

Capítulo LVIII

Evaluación de la calidad espermática en toro mediante tecnología informática

Armando Quintero-Moreno, DMV
Jorge Rubio Guillén, MSc

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha demostrado que las características anormales de los espermatozoides humanos inciden sobre la tasa de fecundación (Kruger, 1988), sin embargo, la mayoría de los investigadores coincidimos en que el estudio de la movilidad y de la morfología espermática, así como sus efectos sobre la fertilidad es un proceso que genera hallazgos que en algunos casos contrastan entre sí. En el campo de la Espermología, los avances científicos se han producido lentamente debido a que la evaluación de la morfología y en especial de la motilidad se realiza de manera visual mediante un operador entrenado. Todo esto conlleva a la obtención de valores susceptibles a un alto grado de imprecisión por las condiciones subjetivas del sistema de medida; por lo tanto, no es de sorprender que los resultados que aporta un espermiograma hecho de esta manera sea hasta el momento un predictor ineficiente de la fertilidad.

La comunidad científica internacional opina que a pesar de estas imprecisiones, la valoración visual ofrece una descripción oportuna de la motilidad y morfología espermática, aunque dicha exactitud y precisión están limitadas por las condiciones del sistema de medida y por la destreza del observador. Sin embargo, a pesar de ello, la apreciación efectuada por personas experimentadas es de gran valor, debido a que la información se obtiene de forma inmediata, es económica y de fácil ejecución. En todo caso, esta valoración visual de una muestra de semen es todavía utilizada por la mayoría de los laboratorios y/o centros de inseminación artificial; no obstante, debemos ser conscientes que la subjetividad aparente de la valoración visual puede derivar en resultados contrastantes para una misma muestra entre diferentes laboratorios e incluso entre los distintos observadores de un mismo laboratorio.

De lo antes expuesto, se deriva la necesidad de implementar una nueva metodología, más objetiva y que sea capaz de realizar la valoración de la motilidad y morfolo-

gía espermática de una manera más efectiva. La aplicación de los conocimientos de la biología espermática al campo de la informática originó una serie de programas computarizados o “software” que describen la cinética espermática, además de medir y precisar la forma del espermatozoide vivo, muerto o con anormalidad morfológica. De allí partió la necesidad de formular un análisis de la calidad espermática más objetivo, que derivó en la creación del Análisis Computarizado de la Motilidad y Morfología espermática, denominado genéricamente “CASA” (*Computer-Assisted Sperm Analysis*).

SISTEMA DE MEDICIÓN COMPUTARIZADA DE LA MOTILIDAD ESPERMÁTICA

Los primeros intentos de identificar objetivamente el movimiento espermático individualizado se basó en exposiciones fotográficas múltiples o en video-micrográficas. Estos métodos son tediosos, largos y costosos, por lo que hoy en día no son de elección (Boyers *et al.*, 1989). Sin embargo, la aparición de los sistemas computarizados de digitalización de imágenes abrió un nuevo campo en el estudio de la motilidad espermática, automatizando y simplificando el proceso. El análisis computarizado de la motilidad fue propuesto por primera vez hace 28 años (Dott y Foster, 1979) y es usado actualmente en clínicas especializadas, centros de reproducción asistida, laboratorios y centros de investigación.

Las imágenes obtenidas permiten evaluar varios parámetros que describen el movimiento espermático, estableciendo de una manera efectiva medidas cuantitativas del movimiento individual de los espermatozoides (Mortimer, 2000). Con este tipo de análisis se espera obtener medidas correctas de la motilidad espermática que proporcionen información precisa acerca del estado funcional del axonema y de las membranas espermáticas. Cuando el análisis se hace en condiciones óptimas, las medidas detalladas de la motilidad proporcionan una información predictiva sobre la función espermática (Davis y Siemers, 1995). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la exactitud de los valores obtenidos por técnicas cinemáticas está limitada por factores técnicos y biológicos. De este modo, la interpretación de los datos cinéticos es dependiente del conocimiento que tengamos de las condiciones del análisis (Mortimer, 2000, 2002).

Los sistemas automáticos de medición de imágenes se basan en la captura sucesiva de espermatozoides en movimiento provenientes de una muestra seminal ($5 \mu\text{L}$) colocadas en un microscopio y visualizadas en una pantalla de un computador; luego se digitalizan estableciendo trayectorias definitivas que proporcionan una información detallada, precisa y significativa del movimiento individual de cada espermatozoide (Amann y Katz, 2004). El sistema consta de un microscopio con contraste de fases conectado a una platina temperada que permite mantener las muestras a 37°C , una cámara de vídeo de alta resolución conectada a una pantalla de televisión y un software de análisis de imágenes por computador. Los parámetros determinados para cada espermatozoide son la velocidad del movimiento en base a varios descriptores, la trayectoria que realiza la cabeza del espermatozoide y la frecuencia de los cambios de dirección que esta realiza.

El análisis de la motilidad mediante CASA se hace al capturar las imágenes de espermatozoides en movimiento de muestras seminales previamente diluidas en un medio adecuado y utilizando un microscopio con lente 100 ó 200X. Tras la captura, la información es guardada hasta su análisis. Una vez realizado el análisis, la información obtenida es transferida a un procesador matemático que fragmenta la motilidad espermática en diversos descriptores de la motilidad individual que caracterizan la linealidad, la angularidad del movimiento espermático y el desplazamiento de la cabeza del espermatozoide. Por dar un ejemplo, el sistema CASA diseñado por Microptic (Barcelona; España) describe varios parámetros de motilidad (Tabla 1) y la captura de las imágenes se basa en el análisis de hasta 100 imágenes fotografiadas de alta resolución (768 x 576), digitalizadas y tomadas en un tiempo de procesamiento de pocos segundos por muestra. Se han comparado datos utilizando distintos sistemas disponibles en el mercado y se ha demostrado que no hay muchas diferencias en los resulta-

Tabla 1
Parámetros de motilidad que se evalúan mediante CASA

Parámetro	Unidad	Definición
Velocidad curvilínea (VCL)	$\mu\text{m}/\text{sg}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria real en función del tiempo.
Velocidad rectilínea (VSL)	$\mu\text{m}/\text{sg}$	Distancia recorrida por el espermatozoide en el primer punto y el último de su trayectoria.
Velocidad media (VAP)	$\mu\text{m}/\text{sg}$	Distancia recorrida por el espermatozoide a lo largo de su trayectoria media.
Índice de linealidad (LIN)	%	Relación porcentual entre la VSL y VCL.
Índice de rectitud (STR)	%	Relación porcentual entre la VSL y VAP.
Índice de oscilación (WOB)	%	Relación porcentual entre la VAP y VCL.
Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHmed)	μm	Desplazamiento medio efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Amplitud máxima del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALHmax)	μm	Máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado a otro de la trayectoria media o lineal.
Desplazamiento angular medio algebraico (MADAlg)	Grados angulares	Ángulo que toma la dirección de un segmento de la trayectoria y el siguiente, teniendo en cuenta su signo, siendo positivo al sentido contrario de las agujas del reloj.
Frecuencia de batida del espermatozoide (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la lineal en función del tiempo.
Menor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HLO)	μm	Menor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media.
Mayor oscilación armónica de la cabeza del espermatozoide (HHI)	μm	Mayor valor de la amplitud de la trayectoria curvilínea respecto a la trayectoria lineal o media.

dos (Verstegen *et al.*, 2002). En cambio, se han encontrado grandes diferencias entre los operadores y en la metodología de preparación de la muestra a analizar (Verstegen *et al.*, 2002).

Los tres parámetros de velocidad (VCL, VAP y VSL) son comúnmente utilizados para la descripción general del movimiento del espermatozoide (Figura 1); sin embargo, para una evaluación adicional se establecieron los parámetros STR, LIN y WOB que tratan de las relaciones entre estas velocidades (Motimer, 1997). El LIN provee una indicación de la relación entre la trayectoria recta recorrida y la trayectoria promedio del espermatozoide, de modo que en situaciones en que la trayectoria promedio se aproxima de la trayectoria en línea recta se presenta una elevada STR, con bajo ALHmed. Al contrario, trayectorias circulares poseen baja STR, pues la trayectoria promedio presenta valores superiores al compararlo con el trayecto rectilíneo, de modo que una trayectoria circular presenta baja linealidad, una vez que la trayectoria real del espermatozoide es mayor que su desplazamiento efectivo. El índice de oscilación (WOB) es bajo en casos de trayectorias en las que los espermatozoides recorren una vasta área en su desplazamiento (elevado ALHmed) y es más alto en caso de trayectorias circulares o rectilíneas una vez que la VAP y la VCL se asemejan (Motimer, 1997).

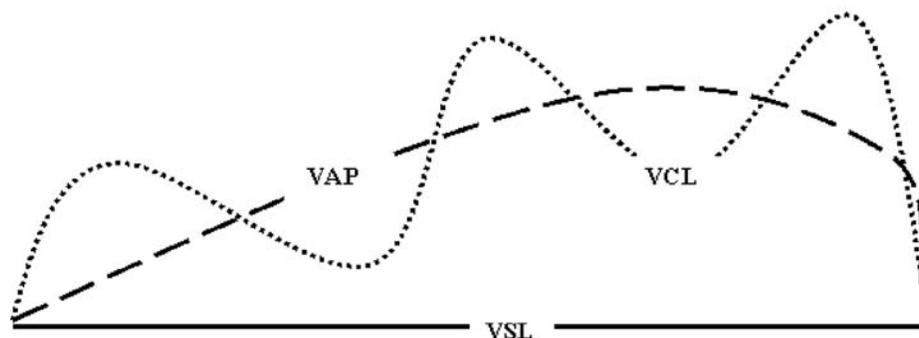


Figura 1. Terminología estándar de algunos parámetros de motilidad (Tabla 1) obtenidos por el sistema CASA.

Algunos centros de inseminación artificial han adoptado el CASA en su rutina de evaluación de semen, pero en general como un método estandarizado de cálculo de la motilidad progresiva y total. Los parámetros de motilidad que son los más correlacionados con la fertilidad no son comúnmente usados y la evaluación de subpoblaciones espermáticas no ha sido aplicada en forma habitual (Anel *et al.*, 2006), a pesar que existen hallazgos que lo sugieren (Quintero-Moreno *et al.*, 2003, 2004, 2007).

Debe ser resaltada la posibilidad de obtener errores potenciales durante las mediciones realizadas por el CASA. Una de ellas es la dificultad en distinguir entre espermatozoides y algunas partículas o células no-espermáticas presentes en el eyaculado, lo cual ha llevado a una sobrestimación de la concentración espermática y en la subestimación en la proporción de espermatozoides móviles. La presencia de espermatozoides aglutinados también afecta la correcta evaluación de la concentración espermática y del porcentaje de espermatozoides móviles. Una concentración elevada de

espermatozoides en la muestra analizada interfiere en la reconstrucción de la trayectoria de los espermatozoides analizados, pudiendo haber cierta sobreposición de trayectorias distintas de modo que sean interpretados como una sola. (Motimer, 1997). Sin embargo, este error, debido a esto se corrige usando un diluyente idóneo.

Entre los principales factores de los que depende el resultado final de la prueba se han señalado: temperatura del semen, volumen analizado, tipo de cámara utilizada, tiempo entre la recogida y el análisis, concentración espermática de la muestra, diluyente utilizado, patologías existentes, tipo de objetivo utilizado, iluminación del microscopio, valores del “setup” y el área de las partículas (Verstegen *et al.*, 2002),

SISTEMAS DE MEDICIÓN COMPUTARIZADA DE LA MORFOLOGÍA ESPERMÁTICA

La caracterización de las diferentes formas y dimensiones espermáticas y su relación con la fertilidad son actualmente algunos de los puntos clave en el análisis del semen. En humanos, la morfología espermática es uno de los parámetros que presentan mayor asociación con la tasa de fecundación (Kruger, 1988), sin embargo, el alto grado de subjetividad de la evaluación morfológica tradicional ha mermado su potencial en el pronóstico de la infertilidad (Davis y Gravance, 1994).

Este hecho ha motivado a los investigadores que desarrollaron el sistema CASA a implementar un nuevo sistema de análisis computarizado de la morfología espermática denominado ASMA (Automatic Semen Morphology Analysis) o CASMA (Computer Automatic Semen Morphology Analysis) como una forma para reducir la variabilidad existente en el análisis espermático (Álvarez-Lleó, 2003), a pesar que se ha postulado que la morfología posee un valor más limitado a la hora de determinar la tasa de fecundación (Bartoov *et al.*, 1993). Sin embargo, estas conclusiones varían según la técnica de tinción, protocolos de preparación de las muestras seminales y los sistemas de clasificación morfológica (Menkveld *et al.*, 1990).

La morfología espermática se valora mediante la determinación de las dimensiones de la cabeza y de la pieza intermedia del espermatozoide, además de valorar su forma. Utilizando este módulo, las muestras previamente fijadas y teñidas mediante algunos colorantes de uso comercial (Hemacolor, Diff Quick o Eosina-nigrosinagiensa, etc.) son analizadas mediante un microscopio conectado a una video cámara y a un computador con un software que procesa las imágenes obtenidas, calculando los parámetros métricos de la cabeza espermática, pieza intermedia y acrosoma, permitiendo la clasificación de los espermatozoides según su tamaño y forma (Álvarez-Lleó, 2003).

Los parámetros a cuantificar hacen referencia al tamaño de la cabeza (área, perímetro, longitud y anchura) y a la forma de la cabeza, además de obtener la proporción de acrosoma que incluye la cabeza del espermatozoide; incluso, el sistema de análisis ofrece información inherente a la inserción de la pieza intermedia en el núcleo, midiendo la distancia y el ángulo de la inserción (Soler, 2000). Estos sistemas también permiten clasificar los espermatozoides en categorías morfológicas (normales/anormales) y proporcionar información sobre defectos de la cabeza, acrosoma y pieza intermedia.

Mediante este sistema se han localizado sutiles diferencias entre muestras, tanto en la especie humana como en el bovino (Rubio *et al.*, 2007), lo cual demuestra que dentro de una población de espermatozoides normales provenientes de semen fresco y descongelado existen distintas subpoblaciones que sugieren diferencias en cuanto a su capacidad fecundante (Tabla 2); sin embargo, esta última hipótesis necesita ser probada. La utilización de los sistemas de evaluación por computador nos permite identificar y separar estas subpoblaciones debido a que el análisis seminal posee gran precisión y objetividad.

Tabla 2
Representación porcentual de las subpoblaciones espermáticas en función de la morfología

Especie	Condición del semen	Subpoblaciones espermáticas según su dimensión (%)		
		1	2	3
		Mayores	Medias	Menores
Toro	Fresco/diluido/	52,16	39,24	8,70
	Descongelado	15,51	50,45	34,04

Fuente: Rubio *et al.*, 2007.

LA PRUEBA DE MEDICIÓN DEL ESTADO DE CONDENSACIÓN Y DISPERSIÓN DE LA CROMATINA

La determinación del estado de condensación de la cromatina es un parámetro importante para la valoración de la calidad seminal en semen conservado, ya que las lesiones a nivel de la cromatina pueden estar induciendo fallas en la fertilización y un incremento de la mortalidad embrionaria (López-Fernández *et al.*, 2007). De esta manera, esta prueba complementada con la evaluación de la integridad del acrosoma y de la membrana celular en general podría generar una mejor correlación con la capacidad fecundante del eyaculado.

La prueba de Dispersión de Cromatina Espermática (SCD, *Sperm Chromatin Dispersion test*) fue desarrollada por Fernández *et al.* (2003) como una nueva herramienta para el análisis de la fragmentación de la cromatina espermática en humanos y en otras especies, que incluye al toro. Se basa en la capacidad de la célula espermática de desplegar su cromatina luego de un tratamiento desnaturante y lítico y proyectarla en un halo de dispersión llamado nucleoide, que se forma alrededor del núcleo, luego de ser desproteínizado. Posteriormente, tras la tinción de la muestra mediante la solución de Wright y análisis por microscopía de fluorescencia o de campo claro, las células son clasificadas de manera visual o mediante un programa computarizado según su patrón de dispersión, lo que viene dado según el tamaño del halo (Figura 2).

El estado de la cromatina en los espermatozoides puede determinarse “*in vitro*” en base a su susceptibilidad a la descondensación. Esta prueba se basa en determinar el porcentaje de espermatozoides que presentan un desarrollo normal (sin halo) debido a que no presentaron la desnaturación del DNA. Es posible que el DNA en espermatozoides con una estructura cromatínica anormal sea susceptible de desnaturarse “*in situ*” (García-Macias *et al.*, 2007). En esta técnica se utilizan materiales y

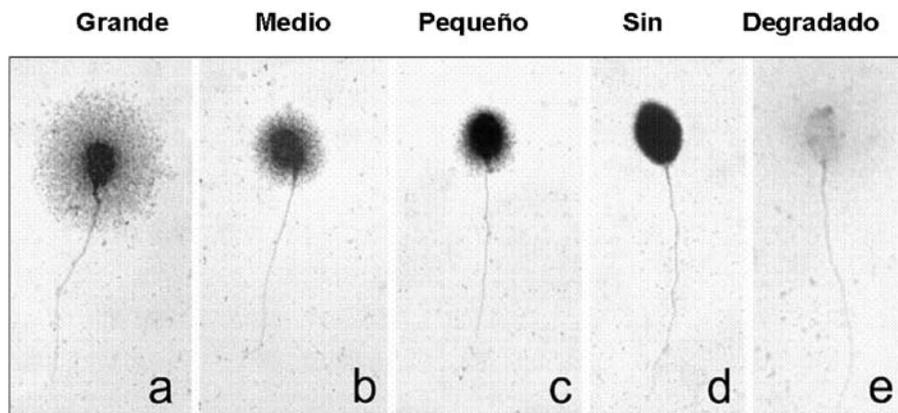


Figura 2. Grados de fragmentación del DNA espermático determinado por la prueba de Dispersión de la Cromatina (SCD) utilizando el kit Halomax®.

equipos sencillos disponibles en laboratorios de Andrología, siendo una prueba simple; sin embargo, hasta la actualidad no se ha podido demostrar su precisión, debido al hecho que no ha demostrado ser reproducible para el análisis de fragmentación de DNA espermático (Evenson *et al.*, 2006).

LITERATURA CITADA

- Álvarez-Lleó C. 2003. Análisis integrado de morfología y movilidad espermática humana con el uso del Sperm Class Analyzer. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia. Tesis Doctoral. 174 pp. www.tdx.cesca.es/TDX-0105104-125945.
- Amann RP, Katz DF. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl.* 25 (3): 317-325.
- Anel L, Álvarez M, Martínez-Pastor F, García-Macias V, Anel E, de Paz P. 2006. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod Dom Anim* 41 (2): 30-42.
- Bartoov P, Eltes F, Pansky M, Lederman H, Caspi E, Soffer Y. 1993. Estimating fertility potential via semen analyses data. *Hum Reprod* 8: 65-70.
- Boyers SP, Davis R, Katz DF. 1989. Automated Semen Analysis. *Curr Probl Obstet Gynecol Fertil* 12:172-200.
- Davis RO, Gravance CG. 1994. Consistency of sperm morphology classification methods. *J. Androl* 15: 83-91.
- Davis RO, Siemers RJ. 1995. Derivation and reliability of kinematics measures of sperm motion. *Reprod Fertil Dev* 7: 857-869.
- Dott HM, Foster GC. 1979. The estimation of sperm motility in semen, on a membrane slide, by measuring the area change frequency with an image analyzing computer. *J Reprod Fertil* 55: 161-166.
- Evenson DP, Kaspersen K, Wixon RL. 2006. Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. 10th International Symposium on Spermatology 17-22 Septiembre/Madrid, España. S2-3: 24.

- Fernández JL, Muriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vazquez R, Álvarez JG. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Andrology*. 24: 59-66.
- García-Macías V, de Paz P, Martínez-Pastor F, Álvarez M, Gómez-Alves S, Bernardo J. 2007. DNA fragmentation assesment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescente microscopy) in bull sperm. *Int J Androl* 30: 88-98.
- Kruger TF, Haque D, Acosta AA. 1988. Correlation between sperm morphology, acrosin and fertilization in an IVF program. *Arch Androl* 20: 237-241.
- López-Fernández C, Crespo F, Arroyo F, Fernández JL, Arana P, Johnson SD, Gonçalves J. 2007. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68: 1240-1250.
- Menkveld R, Stander, FSH, Katze TJW, Kruger TF, Van Zyl JA. 1990. The evaluation of morphological characterization of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod* 5: 586-592.
- Mortimer St. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum Reprod Update* 3 (5): 403-439.
- Mortimer ST, Maxwell WM. 1999. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reprod Fert Dev* 11: 25-30.
- Mortimer S. 2000. CASA - Practical Aspects. *J Androl* 21: 515-524.
- Mortimer ST. 2002. Practical application of computer-aided sperm analysis (CASA). In: 9th International Symposium on Spermatology. October 6-11, Cape Town/South Africa, p.79.
- Quintero-Moreno A, Miró-Roig J, Rigau i Mas T, Rodríguez-Gil JE. 2003. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. *Theriogenology* 59: 1973-1990.
- Quintero-Moreno A, Rigau i Mas T, Rodríguez-Gil J.E. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analyses. *Theriogenology* 61: 673-690.
- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2007. Multivariate cluster analysis regression procedures as tools to identify motile sperm subpopulations in rabbit semen and to predict semen fertility and litter size. *Reprod Dom An*. 42: 312-319.
- Rubio-Guillén J, González D, Garde JJ, Esteso MC, Fernández-Santos MR, Rodríguez-Gil JE, Madrid-Bury N, Quintero-Moreno A. 2007. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod Dom Ani* 42: 354-357.
- Soler C, Pérez-Sánchez F, Schulze H, Bergmann M, Oberpenning F, Yeung C, Cooper TG. 2000. Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm head. *Int J Androl* 23: 77-84.
- Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.