

Importancia de la evaluación de la aptitud reproductiva mediante el análisis de semen por sistemas CASA

Anthony Valverde*
anvalverde@tec.ac.cr



Figura 1: Métodos de extracción de semen en verracos y toros. El método de extracción seminal en porcino es por medio de estimulación manual en el potro de monta mientras que en el caso del bovino es por electroeyaculación. Finca “La Esmeralda” y Finca “La Vega”, Programa de Producción Agropecuaria (PPA), Escuela de Agronomía, Campus San Carlos.

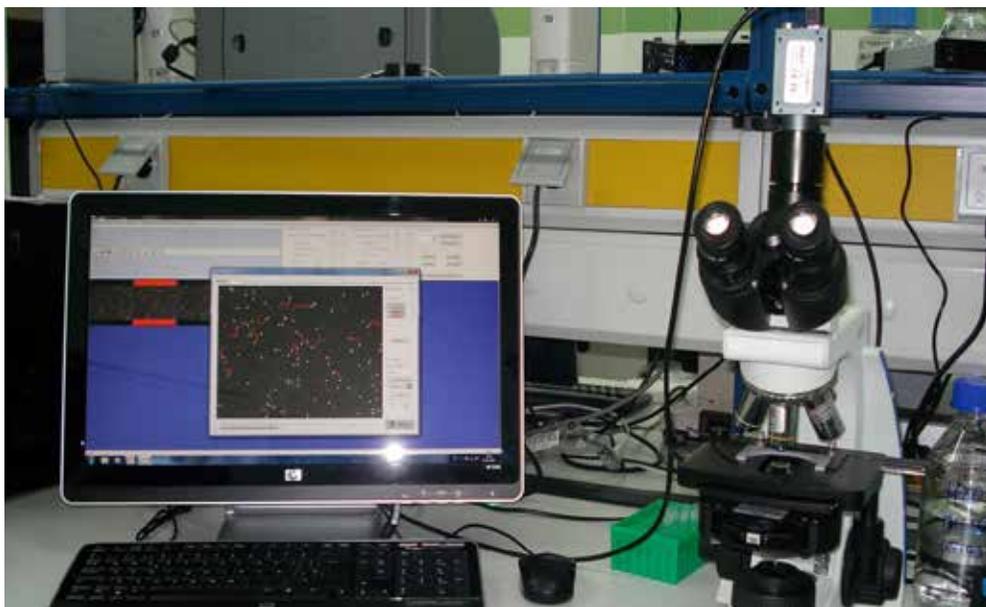


Figura 2: Sistema CASA (*Computer-Assisted Sperm Analysis*) conectado al microscopio de contraste de fase y cámara de alta resolución.

Palabras clave:

Reproducción, espermatozoide, sistemas CASA, movilidad, verraco, toro.

El objetivo de la evaluación de semen en los animales destinados a la reproducción es estimar el nivel de fertilidad de la muestra analizada. Históricamente, se han tratado de definir criterios biológicos mínimos para considerar un animal apto o no apto para la reproducción. Además, como resultado de la evaluación de la calidad seminal, se pueden implementar biotecnologías reproductivas como la inseminación artificial con el propósito de optimizar la producción de dosis seminales a partir de un eyaculado.

Entre las técnicas reproductivas, la inseminación artificial ha sido la más importante en las especies ganaderas como el bovino, porcino, caprino y ovino. Sin embargo, el desarrollo de esquemas de reproducción asistida no es tan simple y se deben considerar varios parámetros que actúan entre sí, siendo la concentración, la movilidad y la morfología espermática los más comúnmente aceptados.

Como parte de la evaluación de la aptitud reproductiva en las especies ganaderas, se debe hacer una correcta valoración física general y anatómica de los órganos reproductivos externos de los machos, como los testículos, escroto, prepucio y el pene de los

animales. Esta valoración se acompaña siempre de la extracción seminal correspondiente y la técnica de extracción del eyaculado puede variar en función de la especie con la que se trabaja.

En el caso de la especie porcina la extracción de semen se realiza por estimulación directa del animal frente a un potro de extracción o “maniquí” mientras que, en el caso de la especie bovina, el método regularmente utilizado es por electroeyaculación (Figura 1).

Cuando se realiza un análisis seminal de forma subjetiva es muy difícil conseguir un

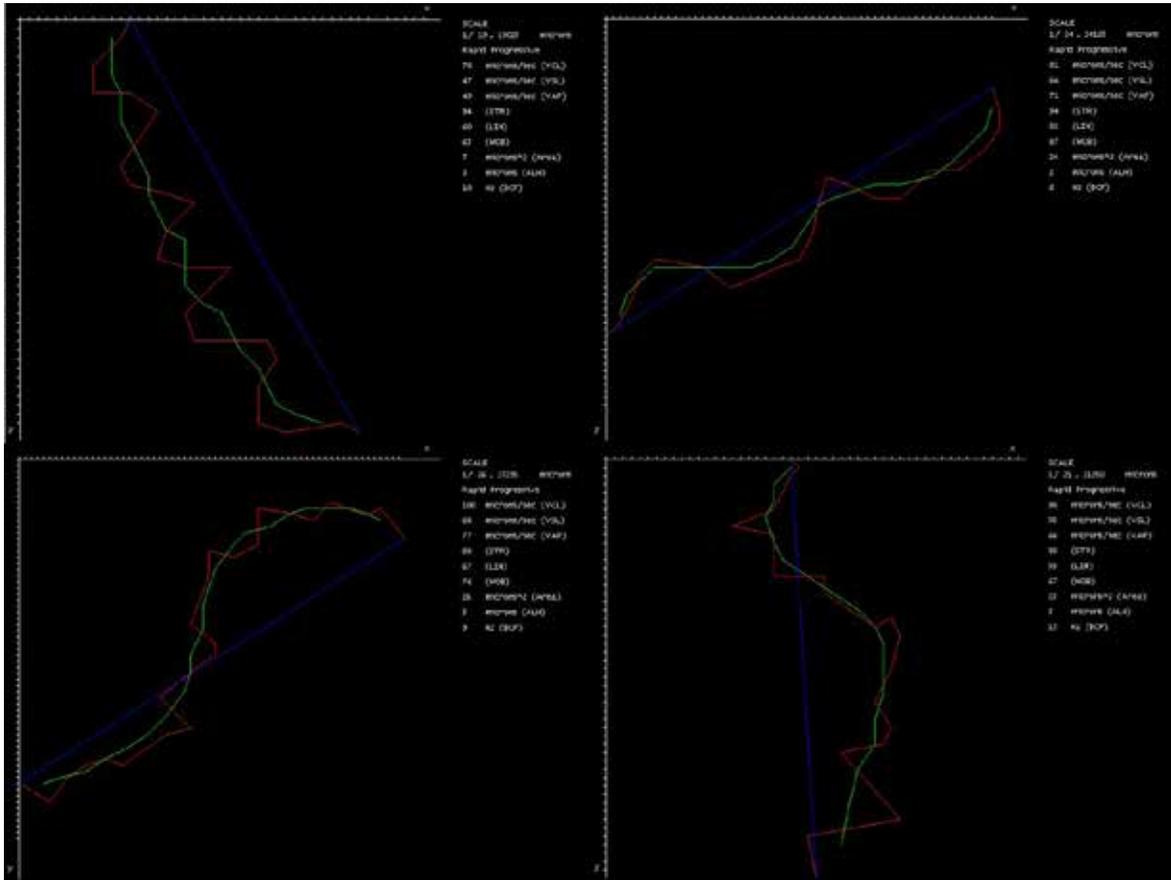


Figura 3: Trayectorias representativas de espermatozoides de verraco analizados con un sistema CASA-Mot.

mínimo de fiabilidad y repetibilidad en las valoraciones realizadas. El análisis de parámetros seminales se ha realizado mediante evaluación subjetiva, resultando en variaciones de hasta un 60% entre personas evaluadoras.

Los sistemas de análisis seminal asistidos por computadora (*Computer-Assisted Sperm Analysis*, CASA, Figura 2), inicialmente desarrollados en la década de los 80 del siglo XX, proporcionan una evaluación más objetiva de la movilidad de los espermatozoides que la estimación visual, así como información de variables cinéticas.

Los dispositivos de evaluación computarizada generalmente consisten en un microscopio de contraste de fase negativo, que permite observar los espermatozoides blancos sobre un fondo oscuro. Con esta técnica, la cabeza de los espermatozoides permanece visible, independientemente de su movi-

miento, ya que con el uso de un contraste de fase positivo (el más común en la mayoría de las marcas comerciales de microscopía), las células aparecen y desaparecen en función del ángulo con que se proyecten sobre la imagen. Además, su uso permite la visualización de las colas, lo que facilita la identificación de los que realmente son espermatozoides, diferenciándolos así de las posibles partículas del fondo.

Por otra parte, el sistema CASA utiliza una cámara de alta resolución, un escáner de imágenes y un ordenador con un programa informático especializado para guardar y analizar los datos, que es en el que pueden encontrarse mayores variaciones entre diferentes sistemas, ya que cada uno utiliza una aproximación diferente en el diseño de la programación necesaria para el análisis; no obstante, todos parten del conjunto común de las técnicas de análisis de imagen.

Estos dispositivos funcionan con la captura del movimiento celular, reconstruyendo las trayectorias de los espermatozoides y la posición de estos en animaciones sucesivas, y calcula varios parámetros de movilidad y concentración simultáneamente. Una característica de reproducción insertada en la mayoría de estos dispositivos permite la proyección de las secuencias de vídeo del último campo evaluado, proporcionando un control adicional para validar si todos los espermatozoides fueron identificados y si su trayectoria fue reconstruida correctamente.

El desarrollo del análisis espermático permite mejorar la precisión y eficacia de la evaluación de los parámetros seminales. Los sistemas CASA-Mot proporcionan más información que la evaluación clásica mediante la realización de exámenes adicionales, como la diferenciación entre el porcentaje de movilidad total y progresiva y el cálculo de otros parámetros de cinética



Figura 4: Cámaras de recuento espermático reutilizables (a) y desechables (b) con diferentes profundidades entre porta y cubreobjetos. El principio de llenado de la muestra varía según el tipo de cámara de recuento, por dispersión de la gota (a) o capilaridad (b).

avanzada del espermatozoide como la velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$).

Esta se calcula mediante la unión de las coordenadas del centroide del espermatozoide en cada una de las imágenes analizadas; la velocidad rectilínea (VSL; $\mu\text{m/s}$), que se estima uniendo el primer y el último punto de la trayectoria curvilínea, indicando el desplazamiento neto de la célula en el tiempo considerado; y la velocidad media de la trayectoria (VAP; $\mu\text{m/s}$), que se calcula como una interpolación entre los puntos correspondientes a la VCL, en un intento de mejorar la aproximación al desplazamiento real de la célula.

A partir de estas tres mediciones se calculan tres índices, en porcentaje: la linealidad ($\text{LIN}=\text{VSL}/\text{VCL}$), la rectitud ($\text{STR}=\text{VSL}/\text{VAP}$) y la oscilación ($\text{WOB}=\text{VAP}/\text{VCL}$) de las trayectorias, con lo que queda caracterizada la calidad del movimiento espermático. Además, se aporta la BCF (frecuencia de entrecruzamiento, Hz) expresada como número de veces que la

trayectoria curvilínea cruza la lineal y la ALH (desplazamiento lateral de la cabeza, μm), como la altura máxima (o media) de la amplitud del movimiento oscilatorio o curvilíneo (Figura 3).

Además, la disponibilidad de información registrada por computadora facilita la comparación de resultados y permite detectar posibles diferencias en los parámetros seminales en diferentes situaciones o ensayos experimentales.

Los sistemas CASA han sido utilizados para el análisis espermático de diferentes especies domésticas con el fin de diagnosticar la fertilidad del eyaculado. La adopción del empleo de los sistemas CASA tiene el potencial de mejorar la evaluación del semen, diagnosticando de mejor forma la calidad y fertilidad del semen. Por ejemplo, el uso de los sistemas CASA-Mot proporciona información relevante para la producción de dosis seminales y el control de calidad planeado para comercialización o investigación.

Sin embargo, esta evaluación podría verse afectada por varios factores o artefactos involucrados en los análisis. Numerosos factores no relacionados con las muestras de semen podrían introducir variación en el análisis de la movilidad espermática. Varios trabajos han confirmado que el tipo de cámara utilizada para el análisis (con diferentes características, alturas y profundidades, Figura 4) podría afectar la evaluación de la motilidad espermática en las especies ganaderas. Sin embargo, ha habido una investigación limitada sobre el efecto de las características de las cámaras de recuento, la tasa de fotogramas o los tiempos de análisis sobre la movilidad de los espermatozoides, y menos aún sobre la cinética de estos.

A pesar de la aparente simplicidad del gameto masculino (espermatozoide), esta célula especializada presenta una enorme diversidad en tamaño, forma y calidad del movimiento. Dada su importancia en el proceso reproductivo, se ha desarrollado una batería de técnicas para estudiar la calidad y la función de los espermatozoides. Entre estas técnicas, el estudio de la morfología espermática se considera una parte esencial del análisis de semen que refleja, más que la movilidad, las características genéticas y de ADN de la célula (Figura 5).

Las alteraciones morfológicas de los espermatozoides están relacionadas con tasas bajas de fecundidad (Figura 6). Sin embargo, las estimaciones subjetivas de la morfología del espermatozoide carecen de precisión, repetibilidad y exactitud. Por ejemplo, en programas de control de calidad, se han estimado coeficientes de variación entre técnicos que oscilan entre 10 y 80%. Esta gran variabilidad ha limitado la utilidad de dicha evaluación morfológica como un predictor de calidad del semen para la reproducción. Paralelamente al desarrollo de los sistemas CASA-Mot, se diseñaron sistemas comerciales CASA-Morph para reducir la subjetividad de la evaluación de la morfología del espermatozoide debido a que la capacidad predictiva de los aspectos morfológicos de la calidad del espermatozoide puede aumentar cuando se utilizan criterios morfométricos, en lugar de morfológicos. Los métodos futuros de

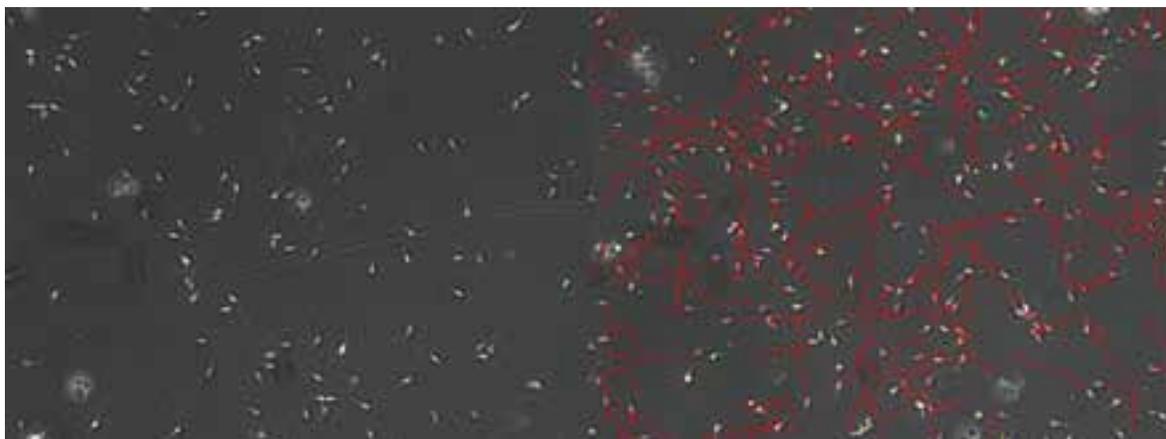


Figura 5: Valoración de espermatozoides de verraco mediante el sistema CASA-Mot y descripción de trayectorias celulares.

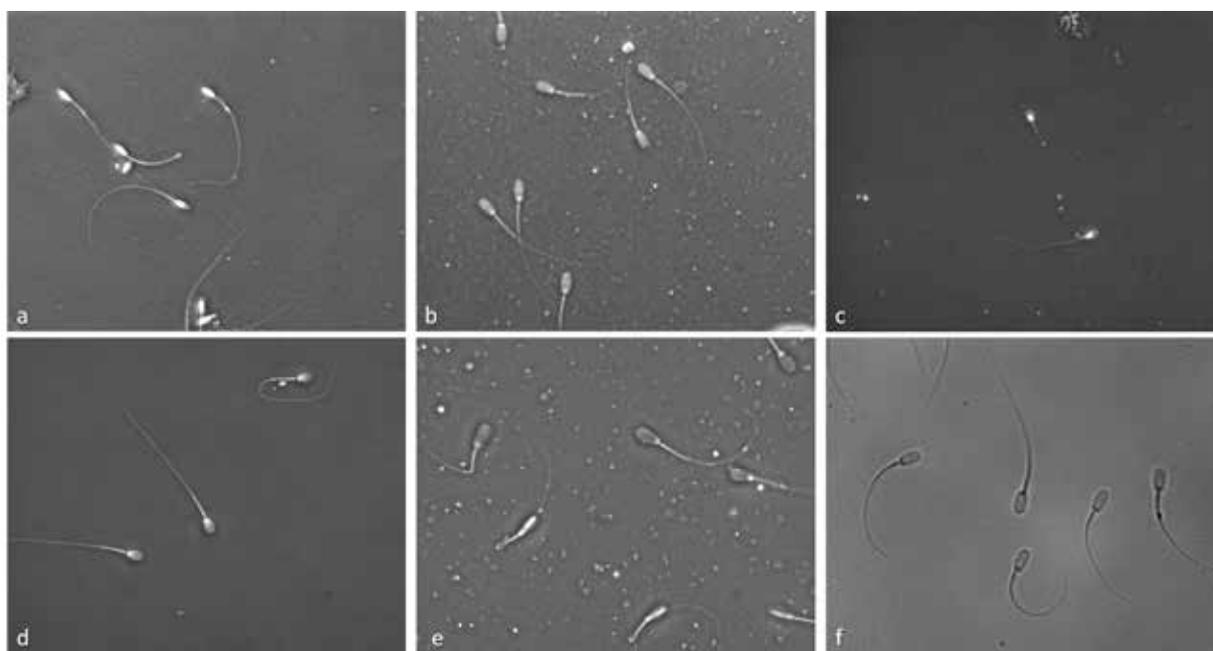


Figura 6: Variación en la morfología de espermatozoides de diferentes especies de mamíferos. (a) Equino, (b) caprino, (c) humano, (d) canino, (e) bovino y (f) porcino.

análisis de la morfología espermática probablemente tendrán más capacidades de automatización, incluido el registro automático de las diferentes morfoanomalías.

La mayoría de los estudios publicados sobre la morfometría de los espermatozoides se han centrado principalmente en la cabeza del espermatozoide (Figura 7), aunque otros también han medido otras partes de la estructura del espermatozoide, como el núcleo, el acrosoma, la pieza intermedia o el flagelo completo (cola, incluida la pieza intermedia). Se han utilizado diferentes

parámetros para describir la morfometría de la cabeza de los espermatozoides, pero los más comúnmente aceptados son: parámetros primarios que proporcionan información sobre las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides y generalmente incluyen longitud (L , μm), ancho (W , μm), área (A , μm^2) y perímetro (P , μm); y parámetros derivados como aproximaciones a la forma de la cabeza usando una serie de fórmulas matemáticas, incluyendo elipticidad = L/W , rugosidad = $4\pi A/P^2$, alargamiento (falta de redondez) = $(L-W)/(L+W)$ y regularidad = $\pi LW/4A$. Los resultados morfométricos

pueden estar influenciados por factores internos y externos en los animales. Los factores intrínsecos incluyen factores genéticos o ambientales, edad, madurez sexual y frecuencia de muestreo.

Sin embargo, el factor más importante es la introducción de artefactos como consecuencia de las técnicas de tinción celular. En cierto modo, este proceso implica la deshidratación de las células, lo que introduce un cambio sensible en la morfología final observada. La fijación de las muestras mediante fijadores químicos también

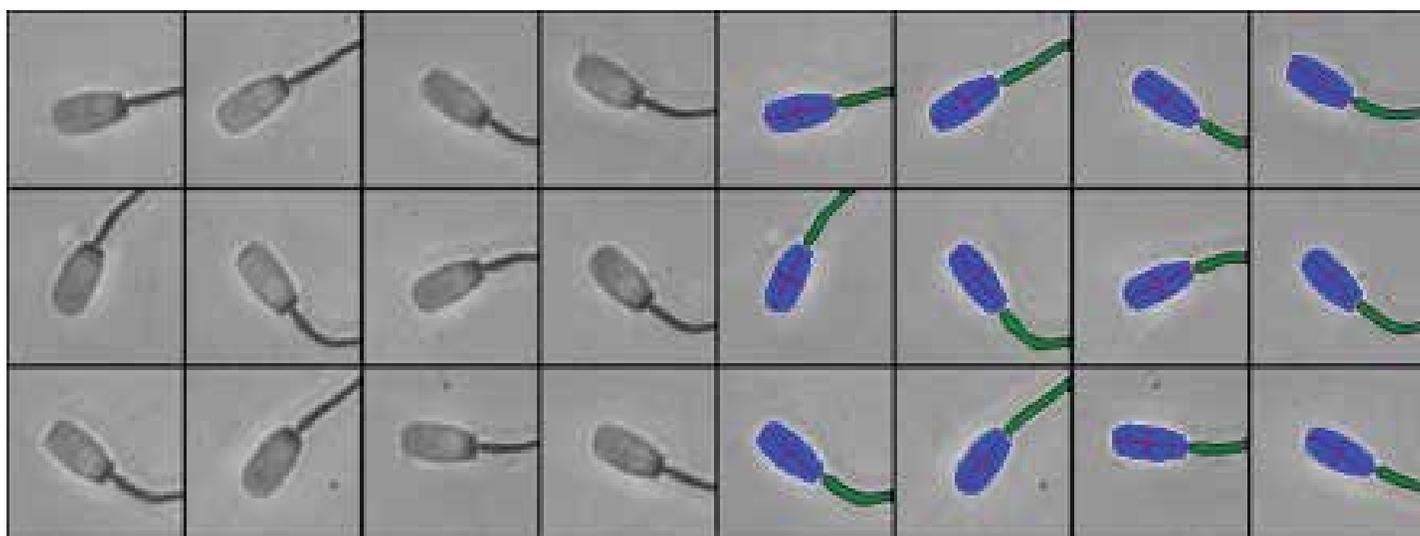


Figura 7: Morfometría espermática de verraco analizada con el sistema CASA-Morph. Nótese los espermatozoides y las respectivas “máscaras” de evaluación.

introduce cambios en la morfometría celular final. Para superar esta limitación, ahora se dispone de nuevas técnicas de fijación celular sin uso de tinciones y con ayuda de conceptos de temperatura y presión para la inmovilización de las células.

El uso de la morfometría geométrica es una alternativa prometedora para este propósito. La reciente introducción de sistemas de fijación de espermatozoides sin uso de tinciones, combinado con la microscopía de contraste de fase negativa o microscopía de fluorescencia, son alternativas prometedoras a los protocolos convencionales. La evaluación de la morfometría de los diferentes componentes de los espermatozoides, por ejemplo, mediante la citometría de flujo, proporcionaría información valiosa en los campos de la biología evolutiva y la función de los espermatozoides.

Se necesitan más estudios profundos sobre la posible asociación entre la movilidad y la morfometría de los espermatozoides en las subpoblaciones espermáticas dentro del eyaculado, así como la función de los espermatozoides y la fertilidad de campo en especies ganaderas en condiciones tropicales. Por ejemplo, en ganado bovino de carne, considerando que la tasa de parición en los sistemas de producción de carne bovina es del orden del 50%, es necesario el abordaje

de las causas de la subfertilidad empezando por la evaluación de la calidad seminal de los toros reproductores en las fincas.

Según datos del *Proyecto nacional de andrología bovina 2015-2020*, llevado a cabo por la Corporación Ganadera (CORFOGA) y con participación de la Escuela de Agronomía del TEC, del total de animales evaluados en el quinquenio 2015-2020, el 25% ha presentado una condición como no apto o insatisfactorio y de este porcentaje, el 58% se refería a problemas de baja a mala calidad seminal. Además, del total de animales no aptos por presentar problemas de calidad seminal, el 69% se refería a oligozoospermia (poca cantidad de espermatozoides en el eyaculado) y un 31% se correspondía con casos de azoospermia (ausencia de espermatozoides en una muestra de semen). El porcentaje de animales con casos de infertilidad o subfertilidad masculina influye en el porcentaje de parición de los hatos bovinos e implica que la eficiencia reproductiva de un toro al considerar la rentabilidad del sistema productivo podría tener una importancia relativa mayor que la calidad de la canal o la ganancia de peso de la progenie.

El éxito de las técnicas de reproducción asistida en animales depende de una serie de factores, como la capacidad del personal para detectar celos, la destreza durante la

inseminación artificial, así como la calidad del semen. Cuando la calidad del semen es pobre en términos de volumen, número de espermatozoides, movilidad o morfología de los espermatozoides, las tasas de concepción pueden verse afectadas.

En conclusión, la fertilidad del macho bovino ha sido evaluada tradicionalmente por medio de los análisis seminales y los resultados de estos análisis son herramientas valiosas en el momento de determinar el valor reproductivo del animal. No obstante, las nuevas tecnologías en análisis espermático permiten junto con los análisis andrológicos tradicionales, ampliar la información reproductiva del individuo y así predecir su fertilidad. ■

*Anthony Valverde tiene un Ph.D. en Reproducción Animal en el área de Andrología. Es profesor asociado e investigador en Biología de la Reproducción Animal, de la Escuela de Agronomía del TEC en el Campus Tecnológico de San Carlos.