



Minitüb

EXAMEN MORFOLÓGICO DEL ESPERMATOZOIDE DEL VERRACO

Minitüb

Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG
Hauptstrasse 41
84184 Tiefenbach - Germany



Our knowledge - Your success

Phone: +49 (0) 8709 9229 0
Fax: +49 (0) 8709 9229 39
E-Mail: minitube@minitube.de
Internet: www.minitube.de

Examen morfológico del espermatozoide del verraco

Introducción

En los últimos años se han logrado avances notables en el conocimiento de los mecanismos de la reproducción, así como en los métodos de investigación y diagnóstico de los trastornos de la fertilidad. A pesar de esto, el análisis del semen sigue siendo un examen imprescindible en el estudio de los sementales utilizados en reproducción animal. Muchos son los factores de origen genético y/o ambiental, que afectan, directa o indirectamente, sobre la fertilidad del verraco.

El espermatozoide del verraco

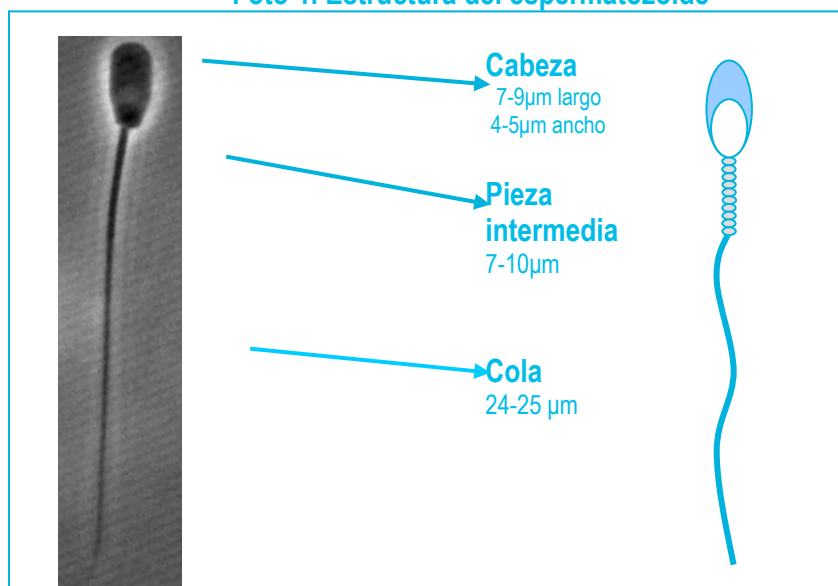
La formación del espermatozoide acontece en el testículo. La estructura tubular de los testículos alberga varias generaciones de células germinales. Dichas células sufren una serie de divisiones que finalmente dan lugar a la formación del espermatozoide. En el verraco, este evento tiene una duración de aproximadamente 34 días, a los que hay que sumar otros 10 días en los que termina su maduración en el epidídimo. Un verraco adulto produce aproximadamente 20 billones de espermatozoides al día.

En el eyaculado de verraco: el 80-90% de los espermatozoides son maduros, el 1-15% son espermatozoides inmaduros y entre el 1-5% espermatozoides anormales.

El espermatozoide maduro mide aproximadamente 45 μm de longitud y presenta tres partes, bien definidas (**foto 1**):

1. **CABEZA.** Tiene forma oval y aplanada. Contiene el **núcleo** con la mitad de los cromosomas del futuro embrión. Entre el núcleo y la membrana del espermatozoide se encuentra el **acrosoma**, que tiene forma de saco fino y que contiene las enzimas necesarias para la **fertilización** del **ovocito**
2. **PIEZA INTERMEDIA.** Localizada debajo de la cabeza espermática, formada por las mitocondrias que se encargan de proporcionar la energía al espermatozoide. Es la conexión entre la cabeza y la cola.
3. **COLA.** Permite que el espermatozoide se mueva, es muy importante para que pueda llegar al ovocito y penetrarlo

Foto 1. Estructura del espermatozoide



Cuando aparecen anomalías en la estructura de la célula espermática, ésta no es viable. Si el porcentaje de anomalías es elevado, el verraco será infértil o estéril.

Durante la producción diaria de dosis seminales, se desechan aquellos eyaculados con un porcentaje de formas anormales $\geq 25\%$. En la gestión de los centros de inseminación modernos, un punto clave es la identificación del origen del problema, ya que no hay que olvidar que la causa puede ser el verraco o errores durante el proceso de manipulación del eyaculado.

Principales morfoanomalías del espermatozoide

Las anomalías más frecuentes en la célula espermática del verraco se clasifican en (tablas 1 y 2):

1. Anomalías de la cabeza (foto 2). Las diferentes formas anormales de cabeza (macro y micro cabezas) se originan a nivel testicular y en muchos casos estos espermatozoides se mueven pero no llegan a fertilizar al ovocito; estas células son difíciles de identificar durante el análisis de motilidad. Las cabezas sueltas aparecen a nivel del epidídimo y se deben a que la estructura de la pieza intermedia se vuelve más frágil y por un efecto mecánico se rompe. El acrosoma (foto 3) es una parte esencial del espermatozoide ya que contiene las enzimas necesarias para la fertilización del ovocito.
2. Anomalías de la cola (foto 4). Ocasionan alteraciones del movimiento celular. Estos espermatozoides no son fértiles.
3. Gotas citoplasmáticas (foto 5). Pueden ser proximales o distales y son indicadores del grado de madurez del espermatozoide. La gota es el resto de la membrana que acompaña a la célula durante su formación en el testículo. A medida que la célula va madurando la membrana se desplaza desde la cabeza a la cola. De esta forma las gotas proximales indican formas más inmaduras que las gotas distales.

Un porcentaje elevado de morfoanomalías, junto con la presencia de contaminación, favorece la aglutinación espermática (foto 7).



Foto 2. Cabeza suelta



Foto 3. Acrosoma dañado

Cola en látigo

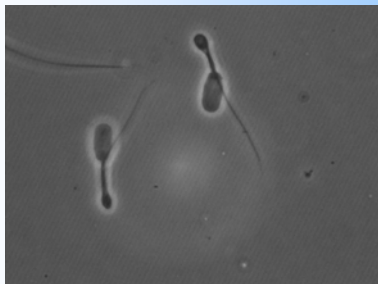


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Foto 4. Cola en látigo

Gota citoplasmática proximal



Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Foto 5. Gota proximal

Gota citoplasmática distal

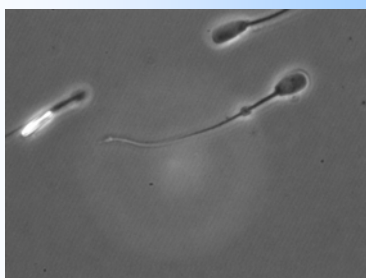


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Foto 6. Gota distal

Contaminación y Aglutinación

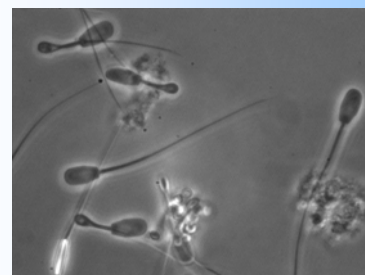


Foto Sperm Vision, contraste de fases x100

Foto 7. Aglutinación y contaminación

Tabla 1. Tipo, origen y niveles máximos de morfoanomalías en semen de verraco destinado a producción de dosis seminales

| Tipo de morfoanomalía | | Origen | % máximos en semen |
|--|---------------------------------------|--|--------------------|
| Cabeza | Suelta | <ul style="list-style-type: none"> – Problemas a nivel del epidídimo que hacen más frágil la estructura de la pieza intermedia y pérdida de la cola – Causas mecánicas – Genético – Fotoperiodo | ≤20% |
| | Acrosoma dañado | <ul style="list-style-type: none"> – Cambios bruscos de temperatura – Contaminación bacteriana – Manipulación errónea del semen – Genético | |
| Cola | Doblada Látigo Ovillo | <ul style="list-style-type: none"> – Cambios bruscos de temperatura – Contaminación bacteriana – Aparecen durante el tránsito en el epidídimo – Manipulación errónea del semen | ≤10% |
| | Otras (doble, edematosa, en escalera) | <ul style="list-style-type: none"> – Genético | |
| Gotas citoplasmáticas | Proximales Distales | <ul style="list-style-type: none"> – Sobrecarga sexual – Fotoperiodo – Falta de madurez de los espermatozoides – Temperatura ambiental elevada – Enfermedades infecciosas (PRRS, pseudorabia...) – Vacunaciones o tratamientos | ≤20% |
| | | | |
| Total de formas anormales en eyaculados destinados a la IA | | | ≤20% |

Tabla 2. Valores de referencia para verracos jóvenes (hasta 12 meses)

| Parámetro | < 9 meses | > 9 meses |
|-------------------------------|-----------|-----------|
| Formas anormales totales | ≤30% | ≤25% |
| Cabeza (incluyendo acrosomas) | ≤25% | ≤20% |
| Gotas citoplasmáticas | ≤25% | ≤20% |
| Colas | ≤15% | ≤10% |
| Otras | ≤5% | ≤1% |

¿Cómo se producen las morfoanomalías?

Algunas anomalías se originan a nivel testicular durante el proceso de formación del espermatozoide (espermatogénesis) e incluso durante su paso por el epidídimo. Otras aparecen durante o después de la eyaculación, y son debidas a errores durante el manejo del semen en el proceso de producción de dosis o durante su conservación. Por último existe el componente genético como causa de aparición de formas anormales en el eyaculado.

En cada una de estas fases participan diversos factores que pueden dar lugar a la aparición de morfoanomalías. Por ejemplo, procesos infecciosos que cursan con fiebre pueden influir negativamente en la espermatogénesis. Alteraciones del pH, choques térmicos y cambios de

presión osmótica durante la dilución y procesado del semen puede de igual forma producir alteraciones a nivel espermático.

Cualquier tipo de estrés puede afectar a la calidad seminal hasta 2-6 semanas después de que el verraco sea expuesto a situaciones adversas.

¿Cuándo y cómo se analiza la morfología espermática?

La identificación de las anomalías a nivel espermático es especialmente importante desde el punto de vista económico y genético; la aparición persistente de anomalías específicas, principalmente de cabeza, pueden tener un origen genético y por lo tanto hereditarias.

Como método de control y seguimiento de los verracos, el examen morfológico completo (incluyendo acrosomía), se debe realizar al menos 2 veces al mes, haciendo un conteo de mínimo 100 células.

La morfología espermática se puede valorar utilizando técnicas de tinción o fijación (frotis húmedos). La morfología de cabeza, gotas y cola se puede valorar fácilmente con un objetivo de 20x, 40x o 100x, en la cámara de Burkner, al mismo tiempo que se realiza el conteo de los espermatozoides. De esta forma se puede calcular el porcentaje de formas anormales, y realizar el cálculo de concentración "útil" por dosis. Para valorar la integridad de los acrosomas es necesario utilizar soluciones para tinción o fijación y visualización con microscopio de contraste de fases y mínimo 100x.

Tinciones

1. Tinción de Farelly (Ref. No. 15405/0026). Para morfología general y acrosomía.

- Tinción de las distintas partes de la célula espermática, el acrosoma, la región ecuatorial, la pieza central y la cola en diferentes colores, lo que facilita la identificación clara de células normales y anormales
- Método de tinción
 1. Preparar una extensión de semen en un porta objetos (éste debe estar completamente limpio y libre de restos de grasa). Es importante que la muestra sea muy fina. En el caso de que el semen esté muy concentrado se puede diluir la muestra con una solución de NaCl (0.9%) o Citrato Sódico (3%) antes de hacer la extensión. El plasma seminal puede interferir con las soluciones de tinción, especialmente en el caso del semen de verraco. Dejar secarse al aire, pero nunca se debe dejar secar por mucho tiempo.
 2. Sumergir la extensión en la solución A (solución fijadora) durante 10 segundos
 3. Sumergir en la solución B (solución de coloración 1) durante 20 segundos
 4. Lavar con agua del grifo 5-6 veces; eliminar el exceso de agua con papel absorbente
 5. Sumergir en la solución C (solución de coloración 2) durante 5 segundos
 6. Lavar con agua del grifo 5-6 veces
 7. Dejar secar la muestra durante 12 horas en posición vertical
 8. Examinar la muestra en contraste de fases con aceite de inmersión. Valorar 100 células:
 - Primero se identifican células normales y anormales
 - Posteriormente y dependiendo de la malformación, las células anormales se dividen en los diferentes grupos.

2. Spermac (Ref. No. 15405/0000). Específica para valoración del estado del acrosoma.

- Diseñada para la valoración del acrosoma. Los acrosomas se tiñen de verde, la zona ecuatorial de verde claro y el resto de la cabeza espermática de rojo. Pieza intermedia y cola se tiñen de verde
- Método de tinción
 1. Prepara una extensión de semen en un porta objetos (éste debe estar completamente limpio y libre de restos de grasa). Es importante que la muestra sea muy fina. Se recomienda hacer una dilución 1:1 con Citrato Sódico (3%) antes de hacer la extensión. El plasma seminal puede interferir con las soluciones de tinción, especialmente en el caso del semen de verraco. Dejar secarse al aire, pero nunca se debe dejar secar por mucho tiempo.
 2. Sumergir la extensión en la solución fijadora durante mínimo 5 minutos. También es posible dejar los frotis en el fijador hasta el día siguiente. Después de la fijación, los frotis pueden ser secados y guardados, enviados a otra parte o teñidos inmediatamente.
 3. Lavar sumergiendo cuidadosamente 5 a 6 veces en agua de la llave y a continuación retocar con papel filtro.
 4. Sumergir 1 a 2 minutos en la solución colorante A. Lavar a continuación como arriba.
 5. Sumergir 1 minuto en la solución colorante B. Lavar a continuación como arriba.
 6. Sumergir 1 minuto en la solución colorante C. Lavar a continuación como arriba.
 7. Dejar secar el frotis.
 8. Examinar la muestra en contraste de fases con aceite de inmersión. Valorar 100 células:
 - Acrosomas en verde
 - Zona ecuatorial verde claro
 - Resto de cabeza en rojo
 - Pieza intermedia y cola en verde

Fijación (Frotis húmedos fijados con solución de formaldehído)

- La técnica es muy rápida de preparar, pero es necesario hacer un entrenamiento para aprender a identificar los distintos estadios del acrosoma:
 - Normal
 - Dañado
 - Perdiendo
 - Perdido
- Método
 1. En un tubo de ensayo poner 2 ml de la solución de formaldehído (citrato sódico 3 gr + folmaldehído (40% de pureza) 4ml + hasta 100 ml de agua bidestilada pura).
 2. Añadir 2 gotas de semen
 3. En un porta objetos limpio y libre de restos de grasa colocar una gota de la preparación y cubrir con un cubreobjetos
 4. Examinar la muestra en contraste de fases con aceite de inmersión.
 5. Analizar diferentes campos hasta realizar un conteo de mínimo 100 células.

¿Cómo y en que grado pueden afectar las morfoanomalías a los resultados productivos?

La relación de la morfología espermática con la fertilización es de difícil interpretación pues en un mismo eyaculado se presentan varias anomalías e incluso en muchos espermatozoides anormales se observan varios defectos. Es por ello que, en la literatura no hay un acuerdo sobre si el resultado de la morfología debe expresarse en forma global (total de espermatozoides normales y anormales) o si es más conveniente especificar el porcentaje de ellos con anomalías de la cabeza, pieza intermedia y cola.

En cuanto a la repercusión de las morfoanomalías en los resultados reproductivos, es muy variable y distinta, pudiendo afectar a la cantidad y la calidad de las dosis seminales. En algunos casos el semen puede ser apto para la inseminación, y en otros casos el espermatozoide sufre alteraciones que afectan a la capacidad fecundante, lo que se traduce en fallos de la gestación con aparición de repeticiones del celo a los 21-22 días.

Una parte esencial del espermatozoide es el acrosoma, pues contiene enzimas imprescindibles para la penetración en el ovocito; de modo que los acrosomas dañados, aunque sí presentan movimiento, no son fértiles. Hay estudios que demuestran que eyaculados con más del 30-40% de los acrosomas dañados reducen los resultados de fertilidad.

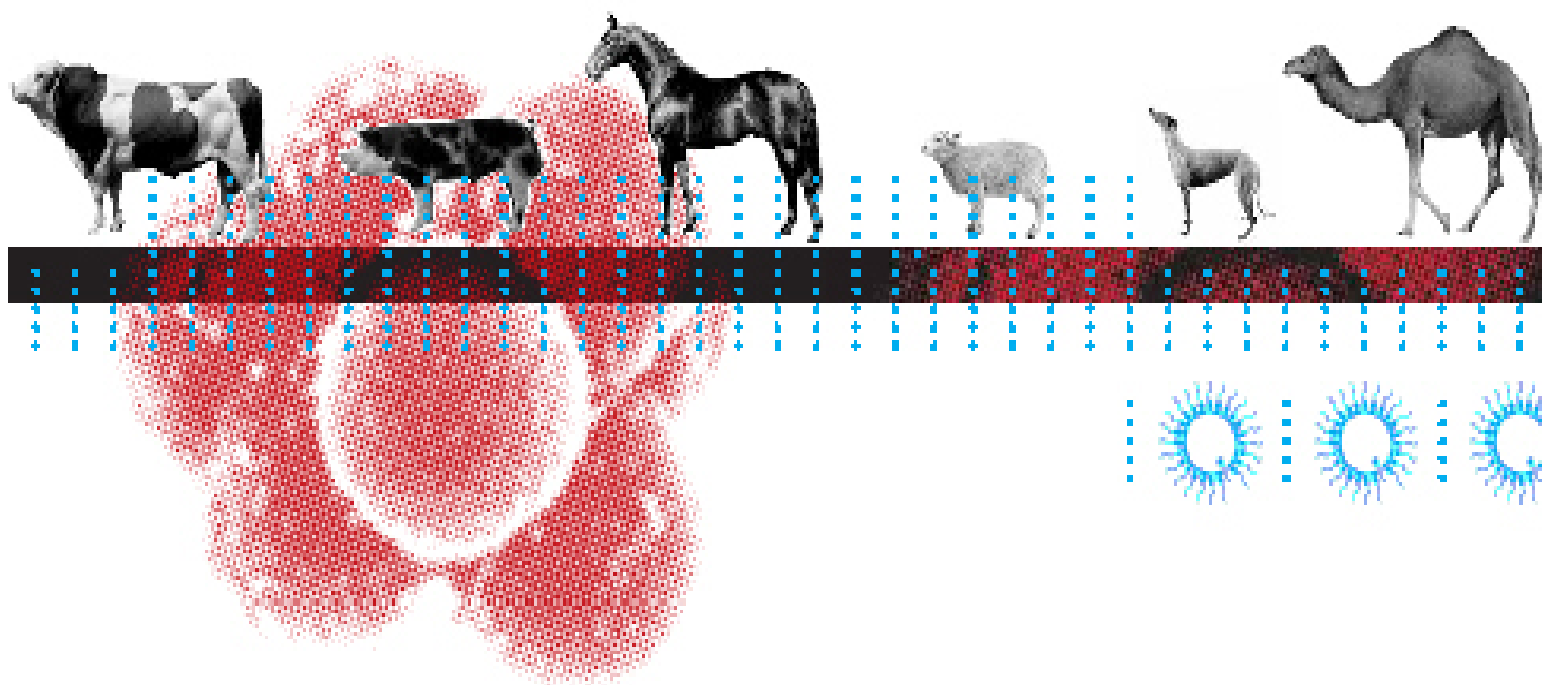
Los espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales no son fértiles, mientras que aquellos que presentan las gotas distales se consideran fértiles. Sin embargo, hay trabajos donde se demuestra que la gota citoplasmática no se pierde del todo y que la fertilidad es aparentemente normal.

¿Qué medidas debemos tomar cuando aparecen malformaciones en los eyaculados?

1. Sacar temporalmente al verraco o verracos afectados del programa de producción seminal hasta que la producción de eyaculados vuelva a ser normal o las pruebas del semen demuestren que la fertilidad es buena.
2. Colecta de semen en los verracos afectados 1 vez por semana durante 3 meses. Si en ese periodo de tiempo no hay una evolución positiva se recomienda el sacrificio de los animales.
3. Si el problema está relacionado con la manipulación del semen, revisar el protocolo de producción de dosis seminales.

Conclusiones

1. Es imprescindible establecer los límites de tolerancia para las distintas anomalías, con el objetivo fundamental de que no se afecte la calidad de las dosis seminales y por lo tanto la productividad en las explotaciones.
2. Mensualmente se debe realizar un análisis seminal completo al 20% de los reproductores, con el objetivo de optimizar el potencial de los sementales, identificar aquellos verracos subfértiles y prevenir posibles problemas de fertilidad.
3. Es recomendable que al menos 2-3 veces al año la analítica seminal la realice un laboratorio independiente.



Minitüb

Abfüll- und Labortechnik GmbH & Co. KG
Hauptstrasse 41
84184 Tiefenbach - Germany



Our knowledge - Your success

Phone: +49 (0) 8709 9229 0
Fax: +49 (0) 8709 9229 39
E-Mail: minitube@minitube.de
Internet: www.minitube.de