluó mediante la tinción Eosina-Nigrosina y Hemocrom en un microscopio de campo claro utilizando un objetivo de 40X siempre por la misma persona. De cada frotis teñido con estas tinciones se analizaron un total de 200 células espermáticas. Se determinó el total de malformaciones, así como las alteraciones de la cabeza y el flagelo. No se encontraron diferencias estadísticas significativas en las anomalías de la cabeza y el flagelo de los espermatozoides tanto en la tinción E/N como la del Hemocrom ($P \geq 0.05$). En conclusión, ambas tinciones permiten evaluar la morfología de los espermatozoides con parámetros similares, demostrando que la tinción Hemocrom® puede utilizarse para el análisis de la morfología espermática en machos caprinos.

Palabras clave: Tinción, Morfología, Espermatozoide, Espermatogénesis, Acrosoma, ultraestructura

Índice

Agradecimiento	i
Dedicatoria	iii
Resumen	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vi
Índice de figuras	vi
1. Introducción	1
1.2 Objetivo	3
1.3 Hipótesis	3
2. Revisión de literatura	4
2.1. Espermatogénesis	4
2.2 Ultraestructura del espermatozoide	5
2.3. Principales alteraciones en la morfología espermática	6
2.3.1 Morfología espermática	6
2.3.2 Clasificación de la morfología espermática.....	6
2.4 Técnicas para evaluar la morfología de los espermatozoides.....	10
2.4.1 Eosina-Nigrosina	10
2.4.2 Hematoxilina-Eosina	11
2.4.3 Tinción catiónico C.I 52040 o Azul de toluidina.....	11
2.4.4 Tinción pap	11
2.4.5 Diff-Quik	12
2.4.6 Hemocrom	12
3. Materiales y métodos	13
3.1 Ubicación del estudio	13
3.2 Manejo y alimentación de los animales	13
3.3 Colección y procesamiento del semen	13
3.4 Tinción de espermatozoides	14
3.6 Análisis estadístico	15
4. Resultados	15
5. Discusión	16
6. Conclusión	18
7. Referencias	19

Índice de cuadros

Cuadro 1. Relación de las principales anomalías espermáticas y sus implicaciones (Tomado de Frederico et al., 2016).....	7
---	---

Índice de figuras

Figura 1 Ultraestructura normal de un espermatozoide. El espermatozoide está dividido en cabeza y flagelo (Tomado de Wang et al., 2022).	6
---	---

1. Introducción

El análisis de semen es la prueba clínica de laboratorio más importante actualmente disponible para evaluar la fertilidad en los machos ya que la calidad del semen refleja la salud de los órganos reproductivos (Brito *et al.*, 2025). La morfología de los espermatozoides está asociada con la función, y su evaluación es un componente crucial del análisis del semen. La morfología de los espermatozoides es considerada un indicador del potencial de fertilidad, ya que la presencia de altos porcentajes de espermatozoides anormales está asociada con la infertilidad en varios casos (Hidalgo *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2025). Se menciona que hay una correlación positiva entre la morfología normal de los espermatozoides y la fertilización in vitro e in vivo y ha demostrado tener un alto valor predictivo para los resultados en la fertilidad cuando se emplean las tecnologías de reproducción asistida (Oral *et al.*, 2002). En caprinos, una muestra de semen se considera adecuada cuando tiene un porcentaje normal de células igual o mayor al 70% (Tibary *et al.*, 2018). Las anomalías espermáticas se clasifican según la localización las cuales pueden ocurrir en la cabeza, pieza media y cola (Koziol, 2018). De acuerdo con Abali *et al.*, (2018) la presencia del 10% o más de cualquier tipo único de defectos en la cabeza, pieza media y cola, y el 20% o más de anomalías totales de los espermatozoides a menudo se asocian con una reducción de la fertilidad en rumiantes.

La evaluación adecuada de la morfología espermática requiere del conocimiento de diferentes métodos, equipos y experiencia técnica (Brito *et al.*, 2025). La morfología se puede evaluar utilizando preparaciones húmedas examinadas bajo microscopía de contraste de fases al fijar los espermatozoides en el portaobjetos. Los métodos de tinción utilizados para el análisis de las características morfológicas del eyaculado también incluyen diversas tinciones como la eosina-nigrosina, eosina-gentiana, SpermBlue, tinción de Giemsa, Diff-Quik, Papanicolaou y carbolfucsina-eosina (Szablicka *et al.*, 2022). En la evaluación rutinaria de la morfología de los espermatozoides en caprinos, la eosina + nigrosina es la tinción más comúnmente utilizada siendo la tinción estándar para evaluar la morfología del semen de machos ya que también se puede utilizar para

identificar espermatozoides vivos y muertos (Czubaszek *et al.*, 2019). Otras tinciones Hemocrom pueden ser utilizadas para evaluar la morfología de los espermatozoides. Esta tinción consiste en una solución fijadora y dos soluciones de tinción tamponadas. Se realiza un frotis que se fija al aire y se tiñe sumergiéndolo en las soluciones 1 a 3; el tiempo total de tinción es solo de unos 30 segundos (Begemann y Rastetter 1989). En el caso de los machos cabríos y a pesar de la importancia que tiene la morfología, no se ha estandarizado ningún método de tinción adecuado.

1.2 Objetivo

Comparar la morfología espermática en caprinos con las tinciones de Eosina-Nigrosina y Hemocrom.

1.3 Hipótesis

La hipótesis del presente estudio fue que la morfología espermática de los caprinos es similar con ambas tinciones

2. Revisión de literatura

2.1. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso mediante el cual se producen gametos masculinos llamados espermatozoides a través de división y diferenciación celular. Esta se lleva a cabo en los testículos e inicia en la pubertad y en los caprinos se completa aproximadamente en 47 días (Shirazi *et al.*, 2014). Específicamente la espermatogénesis se realiza en los túbulos seminíferos. Se divide en dos etapas, la espermatocitogenesis, la cual ocurre mediante la división de células mitóticas y genera como resultado las células germinales de reserva y espermatogonias tipo B estas últimas se diferencian en espermatocitos primarios, iniciando la etapa de meiosis con una nueva división dando origen a las espermatidas (Pineda y Dooley, 2003; O'Donnell *et al.*, 2006; Boeta *et al.*, 2018); y la espermiogenesis también llamada fase de diferenciación o espermioteliosis fase donde la célula haploide llamada espermatida se transforma en espermatozoide formando una estructura especializada como el acrosoma, un organelo con forma de capucha, y el flagelo, de él depende su motilidad (Gadella y Luna, 2014; Neto *et al.*, 2016; Boeta *et al.*, 2018). Gatimel *et al.*, (2017) describe la espermiogenesis como una reorganización morfológica del núcleo, el desarrollo y posicionamiento del acrosoma, la unión de la estructura del flagelo y la organización del citoplasma y finaliza el evento con el depósito de espermatozoides en el túbulo seminífero.

La regulación endocrina de la espermatogénesis es controlada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo. La GnRH estimula la producción y secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) por la adenohipófisis (Casabiell, 2006). A su vez la testosterona es secretada por las células intersticiales o de Leydig mediante la estimulación de LH, mientras que la hormona FSH estimula la espermatogénesis a través de sus acciones sobre las células de Sertoli (McLachlan, 2000). Las células de Sertoli representan el 25% del epitelio tubular y son el sitio de ubicación de las espermatidas. Las células de Sertoli no se dividen después de la pubertad y están en contacto con las células germinales en desarrollo. En ellas ocurre la

regulación de la espermatogénesis mediante la acción de la FSH y la testosterona (Griswold, 1998).

2.2 Ultraestructura del espermatozoide

Los espermatozoides son las células maduras alargadas formadas por una cabeza y un flagelo (Figura 1). En la cabeza se encuentra el núcleo donde está la información genética. Está compuesta por cromatina firme y compacta además de un tipo de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. El ADN nuclear contiene el 50% de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie animal (Vera-Muñoz 2008). Esta célula está protegida en su totalidad por una membrana plasmática, que en la parte anterior del núcleo se encuentra cubierta por el acrosoma. El acrosoma tiene una estructura en forma de capsula semiesférica la cual contiene varias enzimas hidrolíticas importantes que participan en la fecundación del ovulo (Hafez y Hafez, 2000). El flagelo (cola) se divide en diferentes segmentos denominados proximal, medio y caudal. Esta estructura está integrada por un cuello y anillo citoplasmático, la parte media de esta fracción medial en relación con el alargado de la cola, integra el axonema el cual se encarga de convertir la energía química en acción mecánica (Newcombe, 1999). El flagelo está conformado por nueve pares de micro túbulos de forma circular de los filamentos centrales, las fibras densas y una gran cantidad de mitocondrias cubren periféricamente al axonema dispuestas en una vaina o guía mitocondrial (Wang *et al.*, 2022).

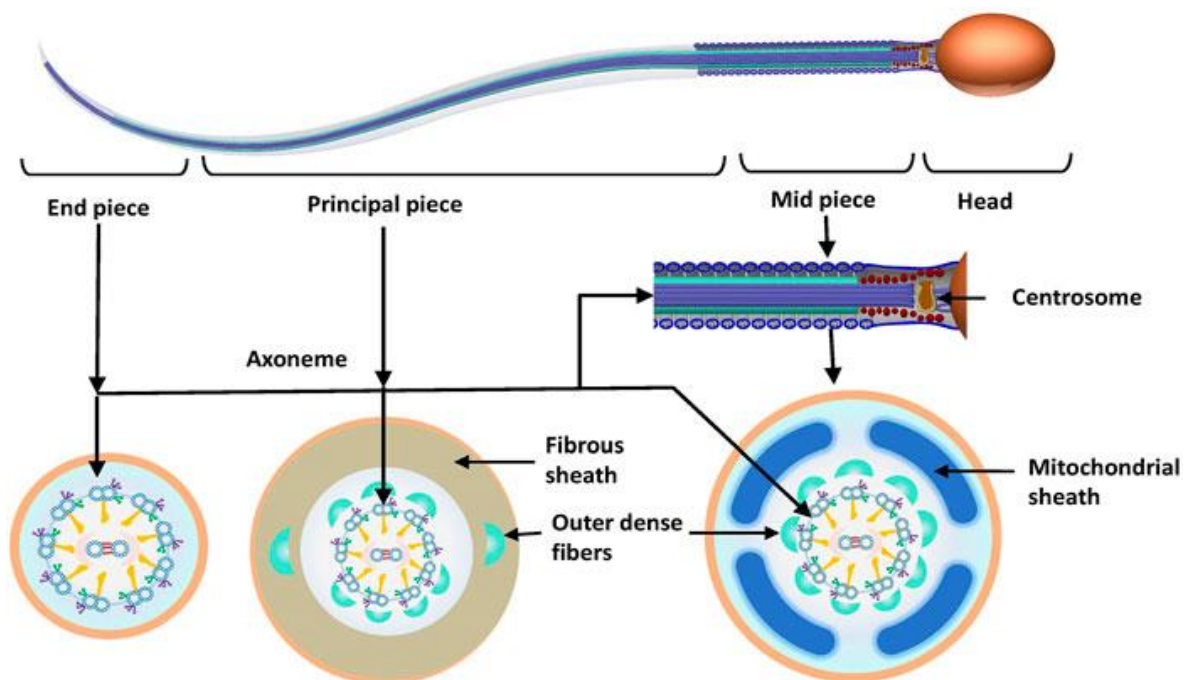


Figura 1. Ultraestructura normal de un espermatozoide. El espermatozoide está dividido en cabeza y flagelo (Tomado de Wang et al., 2022).

2.3. Principales alteraciones en la morfología espermática

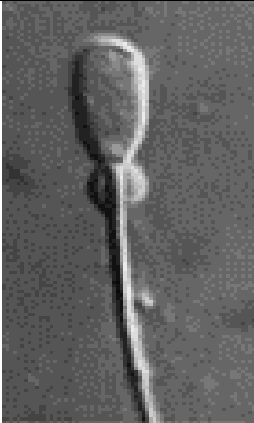
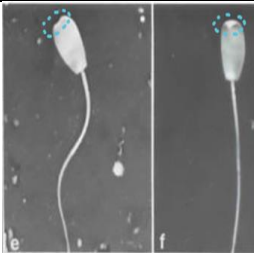
2.3.1 Morfología espermática

La morfología espermática es una parte muy importante de la evaluación de las muestras de semen. El estudio de la morfología espermática consiste en observación de las muestras de semen y encontrar alteraciones en los espermatozoides en relación a su forma. Altos porcentajes pueden estar relacionados con una inmadurez sexual y procesos fisiopatológicos del aparato reproductor, afectando negativamente la fertilidad (Xu *et al.*, 2022). En caprinos los valores anormales no deben superar el 15% de espermatozoides morfológicamente anormales (Carrillo y Hernández, 2016).

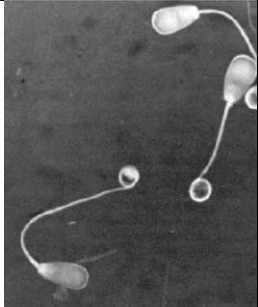
2.3.2 Clasificación de la morfología espermática

De acuerdo con la Sociedad de Teriogenología (SFT) las anomalías espermáticas se clasifican según la localización las cuales pueden ocurrir en la cabeza, pieza media y cola (Koziol, 2018). En el Cuadro 1 se muestran las principales anomalías encontradas en los espermatozoides y sus implicaciones.

Cuadro 1. Relación de las principales anomalías espermáticas y sus implicaciones (Tomado de Frederico et al., 2016).

Anomalía	Causa probable	Diagnóstico	Tasa de fertilización	Tratamiento	
Gota citoplasmática proximal (GCP)	En animales jóvenes debido al desarrollo incompleto del epitelio epididimario. En adultos por degeneración del epitelio seminífero provocada por estrés térmico y enfermedades.	Baja motilidad; identificación de GCP bajo microscopio de contraste de fase CF y tinciones (giemsa, nigrosina y rosa de bengala).	Clivage embrionario del 5 al 14% cuando hay del 12 al 30% de GCP en el semen.	Favorable: En jóvenes esperar a que se desarrolle el epitelio epididimario. En adultos, eliminar la causa del estrés. Desfavorable en caso de degeneración testicular. En la degeneración por enfermedad no siempre es posible recuperar el epitelio epididimario.	
Defectos acrosómicos protuberantes "Knobbed sperm"	Estrés térmico (Trastorno de termorregulación testicular) causado por el transporte, enfermedades genéticas y intoxicación.	Baja tasa de fertilización, pero con motilidad normal; identificación por microscopía de Baja tasa de fertilización, pero con motilidad normal; identificación	La alta incidencia de Knobbed como resultado de tasas de interés bajas o nulas fertilización in vitro.	Desfavorable en causas genéticas. No hay tratamiento debe de eliminar el animal; en otras situaciones, eliminar la causa de estrés.	

		ión por microscop ía de CF.			
Cabeza piriforme	Genética; estrés térmico (perturbación en la termorregula ción testicular) nutrición y uso de corticosteroi des.	Motilidad normal; acrosoma intacto; el ADN puede estar dañado; identificac ión con Microscop ia de CF y colorante s (giemsa, eosina- nigrosina y naranja acridina).	Uso de semen con 37% cabezas piriformes producen 11% embriones; perdida la tasa embrionaria alcanza el 23%.	Favorable en caso de estrés: eliminar la causa del estrés. Desfavorab le en causas genéticas. No hay tratamiento en caso de daño en el ADN	
Estrecho en base	Genética; estrés térmica (perturbación en termorregula ción testicular).	Motilidad normal; puede afectar la estructura del ADN; identificac ión por microscop ia de CF y colorante s (giemsa, eosina- nigrosina y naranja acridina).	Si hay daño en el ADN, la tasa de fertilidad es baja.	Favorable en caso de estrés. Reducir la casusa de estrés. Desfavorab le en causa de genética, no hay tratamiento en caso de daño en el ADN.	
Vacuolas nucleares; Formación de bolsa y cráteres	Estrés térmico (alteración de la termorregula ción testicular); trastornos hormonales; nutricional y genético	Motilidad normal; puede afectar la estructura del acrosoma y del ADN; identificac ión con microscop ia de CF.	Inseminación artificial con semen mostrando 8% de resultado de defectos de contorno en el 18% de los embriones. Bajas tasas de fertilización in vitro, porque las proteínas y los receptores	Favorable en caso de estrés. Eliminar la causa de estrés térmico (confinamie nto transporte o fiebre) y cambio dietético. Desfavorab	

			se ven afectados y reduce la capacidad de unirse a la ZP.	le en causas genéticas. Descartar el animal si no se ha recuperado después del tratamiento.	
Cola fuertemente enrollada	Estrés térmico y trastorno epitelial epidídimo.	Baja motilidad; identificación con CF y tinciones (giemsa, eosina-nigrosina y rosa de bengala).	Tasa de fertilización normal dependiendo del porcentaje del defecto en el eyaculado o dosis de semen.	Favorable. Eliminar la causa del estrés.	
Pieza intermedia anormal	Desarrollo incompleto del epitelio epidídimo; inmadurez; Solución hipotónica; trastornos de fluidos del epidídimo y glándulas adjuntas.	Motilidad alterada; identificación con Microscopía de FC y tinciones (eosina-nigrosina, giemsa y rosa de bengala).	La alta incidencia conduce a una baja motilidad y fertilidad.	Favorable. Se puede recuperar si se eliminan las causas.	
Gota citoplasmática distal.	Estrés térmico y desarrollo incompleto del epitelio epididimario (inmadurez).	Motilidad normal; identificación por microscopía de FC y tinciones (eosina-nigrosina, giemsa y rosa de bengala).	No afecta la fertilización.	Favorable. Puede normalizarse. La gota puede caerse con manipulación.	

Cabeza aislada	Estrés térmico; laminitis; toxemia; degeneración testicular; hipoplasia; inflamaciones de glándulas adjuntas; animales con largo periodo de colecta de semen y mala manipulación.	Sin motilidad; identificado con microscopía de FC y tinciones (eosina-nigrosina y rosa de bengala).	No existe fertilización in vivo e in vitro. Hay posibilidad solo con la técnica inyección intracitoplasmática de esperma.	Favorable si es eliminado la causas.	
Cabeza microcefalia	Estrés térmico; fiebre; adaptación al confinamiento; trastorno epitelial seminífero (animales jóvenes) y la obesidad (animales adultos).	Identificado con FC y tinciones (eosina-nigrosina, giemsa y rosa de bengala).	Afecta la fertilización; no presenta proteínas y receptores a ZP; ADN insuficiente.	Favorable si son eliminadas la causas.	

Cuadro 2

2.4 Técnicas para evaluar la morfología de los espermatozoides

Para evaluar la morfología de los espermatozoides, existen diferentes técnicas y tinciones. Algunas de las más utilizadas son las preparaciones húmedas observadas con microscopios de campo oscuro o bien las muestras teñidas con diferentes colorantes.

2.4.1 Eosina-Nigrosina

También conocida como técnica vital, es un procedimiento más usado en la viabilidad. Esta permite diferenciar espermatozoides vivos de los muertos debido al ser un colorante hipotónico que no penetra el interior de la célula por lo tanto aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no se pueden teñir y, por el contrario, si esta está dañada permite al colorante entrar al

interior de la célula, resultando de color blanco las células vivas y color rosa si están muertas. Esta tinción es útil para la evaluación de la morfología, pero debido a que es un colorante hipotónico al mezclarse a una muestra que no ha sido fijada químicamente, existe el riesgo de producir alteraciones de las células espermáticas principalmente anormalidades en la pieza media (Peña y Linde, 2000).

2.4.2 Hematoxilina-Eosina

La hematoxilina es otra de las tinciones utilizadas para evaluar la morfología espermática. Es tinción se deriva del producto oxidado de la hemateína, teniendo reacción en la coloración del nucleoplasma y el ribosoma citoplasmático, provocando una tinción violeta azulado intenso. El colorante ácido de la eosina tiñe al citoplasma y la matriz intercelular se puede usar eosina amarillenta, azulada y solvente en etanol. El resultado de la tinción hematoxilina es color rosa-naranja para el citoplasma y rojo en la coloración de hematíes (Megías *et al.*, 2023). A diferencia de la anterior no permite evaluar células vivas de las muertas.

2.4.3 Tinción catiónico C.I 52040 o Azul de toluidina

Colorante del núcleo que genera una respuesta cuando tiene una relación con la cromatina, la TB es útil para la evaluación de la cromatina nuclear de la célula espermática mediante la identificación de la ausencia o ruptura de enlaces disulfuro. El método de tinción con colorante TB consiste en un método simple y posibilita la determinación al mismo tiempo de la morfología y la condensación de los espermatozoides, aunque esta tinción es más concurrenida para la condensación (Santiso, 2013).

2.4.4 Tinción pap

Coloración compuesta por tres tinciones, la hematoxilina la cual tiene reacción sobre los núcleos, el Oran G y la EA-50 la cual tinte los citoplasmas, esta tinción permite teñir bien a los espermatozoides. Esta técnica tiñe las partes del acrosoma, el citoplasma residual en exceso, la pieza intermedia y principal, además de ser útil en la evaluación de la morfología espermática y examen de células germinales inmaduras (World Health Organization 2021).

2.4.5 Diff-Quik

Sousa *et al.*, (2008) la describe como una tinción clasificada Romanosvsky consiste en la composición de tres reactivos ya que es una tinción fácil y rápida integrada por tres componentes un fijado (alcohol), colorante (eosina) dando como resultado la tinción de los prótidos color rojo y un tercer componente el azul de metileno generando una reacción de tinción sobre la cromatina.

Diff-Quik es una tinción rápida, en varios experimentos ha demostrado ser un método confiable en el área de reproducción, específicamente para la evaluación morfológica espermática cuando se colabora con esta tinción (Coetzee *et al.*, 2001).

2.4.6 Hemocrom

Hemocrom es un método de tinción que se utiliza en la investigación frecuentemente en citología mediante frotis, teniendo diferentes aplicaciones en el diagnostico hematológico mediante la observación las células sanguíneas, citoplasma y paracitos, cumple con las propiedades como una alternativa sobre los colorantes de Wright y Giemsa, además tiene la ventaja de una tinción rápida, manual, policromatica y una similitud a la tinción de tipo Romanoswsky.

3. Materiales y métodos

3.1 Ubicación del estudio

El experimento se realizó en el norte de México, en el Centro de Investigación en Producción Animal (CIPA UL) del Departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna en la ciudad de Torreón Coahuila (25° 31' 11 N Y 103° 25' 57' O) durante los meses de junio y julio. El área geográfica tiene una altitud de 1123 msnm con una precipitación pluvial de 230 mm y con una temperatura promedio de 24°C, siendo de 41°C la máxima durante primavera-verano y la mínima de -1°C durante el invierno (CONAGUA ,2015).

3.2 Manejo y alimentación de los animales

Se utilizaron 6 machos caprinos de raza Alpina-francesa, de 12 a 14 meses de edad, con un peso vivo de 24 ± 3.2 kg y una condición corporal de 2.5 puntos (Escala de 1 a 5 pts). Previo al experimento los machos fueron entrenados para la recolección del semen empleando una hembra en estro. Durante el experimento, los machos se alimentaron a base de alfalfa (18% PC, 1.95 Mcal de EM) y se les ofreció agua limpia a libre acceso.

3.3 Colección y procesamiento del semen

El semen fue recolectado por la mañana cada sábado durante un mes utilizando una hembra en estro. La recolección del semen se realizó con una vagina artificial para pequeños rumiantes a una temperatura de 38-42 °C. Posterior a cada extracción, el semen se introdujo rápidamente en un baño maría a una temperatura de 37 °C hasta su análisis macro y microscópico en un tiempo no mayor a 10 min. Se evaluó el volumen, la concentración y la motilidad de cada eyaculado y solo se utilizaron aquellos eyaculados que tenían un volumen ≥ 0.5 mL, una concentración espermática $\geq 2500 \times 10^6$ y una motilidad en masa mayor a 3.0 (escala de 0 a 5). Para realizar ambas tinciones, la muestra de semen se diluyó con NaCl al 0.9% hasta obtener una concentración final de 800×10^6 spz/mL.

3.4 Tinción de espermatozoides

3.4.1. Tinción Eosina-Nigrosina

Para la tinción de E/N se realizó un frotis de semen. Para esto se tomaron 10 μ L de semen sobre un portaobjetos atemperado. Luego se colocaron 10 μ L de la tinción de eosina-nigrosina y con una punta de la micropipeta se mezclaron para posteriormente con otro portaobjetos dispersarse hacia la parte ancha del portaobjeto para extender la muestra. Una vez realizado los frotis, estos se dejaron secar durante 1 min hasta su visualización en el microscopio.

3.4.2. Coloración con Hemocrom

Para la tinción de Hemocrom se realizó un frotis sanguíneo. Se tomaron 10 μ L de la muestra de semen que se colocaron sobre un portaobjeto atemperado para luego con otro portaobjeto extender la muestra sobre el portaobjeto. El portaobjetos se introdujo en la solución de fijación (Solución fijadora) de alcohol etílico al 70% durante 2 min. Enseguida de la fijación, se colocaron en la solución de Eosina Amarillenta (Solución 2) por 2 min. Pasado este tiempo las muestras se lavaron con agua destilada para eliminar el excedente y por último, se sumergieron en la solución 3 a base de azul de metileno, azules y Giemsa por 2 min y al final se enjuago con agua destilada.

3.5 Análisis morfológico del espermatozoide

La morfología espermática se evaluó mediante un microscopio de campo claro utilizando un objetivo de 40X por la misma persona. De cada muestra se analizaron un total de 200 células espermáticas. Las anomalías que se observaron fueron las siguientes: Decapitados, gota citoplasmática distal, gota citoplasmática proximal, cola enrollada, cola quebrada, vacuolas, microcéfalo, cabeza redonda, implantación retroraxial, acrosoma de contorno anormal, macrocéfalo, cola fuertemente enrollada, piriforme, cabeza doble, pieza intermedia con reflejo distal, doble flageló, pieza intermedia rota, pieza media y doble cola, "DaG" Defecto de cola muy curvada con caída, cola enrollada con gota, cabeza piriforme con gota proximal, Diadem defect pouch, Knobed sperm,

implantación abaxial. Las células fueron clasificadas en normales, anomalías totales, anomalías de la cabeza y del flagelo.

3.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete SAS (SAS University) con una prueba de TTEST. Se consideró que había diferencia estadística significativa si el valor de $P < 0.05$. Los datos se muestran como porcentajes.

4. Resultados

Los resultados obtenidos del presente estudio se muestran en el cuadro 1. No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células normales en las muestras de semen evaluadas ($P > 0.05$). Asimismo, tanto en la tinción de E/N como la del Hemocrom las anomalías de los espermatozoides totales, así como de la cabeza y el flagelo fueron similares ($P > 0.05$).

Cuadro 1. Resultados obtenidos de la morfología espermática de machos, evaluado con Hemocrom® y Eosina/Nigrosina.

	Hemocrom®	Eosina/Nigrosina	Valor p
Normales (%)	89.3 ± 3.3	87.9 ± 2.8	
Espermatozoides anormales (%)	10.7 ± 3.3	12.1 ± 2.8	
Alteraciones de la cabeza (%)	0.9 ± 0.8	1.3 ± 0.8	
Alteraciones del flagelo (%)	6.8 ± 3.1	6.8 ± 2.3	

5. Discusión

La evaluación de la morfología espermática es útil para predecir la capacidad de fertilización de los espermatozoides y está relacionada con la concepción de las hembras (Xu *et al.*, 2022) y es uno de los criterios más importantes para determinar la calidad de una muestra de semen (Van der Horst y Maree, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, la morfología de los espermatozoides puede evaluarse mediante diferentes tinciones o incluso en preparaciones húmedas con un microscopio de campo oscuro. Entre las tinciones más utilizadas están la de Eosina-nigrosina, Papanicolaou, Diff-Quick, Spermac, Hematoxilina, Giemsa entre otras. Sin embargo, algunas de estas tinciones requieren mucho tiempo en comparación con algunos de los métodos rápidos, son complejas e involucran muchos químicos o microscopios especializados que no están al alcance de muchos laboratorios (Van der Horst y Maree, 2009; Czubaszek *et al.*, 2019). No obstante, independientemente del método que se utilice, la evaluación de la morfología de los espermatozoides requiere que sean teñidos de manera diferencial, indicando claramente los límites del acrosoma, la cabeza, la pieza media y la cola para evaluar cada parte (Van der Horst y Maree, 2009).

En nuestro estudio el método de tinción no afectó en los resultados de la evaluación de la morfología de los espermatozoides de los machos cabríos. Tanto en la tinción de eosina-nigrosina como en la tinción de Hemacolor, mostraron una similitud en las alteraciones morfológicas encontradas en la cabeza, pieza media y flagelo, lo que indica que ambas tinciones pueden ser utilizadas para la evaluación de la morfología espermática en caprinos. Estos resultados, coinciden con lo reportado por otros autores quienes mencionan que el método de tinción no influyó en la evaluación morfológica de los espermatozoides en caprinos (Davis y Gravance, 1993; Foote 2003; Hidalgo *et al.*, 2006). La tinción de Eosina-Nigrosina es una de las tinciones más utilizada en los laboratorios de evaluación del semen tanto en humanos como en animales ya que también se puede emplear como prueba de viabilidad del semen al diferenciar espermatozoides vivos de los muertos (Van der Horst y Maree, 2009). Por su parte, Hemacolor es una tinción rápida muy utilizada en hematología y

citología, así como en espermatozoides (Hidalgo *et al.*, 2005; 2006; Lim *et al.*, 2013).

El porcentaje de anomalías espermáticas totales con Hemocrom® y eosina-nigrosina fue del 10.7 ± 3.3 y 12.1 ± 2.8 %, respectivamente. En caprinos, las alteraciones morfológicas de los espermatozoides varían del 15 al 20% sin afectar la fertilidad de los machos (Roca *et al.*, 1992). El porcentaje de alteraciones morfológicas encontradas en nuestro estudio fue inferior al límite del 15% establecido por Kafi *et al.*, (2004) y similar a los resultados obtenidos por Karagiannidis *et al.* (2000). En otros estudios obtenidos sobre la morfología de espermatozoides del macho caprino se observaron un menor porcentaje de defectos totales en semen fresco en comparación con nuestro estudio, sin embargo, son similares a los observados en la cabeza y defectos del flagelo como gota citoplasmática distal y cabeza decapitada (Barkawi *et al.*, 2006; Zamiri y Heidari 2006). Además, estudios realizados en espermatozoides de caballos recolectados del epidídimo se observó que la tinción puede influir en la evaluación de la morfología de los espermatozoides (Soler *et al.*, 2005). En su estudio, Soler *et al.* (2005) encontraron que la tinción de Diff-Quik era mejor que la de hematoxilina y hemacolor para determinar las alteraciones en los espermatozoides debido a que se observaron un mayor número de alteraciones en las muestras teñidas con Diff-quick que con las otras tinciones. Asimismo, otros factores que se deben tener en cuenta a la hora de determinar la morfología de una muestra de semen son el número de células evaluadas, las cuales deben ser más de 200, así como la experiencia del técnico (Davis y Gravance, 1993; Hidalgo *et al.*, 2006; Murcia-Robayo, 2018).

6. Conclusión

Nuestro estudio demostró que las tinciones de eosina nigrosina y hemacolor tienen un efecto similar en el análisis de los parámetros de las alteraciones en la morfología de los espermatozoides de caprinos con parámetros similares en cada método de tinción. Es por ello que la tinción de hemacolor puede utilizarse para el análisis de la morfología espermática en muestras de semen caprino. Es necesario realizar más estudios para comparar diferentes tinciones, así como su efector en la morfometría de los espermatozoides y estandarizar los criterios de evaluación de la morfología en caprinos como ocurre en otras especies.

7. Referencias

- Abali, A. L., Anoh, K. U., & Suleiman, I. O. (2018). Relationships between sperm morphology and semen cation concentrations in red sokoto goats (*Capra aegagrus hircus*). *International Journal of livestock production*, 9(6), 108-111.
- Barkawi, A. H., Elsayed, E. H., Ashour, G., & Shehata, E. (2006) Seasonal changes in semen characteristics, hormonal profiles and testicular activity in Zaraibi goats. *Small Rumiant Research*, 66(1-3), 209-212. Doi:10.1016/j.smallrumres.2005.09.007.
- Begemann, H., Rastetter, J. (1989). Light Microscopic Procedures. In: *Atlas of Clinical Hematology*. 4TH Edition pp 11-29.
- Boeta, M., Balcázar, A., Cerbón, J., Hernández, M. J., Hernández, C. J., Páramo, R., & Zarco, L. (2018). *Fisiología reproductiva de los animales domésticos*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia. Primera edición (2018).
- Brito, L. F., da Silva, M.C., & Kolster, K. A. (2025). Standardisation of Dog Sperm Morphology Classification. *Reproduction in Domestic Animals*, 60(2).
- Carrillo, D. Hernández, D. (2016). Caracterización seminal de individuos ovinos criollos colombianos de pelo en el departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. 8(2): 197 – 203
- Casabiell, J. (2006). Eje hipotálamo-hipófiso-testicular. Arce VM, Catalina PF, Mallo F. *Endocrinología*. Universidad de Santiago de compostela y Universidad de Vigo, 11, 89-94.
- Coetzee, K., Bermes, N., Krause, W., & Menkveld, R. (2001). Comparison of normal sperm morphology outcomes from two different computer-assisted semen analysis systems. *Andrologia*, 33(3), 159–163. DOI. [10.1046/j.1439-0272.2001.00421.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2001.00421.x)
- Czubaszek, M., Andraszek, K., Banaszewska, D., & Walczak-Jędrzejowska, R. (2019). The effect of the staining technique on morphological and morphometric

- parameters of boar sperm. PLOS ONE, 14(3), e0214243. doi:10.1371/journal.pone.0214243
- Davis, R. O., & Gravance, C. G. (1993). Standardization of specimen preparation, staining, and sampling methods improves automated sperm-head morphometry analysis Supported, in part, by grant RO1-ES03614 from the National Institutes of Health, Bethesda, Maryland. *Fertility and Sterility*, 59(2), 412–417. doi:10.1016/s0015-0282(16)55686-6
- Foot, R. H. (2003). Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads. *Theriogenology*, 59(8), 1765–1773. doi:10.1016/s0093-691x(02)01236-0
- Frederico, C., Alves, M., & Días, A. (2016). Atlas de morfología espermática Bovina. Embrapa cerrados. Brazil.1 Edición. Pp 14-15.
- Gadella, B. M., & Luna, C. (2014). Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. *Theriogenology*, 81(1), 74–84. DOI:10.1016/j.theriogenology.2013.09.005
- Gatimel, N., Moreau, J., Parinaud, J., & Leandri, R. D. (2017). Sperm morphology: assessment, pathophysiology, clinical relevance, and state of the art in 2017. *Andrology*, 5 (5), 845-862. DOI:10.1111/andr.12389
- Griswold, M. M. (1998). The central role of sertoli cell in spermatogenesis 9(4), 0-416. doi:10.1006/scdb.1998.0203
- Hafez, E.S.E., & Hafez, B. (2000) Reproduction in farm animal. 7th Edition. Lippincott williams & wilkins pp. 96-109.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., & Dorado, J. (2006). Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology*, 66(4), 996–1003. DOI:10.1016/j.theriogenology.2006.02.0391
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., & Soler, C. (2008). Morphometric classification of Spanish thoroughbred stallion sperm heads. *Animal Reproduction science*, 103(3-4), 374-378.

- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J., Sanz, J., & soler, C. (2005). Effect of simple size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet Med-Czech*, 50 (1), 24-32.
- Kafi, M., Safdarian, M., & Hashemi, M. (2004). Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams. *Small Ruminant Research*, 53(1-2), 133–139.
- Karagiannidis, A., Varsakeli, S., & Karatzas, G. (2000). Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Theriogenology*, 53(6), 1285–1293. DOI:10.1016/s0093-691x(00)00272-7
- Koziol, J. H., & Armstrong, C. L. (2018). Society for theriogenology manual for breeding soundness examination of bulls. Society for Theriogenology.
- Lim, C. J., Yoo, J.-H., Kim, Y., Lee, S. Y., & Ryu, P. D. (2013). Gross Morphological Features of the Organ Surface Primo-Vascular System Revealed by Hemacolor Staining. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 1–12. doi:10.1155/2013/350815
- McLachlan, R. I. (2000). The endocrine control of spermatogenesis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 14(3), 345-362.
- Megías M, Molist P, Pombal MA (2023). Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.
- Murcia-Robayo, R. Y., Jouanisson, E., Beauchamp, G., & Diaw, M. (2018). Effects of staining method and clinician experience on the evaluation of stallion sperm morphology. *Animal reproduction science*, 188, 165-169.
- Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 10–26. DOI:10.1016/j.semcdb.2016.04.009.
- Newcombe, J. R. (1999). Practical evaluation of the fertilizing capacity of frozen-thawed horse semen. *Veterinary Record*, 145(2), 46-47

- O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G., & McLachlan, R. L. (2006). Endocrine regulation of spermatogenesis. In Kobil and Neill's physiology of reproduction. Academic Press. Pp 1017-1069
- Oral, E., Yetis, O., Elibol, F., Senol, H., Irez, T., & Aksu, F.M. (2002). Assessment of human sperm morphology by strict criteria: comparasion of wet preparation versus stained with the modified Diff-Quick method. Archives of Andrology, 48(4), 307-314.
- Peña, A., & Linde-Forsberg, C. (2000). Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. Theriogenology, 54(5), 703–718. DOI: [10.1016/s0093-691x\(00\)00384-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00384-8)
- Pineda, H. M., & Dooley, M. P. (2003) McDonalds's veterinary endocrinology and reproduction. Iowa State Press 5th Edition, pp. 25-34.
- Roca, J., Martínez, E., Sánchez-Valverde, M. A., Ruiz, S., & Vázquez, J. M. (1992). Seasonal variations of semen quality in male goats: Study of sperm abnormalities. Theriogenology, 38(1), 115 –125. doi:10.1016/0093-691(92)90223-e
- Santiso R., (2013) análisis de la fragmentación del ADN de espermatozoides humanos mediante el test de dispersión de la cromatina espermática: origen, causas e impacto en reproducción asistida. Universidad da Coruña.
- Shirazi, M. S., Heidari, B., Shirazi, A., Zarnani, A. H., Jeddi-Tehrani, M., Rahmati-Ahmadabadi, M., ... Akhondi, M. M. (2014). Morphologic and proliferative characteristics of goat type a spermatogonia in the presence of different sets of growth factors. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 31(11), 1519–1531. doi:10.1007/s10815-014-0301-5
- Soler, C., Gadea, B., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., Estes, M. C., Núñez, J., ... Garde, J. J. (2005). Comparison of three different staining methods for the assessment of epididymal red deer sperm morphometry by computerized analysis with ISAS®. Theriogenology, 64(5), 1236–1243. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.02.018

- Sousa, A. P. M., Tavares, R. S., Velez de la Calle, J. F., Figueiredo, H., Almeida, V., Almeida-Santos, T., & Ramalho-Santos, J. (2008). Dual use of Diff-Quik-like stains for the simultaneous evaluation of human sperm morphology and chromatin status. *Human Reproduction*, 24(1), 28–36. DOI [10.1093/humrep/den365](https://doi.org/10.1093/humrep/den365)
- Szablicka, D., Wysokinska, A., Pawlak, A., & Roman, K. (2022). Morphometry of boar spermatozoa in semen stored at 17 C – the influence of the staining technique. *Animal*, 12(15) 1888.
- Tibary, A., Boukhilg, R., & El Allali, k. (2018). Ram and buck breeding soundness examination. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et veterinaires*, 6(2), 241-255.
- Van der Horst, G., Maree, L., 2009. SpermBlue®: una nueva tinción universal para espermatozoides humano y animal, compatible también con el análisis automatizado de la morfología espermática. *Biotech. Histochem.* 84, 299–308.
- Vera-Muñoz, O., 2008. Fisiología de los espermatozoides bovinos en: *Desarrollo sostenible de ganadería doble propósito*, C Gonzales-Stagnaro, E. Soto-Belloso (eds.). Fundación GIRARZ. Ediciones Astroda S.A 5(40): 498-499.
- Wang, J., Bermes, W., Shen, L., Zheng, A., Meng, Q., Li, H., Yang, S. (2022). Clinical detection, diagnosis and treatment of morphological abnormalities of sperm flagella: A review of literature. *Frontiers in genetics*, 13, 1034951.
- World Health Organization. (2021) WHO laboratory manual for the examination and processing of the human semen, 6th ed. World Health Organization.
- Xu, Y. H., Lu, J. C., & Tang, S. S. (2022). Effects of six kinds of sperm staining methods on human sperm size and evaluation of their staining effects. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 36(12).
- Zamiri, M. J., & Heidari, A. H. (2006). Reproductive characteristics of Rayini male goats of Kerman province in Iran. *Animal Reproduction Science*, 96(1-2), 176-185.