

Los sistemas CASA como solución en los centros de producción de dosis seminales porcinas



Anthony Valverde, M.Sc.

Escuela de Agronomía
 Instituto Tecnológico de Costa Rica
anvalverde@itcr.ac.cr



Carles Soler, Ph.D.

Departamento de Biología Funcional y
 Antropología Física
 Universitat de València, Burjassot, Spain
csoler@uv.es



Mónica Madrigal, Lic.

Sector de Estudos em Reprodução Animal
 Universidade Federal da Bahia, Brasil
madrigalvalverdem@gmail.com

1. Introducción

El objetivo de la realización de un análisis espermático en cerdos, consiste en tratar de estimar el nivel de fertilidad de la muestra analizada. Históricamente, se han tratado de definir criterios de corte para determinar qué semen podía ser considerado fértil y cuál no. Y no solo eso, sino que se pretende hacer un cálculo de cuántas dosis de inseminación se pueden realizar a partir de dicha muestra. Sin embargo, la realidad no es tan simple y se ha puesto de manifiesto la necesidad

de considerar varios parámetros de la forma más interrelacionada posible, siendo la concentración, la movilidad y la morfología los más comúnmente aceptados.

Cuando se realiza un análisis seminal de forma subjetiva es muy difícil conseguir un mínimo de fiabilidad y repetitividad en las valoraciones realizadas. De hecho, en los análisis de semen humano, en los que más se ha trabajado la evaluación de dichos análisis, se ha observado que el coeficiente de variación asociado a diferentes medidas, hechas por un mismo

especialista, es del orden del 20%. La forma tradicional de superar este factor ha sido incrementar el número de espermatozoides por dosis, como un “factor de seguridad”. Sin embargo, esa práctica se puede calificar como de poco profesional y la repercusión directa que tiene es la baja productividad por reproductor.

La alternativa de que se dispone es el análisis computacional de semen, usando los sistemas de Análisis de Semen Asistido por Computadora (CASA, por sus siglas en inglés de “Computer-Assisted Semen Analysis”). Debido a que estos sistemas han tenido un precio relativamente alto y que no han sido diseñados para el análisis de rutina o de la producción. Su uso se ha limitado a centros de investigación o clínicas de reproducción asistida, para los cuales la batería de información que estos sistemas aportan resulta de mayor interés.

El presente artículo pretende aportar información sobre el desarrollo de una nueva generación de sistemas diseñados, especialmente, en el contexto del cálculo automático de dosis de inseminación. Sin embargo, es necesario hacer un repaso de las características genéricas que definen a los sistemas CASA para comprender mejor lo que ha supuesto el desarrollo de un sistema de análisis seminal.

2. Historia de los sistemas CASA

Los sistemas CASA aparecieron en el ámbito del desarrollo de las técnicas de análisis de imagen asistida por computadora, en la década de los años 70. Las primeras aproximaciones al estudio cinético de los espermatozoides, se basaron en técnicas estroboscópicas de iluminación, que dejaban un rastro del movimiento celular en una película fotográfica. Pese a ser un proceso muy laborioso y prácticamente manual, abrió las puertas conceptuales a los primeros sistemas auténticamente computarizados, que aún fueron semiautomáticos, aparecidos a finales de dicha década. Estos sistemas utilizaban tabletas gráficas, en las que se indicaba la posición de la célula a lo largo de su trayectoria.

En los años 80 comenzó el desarrollo de sistemas completamente automáticos para el análisis cinético. El pionero, al menos en importancia, fue el Hamilton Thorne. A este sistema le siguieron otros y, posteriormente, se generalizó la ampliación del campo de estudio a la morfología espermática, en la década de los 90; no obstante, aún no se ha extendido su uso, por la complejidad del análisis morfométrico.

3. Características genéricas de los sistemas computarizados CASA

Los sistemas automatizados actuales sustituyen el sistema perceptivo y de análisis de un observador por uno electrónico de captura y un programa informático (software) específico para el análisis computacional de la información, por lo que es necesario hacer algunas consideraciones a ambos aspectos, los referentes al equipo (hardware) y a los programas informáticos (software).

La correcta visualización de los espermatozoides de verraco implica el uso de un microscopio y la técnica del contraste de fase negativo, que permiten observar los espermatozoides blancos sobre un fondo oscuro. Con esta técnica, la cabeza de los espermatozoides permanece visible, independientemente de su movimiento, 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 lo que realmente son espermatozoides, diferenciándolos así de las posibles partículas del fondo.

Un elemento ligado al microscopio es el sistema de calefacción del mismo, ya que la movilidad espermática en algunas especies; como por ejemplo porcino; es muy sensible a la temperatura, requiriendo un ambiente a una temperatura entre 37-38°C, para que sus células se mue-

van adecuadamente. Algunas de estas platinas son placas que se superponen a la propia platina del microscopio, lo que provoca una distribución no uniforme de la temperatura, que puede ocasionar gradientes en el movimiento espermático.

El siguiente componente es la cámara y son dos los parámetros básicos a tener en cuenta: la resolución y la frecuencia de captura. Ello hace que no se adapte o funcione a cualquier tipo de cámara y que sea preciso disponer de una que no solo tenga buena resolución, sino que asegure una frecuencia de captura constante y de alta velocidad. En cuanto a la resolución, lo recomendable es que no sea inferior a 768 x 576. Con respecto a la frecuencia de captura, cabe señalar que es un parámetro que va a modificar sensiblemente alguno de los parámetros cinéticos, que se van a calcular para la determinación de la velocidad del movimiento espermático. En particular, uno de dichos parámetros, la VCL (ver más adelante) se incrementa sensiblemente con el aumento de la frecuencia de captura, acercándose cada vez más a su valor real. Por ello, es recomendable no usar frecuencias inferiores a 60 imágenes por segundo, analizando no menos de dos segundos por análisis.

Los últimos componentes del equipo a considerar son la computadora y el programa informático. Las características de la computadora pueden ser: 1GB DDR2/250GB disco duro (hard drive), DVD-RW. Algunos de los equipos disponibles no son capaces de funcionar con los diversos sistemas operativos que han ido apareciendo en el mercado, mientras que otros son más versátiles y pueden operar no solo con los sistemas referentes a Windows®, sino también a Macintosh® o Linux®.

El programa informático se tiene como principal recurso. Pueden encontrarse grandes variaciones entre los diferentes sistemas, ya que cada uno toma como base 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. Los aspectos a evaluar son, básicamente, la movilidad, la concentración y la morfología, los cuales se tratarán independientemente para poder comprender cómo se valoran y cuáles son sus límites.

3.1. Mediciones

a) Movilidad

Se fundamenta en la localización de las cabezas como puntos diferenciados del fondo, gracias a sus características de luminosidad diferencial. Una vez identificadas las cabezas y por distintos algoritmos de cálculo, se procede a la definición matemática de la trayectoria seguida por la célula, en las diferentes imágenes analizadas por la unión de los puntos correspondientes al centroide de la cabeza.

Con esas trayectorias se calculan, tradicionalmente, una serie de parámetros, tal y como se expresa en la Figura 1, en la que la línea de trayectoria correspondiente a la VCL (Velocidad Curvilínea; $\mu\text{m/s}$), se calcula mediante la unión de las coordenadas del centroide del espermatozoide en cada una de las imágenes analizadas. La trayectoria que se refiere a la VSL (Velocidad Lineal; $\mu\text{m/s}$) une el primer y el último punto del desplazamiento referido a la velocidad curvilínea, indicando el desplazamiento neto de la célula en el tiempo considerado y, finalmente, la que corresponde a la VAP (Velocidad Media; $\mu\text{m/s}$), 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 Batida de la Cola, Hz) expresada como número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la lineal

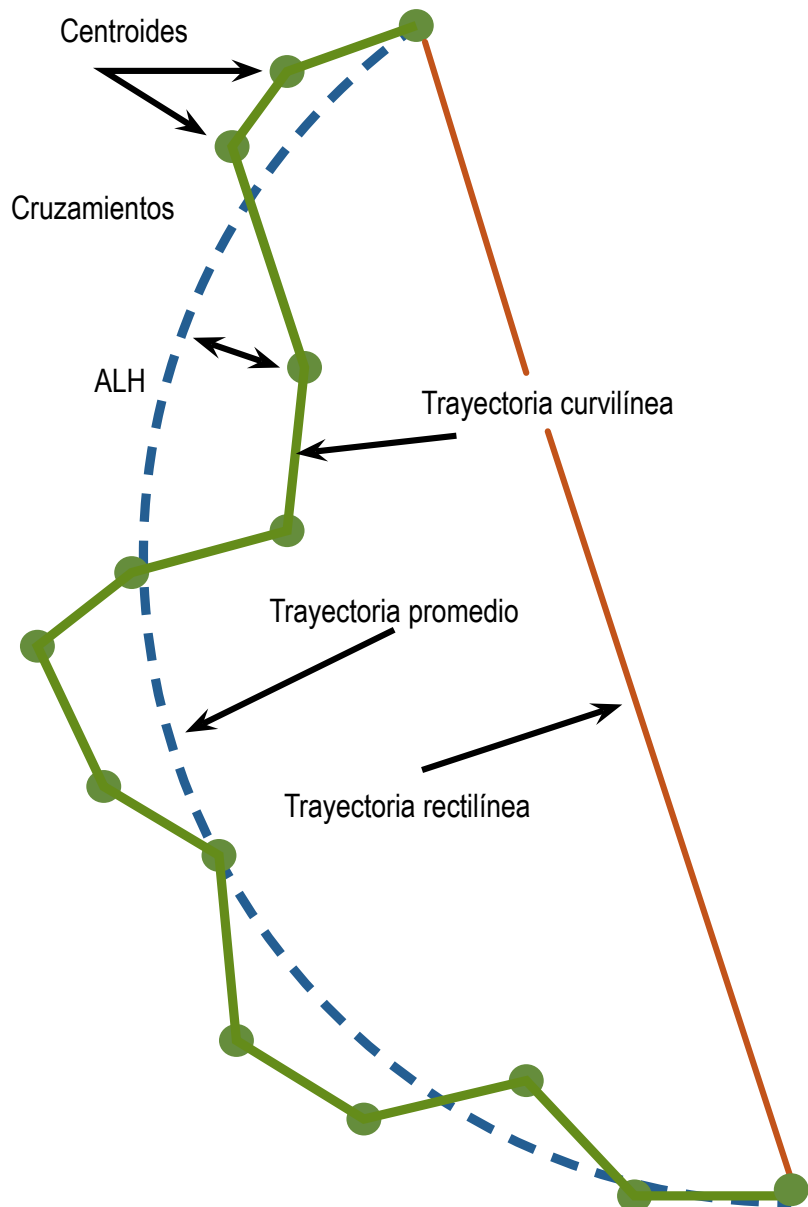


Figura 1. Parámetros cinéticos medidos por los sistemas CASA. La línea curva indica un desplazamiento neto estimado a través de la trayectoria de la célula. Adaptado: Amann y Waberski, 2014.

y la ALH (Desplazamiento Lateral de la Cabeza, μm), como la altura máxima (o media) de la amplitud del movimiento oscilatorio curvilínea.

b) Concentración

La valoración de la concentración puede realizarse conjuntamente con el análisis de movilidad. En el caso del análisis se-

minal humano, como indica la Organización Mundial de la Salud (OMS), resulta más conveniente hacerlo mediante cámaras de recuento, de $100\ \mu\text{m}$ de espesor y no de 10 ó 20 , como se acostumbra para el análisis de movilidad.

Por otra parte, cabe tener presente que, puesto que las células son identificadas por su luminosidad y que, especialmente

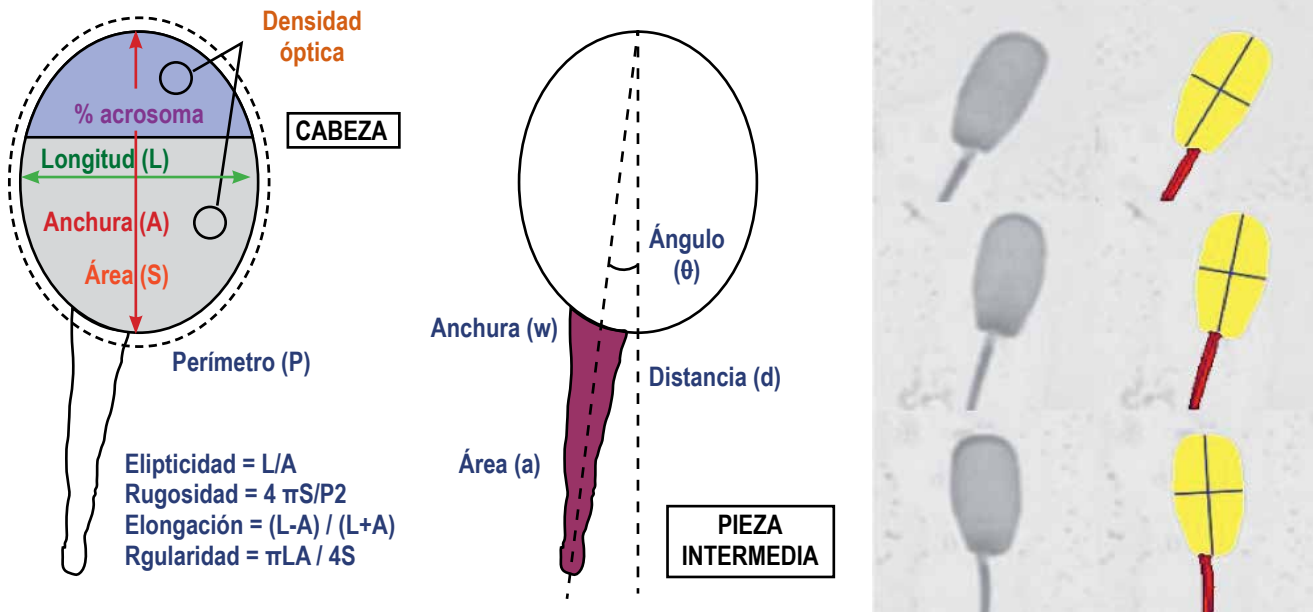


Figura 2. Análisis morfológico con el sistema ISAS®v1 y determinación de los parámetros de morfología espermática. Soler y otros, 2003.

con el uso del contraste de fase negativo, toda partícula resulta luminiscente y es muy difícil diferenciar los espermatozoides de otras partículas.

c) Morfometría

La correcta realización de análisis morfológico ha venido requiriendo de la fijación y de la tinción de las células, pues de ello dependía su correcta discriminación respecto del medio, así como de sus diferentes componentes (acrosoma, cabeza y pieza intermedia). Sin embargo, diversos condicionantes técnicos hacen poco realista el análisis automático de la cola, aunque es posible reconocer las gotas citoplasmáticas como ensanchamientos de la pieza intermedia.

Diversos trabajos han puesto de manifiesto el hecho de que las diferentes técnicas de tinción presentan distintos y significativos los valores morfológicos de una misma muestra (García y otros, 2015a). Este hecho ha sido ignorado por algunos autores que han usado una técnica, comparando los resultados con los obtenidos mediante otras técnicas. En la mayoría de las especies ganaderas, la

tinción con mejores resultados es la de la Hematoxilina de Harris.

En función del sistema utilizado, se analizan algunos parámetros (Figura 2). El sistema ISAS®v1 estudia tanto la cabeza como la pieza intermedia. Como es lógico, en el caso de muchas especies animales, en las que no se aprecia de forma clara un acrosoma, no se aporta la información con respecto al mismo.

Algunos sistemas modernos incorporan otras funciones de evaluación, como el análisis de fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN) o de diversas pruebas fluorescentes. Pero estas y otras capacidades analíticas, aún no forman parte de la rutina, por lo que no se comentarán en este artículo.

4. Análisis de semen en granjas porcinas

Un factor relevante a considerar en las granjas porcinas, en las que se realiza inseminación artificial (IA), es determinar cómo se pueden relacionar los parámetros de calidad seminal con los resultados de fertilidad obtenidos. Si se conocen los

factores seminales, que explican las variaciones en fertilidad, el valor de cada uno de estos factores podría ser estimado y contribuir así al criterio de aceptación o de rechazo de un eyaculado en la producción (Foxcroft y otros, 2008; Gadea, 2005).

La inseminación artificial es una técnica ampliamente utilizada en las granjas. En Europa y Norte América más del 90% de las inseminaciones son artificiales (Soriano-Úbeda y otros, 2013), mientras que solo un pequeño porcentaje sigue realizando la monta natural (zonas rurales). Del total de espermatozoides (millones) depositados en el tracto genital de la hembra (ya sea mediante inseminación natural o artificial), únicamente unos miles llegan al lugar de fecundación, lo que supone una pérdida significativa a lo largo del trayecto que el espermatozoide tiene que recorrer (Holt y otros, 2009).

De manera general, para la evaluación de la calidad seminal de un verraco se tienen en cuenta parámetros de concentración de espermatozoides en el eyaculado, motilidad espermática y presencia de morfoanomalías (Cuadro 1).

Cuadro 1. Parámetros de calidad seminal de verraco (n=15) en semen refrigerado a 17°C durante 3 días.

	Día 0	Día 1	Día 2
Concentración (x10 ⁶)	29.6±6.6 ^a	32.8±4.5 ^b	31.6±7.0 ^b
Móviles (%)	79.3±9.0 ^a	68.0±19.7 ^b	67.2±18.0 ^b
Progresivos (%)	56.5±13.3 ^a	43.5±19.3 ^b	44.6±19.3 ^b
VCL (µm/s)	128.7±16.0 ^a	134.7±10.6 ^b	136.6±7.0 ^b
VSL (µm/s)	50.1±8.3 ^a	43.0±8.6 ^b	45.1±8.8 ^b
VAP (µm/s)	67.5±8.8 ^a	65.0±7.5 ^b	66.2±7.3 ^b
ALH (µm)	5.9±0.8 ^a	6.8±1.0 ^b	6.6±0.7 ^b
BCF (Hz)	38.8±2.1 ^a	37.7±2.8 ^a	38.2±1.9 ^a
STR (%)	72.8±6.8 ^a	65.5±7.6 ^{bi}	66.1±6.8 ^b
LIN (%)	40.6±8.3 ^a	33.5±7.1 ^b	33.8±6.1 ^b
Rápidos (%)	62.3±13.3 ^a	50.8±19.1 ^b	51.7±19.4 ^b
Estáticos (%)	10.4±6.1 ^a	18.6±19.9 ^b	17.0±15.0 ^b
Membrana intacta (%)	85.1±10.7 ^a	85.8±8.0 ^a	86.9±8.1 ^a

Móviles (%): porcentaje de espermatozoides móviles; Progresivos (%): porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo; VCL: velocidad curvilínea; VSL: velocidad rectilínea; VAP: velocidad media; ALH: desplazamiento lateral de la cabeza; BCF: frecuencia de entrecruzamiento; STR: rectitud; LIN: linealidad. a,b Letras distintas dentro de fila indican diferencias significativas. p<0.05.

Adaptado: López Rodríguez y otros, 2012.

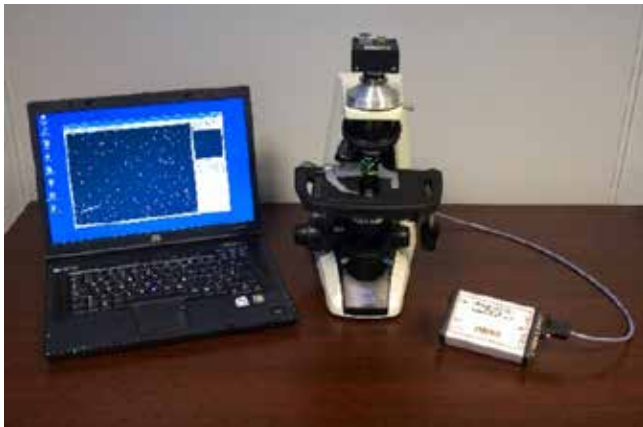


Figura 3. Equipo específico de ISAS@Psus para análisis espermático y cálculo de dosis seminales.

En relación con la morfometría podría ser posible que la competición espermática en el interior del útero no sólo dependa de las características intrínsecas del espermatozoide, sino de que la hembra tuviese un papel importante, pudiendo seleccionar determinados espermatozoides (Calhim y otros, 2007). En este sentido las hembras podrían haber desarrollado otros mecanismos en contra de los espermatozoides, no aptos para fecundar, incluyendo una selección espermática basada en la morfometría, que puede ocurrir con otros parámetros espermáticos como la morfología (García y otros, 2015a).

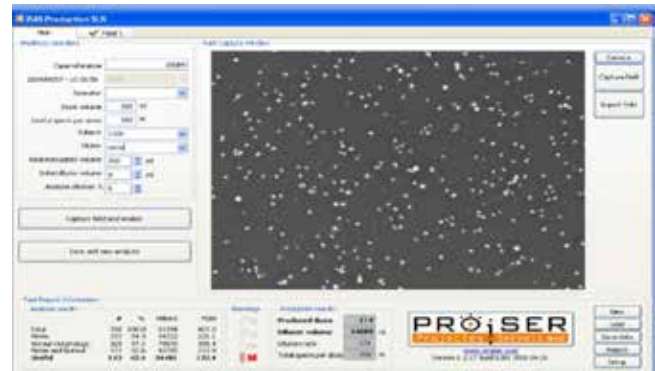


Figura 4. Ventana principal del ISAS@Psus. A la izquierda y abajo se presenta la información de uso, referida al número de espermatozoides útiles en la muestra, las dosis que se pueden producir y el volumen de diluyente a añadir al eyaculado.

De esta manera, se discutirá a continuación el desarrollo de un sistema de laboratorio para el cálculo automático de dosis seminales para cerdas en producción, llamado ISAS@Psus. Este sistema incorpora una serie de especificaciones en su equipo (Figura 3), que son importantes para la correcta valoración del semen porcino.

La evaluación que realiza el sistema es completamente automática e incluye el de movilidad y de morfología al mismo tiempo. En cuanto a la movilidad (Figura 4), se valora la cinética de las células, considerando de forma opcional la VCL o la VAP, lo que,

Cuadro 2. Dimensiones morfométricas de espermatozoides en diferentes razas de porcino (medias \pm SD).

Raza	Duroc	Large White	Landrace	Yorker (híbrido)
Longitud cabeza (μm)	9.1 \pm 0.34a	8.8 \pm 0.34b	8.8 \pm 0.39c	8.8 \pm 0.29b
Ancho cabeza (μm)	4.6 \pm 0.19a	4.5 \pm 0.16b	4.5 \pm 0.17b	4.5 \pm 0.15b
Área cabeza (μm^2)	36.2 \pm 1.71a	34.4 \pm 1.67b	34.7 \pm 1.82b	34.5 \pm 1.43b
Perímetro cabeza (μm)	26.6 \pm 1.23a	25.9 \pm 1.51b	26.2 \pm 1.52a	25.5 \pm 1.09b
Elipticidad	2.0 \pm 0.11a	1.9 \pm 0.10b	1.9 \pm 0.11b	1.9 \pm 0.09b
Rugosidad	0.6 \pm 0.05a	0.7 \pm 0.06b	0.6 \pm 0.06a	0.7 \pm 0.05b
Elongación	0.3 \pm 0.02	0.3 \pm 0.02	0.3 \pm 0.02	0.3 \pm 0.02
Regularidad	0.9 \pm 0.02	0.9 \pm 0.02	0.9 \pm 0.02	0.9 \pm 0.01

Dentro de fila valores, con diferente letra-c, se indican diferencias significativas $p < 0.01$. Elipticidad (L/W), Rugosidad ($4\pi A/P^2$), Elongación ($(L - W) / (L + W)$), Regularidad ($\pi LW/4A$). Valores son medias \pm S.D. ($n = 4172$).

Adaptado: Saravia y otros, 2007.



Figura 5. Análisis de morfometría con ISAS®. A la izquierda se observan las células fijadas y teñidas y a la derecha las "máscaras" respectivas de cada espermatozoide analizado.

junto con la progresividad, permite clasificar los espermatozoides en una combinación de ambos parámetros.

Por su parte, en el análisis morfológico se valora la presencia de anomalías de cola y de gota citoplasmática. Un aspecto relevante es que el estudio realizado de ambos parámetros, se hace de forma simultánea para cada célula, lo que ha permitido introducir el concepto de espermatozoide útil, es decir, aquel que presenta, de forma simultánea, una buena movilidad y una adecuada morfología. A partir de la información referente al volumen inicial del eyaculado y de la valoración del número de células útiles, se calcula de forma automática el volumen de diluyente, que se debe añadir para pasar a la línea de producción de las dosis finales de inseminación.

Otro análisis que se puede realizar es el de morfometría (Figura 5). La mayoría de los estudios sobre morfometría espermática se han centrado en la cabeza del espermatozoide en conjunto, tal y como se presenta en el Cuadro 2, para espermatozoides de porcino.

Solo unos pocos estudios han medido también otras partes del espermatozoide, como el acrosoma en humanos (Soler y otros, 2003; Falzone y otros, 2010) y la pieza intermedia (Soler y otros, 2003). Estas medidas requieren una distinción clara de los límites y un buen contraste entre las diferentes partes del espermatozoide, que es difícil de alcanzar en algunas especies.

El estudio de la morfometría del acrosoma puede tener una relevancia funcional. En este sentido, (Liu y Baker, 1988) demostraron que la morfología normal del acrosoma, se correlaciona significativamente con la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, mientras que (Bastiaan y otros, 2003) comprobaron que existe una fuerte relación entre la morfología espermática normal y la capacidad de inducir la reacción acrosómica. Además, se ha evidenciado la variación de subpoblaciones morfométricas presentes en un mismo eyaculado y cómo estas pueden ser seleccionadas o modificadas tras la interacción con el ambiente uterino de la hembra (García y otros, 2015b). Por ello, no es aventurado suponer que, en los próximos años, este sistema se convierta en una referencia obligada en la determinación de la calidad seminal, en las condiciones específicas de las granjas dedicadas a la producción de dosis seminales porcinas.

5. Conclusión

Los sistemas CASA permiten la valoración objetiva de la calidad seminal, mediante la grabación y posterior análisis de imágenes digitalizadas de las trayectorias de los espermatozoides.

La utilización de estas técnicas analíticas en centros de inseminación artificial o laboratorios de producción de dosis seminales, deberían incorporarse como parte de las labores rutinarias, en las que es necesario disponer de información precisa acerca de la calidad del semen y, por consiguiente, de su fertilidad potencial. Además, su uso debería extenderse a centros de investigación, universidades o bancos de semen.

El futuro de la valoración seminal se orienta a incorporar una batería más amplia de datos, que prescindan de valoraciones cualitativas, para adentrarse en el uso de variables continuas tratables en su conjunto. La adecuada caracterización andrológica, a través del análisis seminal de los machos reproductores en las granjas, permite, a posteriori, que los valores de fertilidad obtenidos (por ejemplo, lechones nacidos vivos) sean óptimos, para asegurar una adecuada rentabilidad de la empresa porcina.

Referencias:

- Amann, R.P. and Waberski, D. 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81:5-17.
- Bastiaan, H.S.; Windt, M.L.; Menkveld, R.; Kruger, T.F.; Oehninger, S.; Franken, D.R. 2003. Relationship between zona pellucida-induced acrosome reaction, sperm morphology, sperm-zona pellucida binding, and in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 79(1):49-55.
- Calhim, S.; Immler, S.; Birkhead T.R. 2007. Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS One* 2:e413.
- Falzone, N.; Huyser, C.; Becker, P.; Leszczynski, D.; Franken, D.R. 2010. The effect of pulsed 900-MHz GSM mobile phone radiation on the acrosome reaction, head morphometry and zona binding of human spermatozoa. *International Journal of Andrology* 34(1):20-26.
- Foxcroft, G.R.; Dyck, M.K.; Ruiz-Sanchez, A.; Novak, S.; Dixon, W.T. 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology* 70:1324-1336.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63:431-444.
- García, F.A., Hernández, I., Yáñez, W., Matás, C., Soriano, C., Izquierdo, M.J. 2015a. Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. *Theriogenology*. 84(4):566-74.
- García, F.A.; Hernández-Caravaca, I.; Matás, C.; Soriano-Úbeda, C., Abril-Sánchez, S.; Izquierdo-Rico, M.J. 2015b. Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *J Reprod Dev*.
- Holt, W.V. 2009. Is semen analysis useful to predict the odds that the sperm will meet the egg? *Reprod Domest Anim* 44(Suppl 3):31-8.
- Liu, D.Y. and Baker, H.W.G. 1988. Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 94:71-84.
- López Rodríguez, A.; Rijsselaere, T.; Vyt, P.; Van Soom, A.; Maes, D. 2012. Effect of Dilution Temperature on Boar Semen Quality. *Reproduction on Domes Animals*. 47:e63-e66.
- Saravia, F.; Nuñez-Martínez, I.; Moran, J.M.; Soler, C.; Muriel, A., Rodríguez-Martínez, H.; Peña, F.J. 2007. Differences in boar sperm head shape and dimensions recorded by computer-assisted sperm morphometry are not related to chromatin integrity. *Theriogenology*. 68:196-203.
- Soler, C.; de Monserrat, J.J.; Gutiérrez, R.; Nuñez, J.; Nuñez, M.; Sancho, M.; Pérez-Sánchez, F.; Cooper, T.G. 2003. Use of the Sperm-Class Analyser for objective assessment of human sperm morphology. *Int J Androl*. 26(5):262-70.
- Soriano-Úbeda, C.; Matás, C.; García Vázquez, F.A. 2013. An overview of swine artificial insemination: retrospective, current and prospective aspects. *Journal of Experimental and Applied Animal Science*: 1(1):67-97.