Estudio de las características morfológicas de los espermatozoides de algunos sementales bovinos existentes en Cuba

T. TORROELLA

Dpto. de Fisiología-Rama Agropecuaria, C. N. I. C.

Recibido en: Abril 1972

ABSTRACT. Analysis of the morphologic characteristics of its sperm is required in selecting an animal for use in artificial insemination. In recent years, this technique has been very useful in the determination of pathologies of the genital tract, and its application is important in comparing this index with those obtained in healthy animals. Morphology is given for 130 artificial insemination bulls belonging to the Holstein, Cebú, Brown Swiss, South Devon, Charolaise, Shorthorn, Hereford, Criollo and F-1 (Holstein-Cebú) breeds, between 2 to 11 years old, stabled at 20± 1° enviromental temperature. This study was carried out with semen smears stained with carbolfuschin and in samples conserved in buffer formol-saline for phasecontrast microscopy. Total percentages are the following: 6.13 head pathology, 6.23 tail pathology, 2.23 acrosome pathology, 1.32 middle piece pathology, 4.29 proximal citoplasmatic drop, 4.23 distal citoplasmatic drop, present in tables. These results are discussed and compared with those of other authors.

RESUMEN. El análisis de las características morfológicas de los espermatozoides constituye un paso en el estudio de la calidad de un animal como semental. En los últimos años ha revestido un papel más importante en la determinación de las anomalías genitales para seleccionar a los mismos según índices que se determinen en animales sanos. Se ofrecen los resultados obtenidos en el análisis de las características morfológicas del semen de 130 sementales bovinos, pertenecientes a las razas Holstein, Cebú, Brown Swiss, South Devon, Charolaise, Shorthorn, Hereford, Criollo y F-1 (Holstein-Cebú); de 2 a 11 años de edad, estabulados a una temperatura ambiental de 20 ± 1°C. Este estudio se realizó utilizando frotis de semen coloreados con carbol-fucsina y en preparaciones conservadas en buffer formol-salino, vistas en microscopía de contraste de fase. Se obtuvieron como cifra total: 6 13 - patología de la cabeza, 6.23 - patología de la cola, 2.28 - patología del acrosoma, 1.32 - patología de la porción media, 4.29 - gotas proximales, 4.23 - gotas distales, apareciendo estos datos desglosados en dos tablas. Se discuten los resultados obtenidos comparándolos con los de otros autores.

INTRODUCCION

Un método que ha permitido grandes avances en el campo de la ganadería es el de la inseminación artificial. Mediante su uso adecuado, es posible una planificación perspectiva de la explotación ganadera del país, la mejora de los rebaños basados en una selección genética, así como el control y erradicación de una serie de enfermedades venéreas.

Es fácil comprender que en estas condiciones la fertilidad del toro toma un carácter fundamental, siendo reconocible de forma directa por los resultados obtenidos en la inseminación y de forma indirecta por la evaluación de la calidad del semen. Un parámetro en esta evaluación es la morfología de los espermatozoides.

Entre las primeras observaciones de anormalidades en la morfología de los espermatozoides se encuentran los trabajos de W. L. Williams *(1921)*, quien introdujo una técnica de coloración y de Lagerlöf *(1934)*, quien realizó el estudio morfológico comparativo de la estructura histológica de los testículos y la forma de los espermatozoides encontrados en el eyaculado. Así, plantea que al existir hipoplasia testicular, degeneración testicular, orquitis o fibrosis testicular habrán cambios en la morfología de los expermatozoides, existiendo más de un 18% en el total de patologías de la cabeza.

En 1950, Blom estudió 100 sementales bovinos sanos, de buena fertilidad y planteó la división de las patologías en primarias (originadas durante la espermiogenesis), que agrupa a: cabeza estrecha, estrecha en la base, piriforme, gigante, enana, pequeña y gruesa, cualquier otra anormalidad en la forma de la cabeza, coloración anormal de la cabeza, cabeza anormal suelta, diversas formas abortivas, cabeza normal con cola muy enrollada, formas dobles, implantación abaxial de la porción media y defectos de la porción intermedia; (estando esta agrupación casi en total conformidad con Lagerlöf *(1934)*.

Además del grupo de las patologías primarias, está el de las secundarias, que consta de: cabeza normal suelta, espermatozoide con gota proximal, con gota distal, con dobladura simple y desprendimiento de la galea capitis.

Blom obtuvo un total de 4.6% de patologías primarias y manifiesta que en su material ningún toro presentó más de 15.20% de patologías primarias de los espermatozoides, a no ser que esos hallazgos fueran acompañados de reducida fertilidad o de una condición patológica en los genitales.

Holy-Barba *(1967)* encontraron 6.44 patologías de la cabeza y 1.95 patologías de la porción media en 166 animales en nuestro país.

Recientemente, Rao *(1971)* realizó un estudio de los cambios morfológicos de los espermatozoides a lo largo del tracto genital hasta llegar al eyaculado, en 20 toros normales y 23 subfértiles, hallando 6.3% y 26.4% respectivamente del total de patologías de la cabeza.

Este autor concluye que todas las anormalidades de la cabeza, porción intermedia y gota proximal deben considerarse primarias, mientras que las de la cola deben considerarse como defectos secundarios de los espermatozoides.

El objetivo del presente estudio es conocer la distribución cuantitativa de las características morfo'ógicas de los espermatozoides de algunos de los sementales bovinos existentes en nuestro país.

MATERIALES Y METODOS

Fueron estudiados 130 animales de conocida buena fertilidad, pertenecientes a las razas Brown Swiss, Cebú, Charolaise, Criollo, Hereford, Holstein, Shorthorn, South Devon y F-1 (Holstein-Cebú), oscilando sus edades de 2 a 11 años.

El estado de salud de los animales fue controlado, siendo las pruebas de Brucella, T. B., vibrio y trichomona negativas.

Todos los anima'es estaban sometidos a un idéntico sistema de estabulación (con temperatura constante de 20 ± 1°C), alimentación, régimen de monta y descanso. La colección de las muestras de semen se realizó por el método de la vagina artificial, variando el número de las mismas por animal, de 1 a 3.

Inmediatamente después de colectado el semen, se prepararon frotis en láminas mantenidas a 37°C. Seguidamente se introdujeron 2 gotas de semen (por muestra) en viales conteniendo buffer formol-salino *(Hancock, 1957)* a 37°C, manteniéndose éstos posteriormente a 5°C. Las láminas fueron co'oreadas con carbolfucsina-eosina de acuerdo con el método descrito por William *(1921)*, modificado por Lagerlöf *(1934)*, la cual se explica en detalle por Rao *(1971)*, tales laminadas fueron utilizadas para estudiar, principalmente, la morfología de la cabeza de los espermatozoides, clasificándolas según Lagerlöf *(1934)* de la siguiente forma:

a) En la cabeza: estrecho
estrecho en la base — abaxial
piriforme — inmaduro (formas abortivas)
normales grandes, — cabeza patológica suelta
pequeños, redondos — alteración del color
etc.
cabezas dobles — cola alrededor de la cabeza

b) En la cola: dobladura simple, dobladura comp'eja y cualquier patología de la porción media.

Se contaron 500 espermatozoides por lámina, en campo brillante y con objetivo de inmersión.

Las muestras conservadas en los viales, se observaron en fresco, en microscopía de contraste de fase con objetivo de inmersión siendo clasificado de acuerdo a Bane

961) en gotas citoplasmáticas proximal y distal; patologías del acrosoma y de porción intermedia; cabezas sueltas (tanto patológicas como norma'es); doblara simple, compleja y cola alrededor de la cabeza.

: realizó coloración celular secando los frotis al aire, fijando en alcohol, colorando con hematoxilina-eosina y montando con cubre-objeto, para observar prencia de leucocitos.

l análisis de los resultados se realizó por:

) T-student.

) F-test, según Snedecor. G. W. *(1968)*.

RESULTADOS

os resultados obtenidos se expresan en las Tablas I y II, donde se presentan las normalidades de la cabeza de los espermatozoides (técnica de Williams) y el studio de las gotas citoplasmáticas, acrosoma, porción intermedia y defectos de la ola (en fresco por contraste de fase), respectivamente.

TABLA I

ESTADIGRAFOS DE LAS ANORMALIDADES DE LA CABEZA DE LOS ESPERMATOZOIDES

Concepto	*Media aritmética* ($\overline{X}$)	*Desviación estandard* (S)	*Error de la media* ($S\overline{x}$)	*Coeficiente de variación* (Cv)
Total del % Patologías de la Cabeza	6.1336	4.0761	0.4182	66.45
Estrecho	1.3741	1.0546	0 1093	76.74
Estrecho en la Base	1.3450	1.1068	0.116	82.28
Piriforme	0.5764	0.6652	0.0931	115.40
Grandes, Pequeños, etc.	0.6625	0.4617	0.0516	69.69
Abaxial	0.5015	0.3641	0.0451	72 6
Inmaduro	0.7218	1.1626	0.1453	161.06
Cabezas Patológicas sueltas	0.9972	1.1335	0.1317	113.66
Alteración del color	0.40	0.2308	0 1150	57.70
Cola alrededor de la cabeza	1.0695	0.8419	0.0877	78.71
Espermatozoides dobles	0.9263	1.2205	0.2800	131.76

TABLA II

ESTADIGRAFOS DE LAS GOTAS CITOPLASMATICAS, ACROSOMAS, PORCION INTERMEDIA Y DEFECTOS DE LAS COLAS DE LOS ESPERMATOZOIDES

Concepto	*Media aritmética* ($\overline{X}$)	*Desviación estandard* (S)	*Error de la media* ($S\overline{x}$)	*Coeficiente de variación* (Cv)
Gota Distal	4.2316	5.4272	0.4359	128.25
Gota Proximal	4.2907	6.0301	0 4737	140.53
Acrosomas Patológicos	2.2887	3.829	0.3438	167 3
Patología de la Porción Intermedia	1.3274	1.0434	0.0875	78.6
Total de Cabezas sueltas	3.3754	4.9421	0.3669	146 41
Cola alrededor de la cabeza	1.2222	1.0736	0.0992	87.84
Dobladura simple	2.6424	2.1067	0.164	79.72
Dobladura completa	2.3782	3.6124	0 2892	151.89

Debemos señalar que existen algunas diferencias en el número de animales, debido a dificultades confrontadas con la recolección de las muestras.

Por considerarlo interesante, nos planteamos un análisis de los resultados obtenidos en algunas de las características morfológicas con respecto a las edades de los animales estudiados. A ese fin, se agruparon heurísticamente en:

Grupo I hasta 3 años
Grupo II de 3.1 a 6 años
Grupo III de 6.1 a 9 años
Grupo IV 9.1 años o más,

encontrándose dicho análisis reflejado en la figura de la pág. 68.

Se efectuó la comparación de cada grupo de edad contra el total. A esos efectos se procedió a realizar el análisis de la varianza y comparación de medias, obteniéndose los siguientes resultados:

a) Análisis de varianza: en cada columna, no existen diferencias significativas entre las varianzas (existe homogeneidad) de las comparaciones realizadas ($p > 0.05$).

b) Comparación de medias: sólo se presentaron diferencias en los siguientes casos:

% gota proximal entre el Grupo III y el total.

% patologías de la porción media entre el Grupo IV y el total.

% cabezas sueltas entre el Grupo III y el total.

% dobladura compleja entre el Grupo III y el total.

La diferencia encontrada entre el Grupo IV y el total puede ser debida a que el mencionado Grupo cuenta con pocos animales por lo que sólo lo tendremos como referencia, no con valor de peso en este trabajo.

El caso de las otras diferencias encontradas serán tratadas en la discusión de este trabajo.

Puede observarse que, en general casi todos los índices tienden a disminuir presentando el valor menor en el Grupo III.

TABLA III

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LOS DE OTROS AUTORES

Concepto	*Lagerlöf (1934)*	*Blom (1950)*	*Rao (1971)*	*Holy y Barba (1967)**	*Nuestros resultados*
No. de animales fértiles estudiados	100	100	20	166	130
Patologías de la cabeza	10–11	4.65	6 26	6.44	6.13
Gota Distal	—	0.62	3.77	—	4 23
Gota Proximal	2–3	0.15	1.77	—	4.29
Acrosoma Patológico	—	—	0.10	—	2.29
Patologías Medias	—	—	0.52	1.95	1.33
Cabezas sueltas	—	2.11	2.10	—	3.38
Cola alrededor de la cabeza	—	—	0 27	—	1.22
Dobladura simple	—	4.01	2.00	—	2.64
Dobladura compleja	—	—	1.25	—	2.38

* Valores Medios ponderados.

DISCUSION

En la Tabla III presentamos la comparación de los resultados obtenidos, con los de otros autores. Comenzando con Lagerlöf, no coincidimos en ambas de las cifras presentadas (en un caso las nuestras son mayores, en el otro no) pero debido a que las técnicas utilizadas son distintas, no es posible establecer relación entre ambas. En el caso del trabajo de Blom, nuestras cifras son mayores a excepción de las dobladuras simples donde según él mismo expresa: "ciertas condiciones no fisiológicas tales como extrema utilización, eyaculado incompleto o shock térmico actúan como factor desencadenante de dicha anormalidad". No podemos realizar ninguna discusión al respecto debido a que la base de comparación no es la misma por diferir en las técnicas empleadas, al igual que el caso anterior.

Por coincidir nuestras técnicas con las de Rao, constituyen sus cifras las más interesantes para esta discusión.

Como se podrá observar todos sus valores son menores que los nuestros a excepción del total de patologías de la cabeza (que comparadas nuestras cifras con las de él no dio diferencias significativas, $p > 0.05$).

Pudiéramos explicar este fenómeno:

1. Por la influencia de la temperatura ambiental en nuestro país en relación con Suecia, país donde Rao desarrolló su trabajo.

Lagerlöf *(1934)* y Knudsen *(1954)* produjeron a corto plazo cambios degenerativos en el epitelio germinal por medio del aislamiento térmico escrotal.

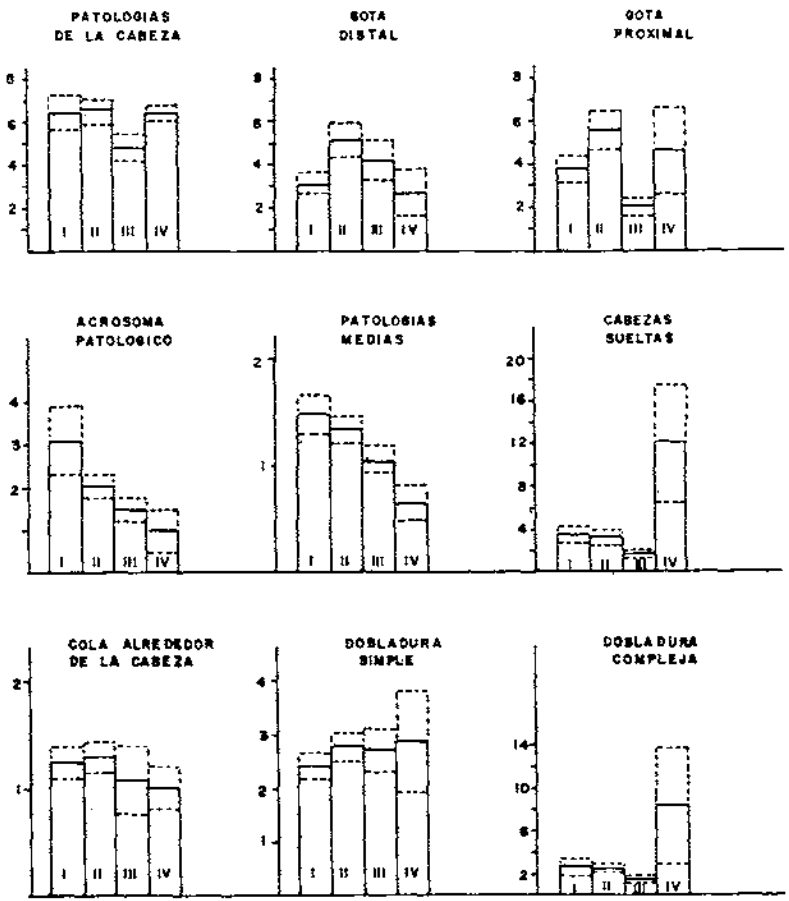
Lagerlöf *(1950)* reportó que influencias externas tales como cambios en las condiciones ambientales y de manejo pueden producir trastornos en las espermiogenesis en los toros de las raza S.R.B. (Sueca, Roja y Blanca).

2. Bane *(1954)* no encontró regresión lineal significativa entre la intensidad de la alimentación y las características de los espermatozoides, pero sí se observó una tendencia a una mayor incidencia de patologías de la cabeza de los mismos y gotas citoplasmáticas con el aumento en la intensidad de la alimentación. Dado que no existen trabajos sobre alimentación en los animales estudiados, no es posible ni negar ni afirmar la influencia de este factor.

3. Rao, utilizó animales pertenecientes a las razas suecas S.R.B., Friesian y Ayreshire. Nosotros utilizamos animales de las razas ya mencionadas en Materiales y Métodos, nacidos en el país e importados. En estos últimos puede o no influir su

proceso de aclimatación sobre el aumento de las anormalidades en los espermatozoides.

Por las razones expuestas anteriormente no podemos definir cuál o cuáles de estos factores explique las diferencias entre los resultados de Rao y los nuestros. Por lo cual, debe ser objeto de posteriores estudios, analizándolo desde diferentes puntos de vista (aclimatación, régimen alimenticio, manejo, influencia del medio ambiente y las diferentes razas).



CARACTERISTICA MORFOLOGICA DE LOS ESPERMATOZOIDES, SEGUN EDADES DE LOS SEMENTALES

En el trabajo de Holy-Barba, independientemente de las diferencias en técnica, resulta interesante comentar'lo, pues en él se obvian algunos de los factores anteriormente mencionados, por haber sido realizado en nuestro país. Nuestras cifras son menores, y podríamos agregar, que esto puede ser debido al hecho que en los años transcurridos de dicho trabajo a la fecha, se ha realizado una selección genética de los animales utilizados en Inseminación Artificial, así como variaciones en el manejo y medio ambiente de los mismos.

En la figura 1, al realizar la comparación del grupo de edades, encontramos que la tendencia general es de disminuir el % de patologías según aumenta la edad. Esto está en abierta contradicción con lo establecido por Lagerlöf *(1966)* y confirmado por Rao donde existe una marcada correlación entre el aumento de la edad y el aumento de la incidencia de anormalidades de la cabeza, gotas proximales y patologías de la cola. Siendo esto reafirmado por las diferencias significativas entre el Grupo III y el total de animales en las gotas proximales, cabezas sueltas y dobladuras complejas de la cola (teniendo siempre el Grupo III cifras menores que el total).

Referido por Lagerlöf *(1934)*, Blom *(1950)* y confirmado por Rao *(1971)* que las patologías de la cabeza y porción media están en dependencia del estado del epitelio germinal y la persistencia de la gota proximal parece ser gobernada por factores heredados del testículo; y que como fue planteado por Blom *(1950)*, Gustafsson *(1966)* y Rao *(1961)* que las patologías de la cola son de origen epidimario, nosotros consideramos que los animales del Grupo III se encuentran en mejores condiciones de producción de gametos, ya sea por encontrarse adaptados a su medio ambiente o por condiciones de manejo.

CONCLUSIONES

Por la importancia del tema y debido a las variaciones que hay entre los valores encontrados en el presente trabajo y los de los otros autores como se ha expresado en la Discusión, resulta necesario emprender un estudio multidisciplinario de todos los factores que pueden influir en la calidad del semen de nuestros sementales bovinos.

RECONOCIMIENTO

A la Dirección Nacional de Inseminación Artificial por la autorización y apoyo a realizar esta investigación.

Quisiera expresar mi agradecimiento a la Cra. Caridad Herrera por su asistencia técnica.

Agradecemos a los departamentos del C.N.I.C. de Microscopía Optica y Fotografía su co'aboración en la obtención de las microfotografías, así como al Departamento de Matemática Aplicada por la guía y realización del análisis estadístico.

REFERENCIAS

Bane A. Comunicación personal, 1961.

Blom E. On the evaluation of bull semen with special reference to its empoyment for artificial insemination. Thesis Copenhagen (1950). Gustafsson, B. Luminal contents of bovine epididymis under conditions of reduced spermatogenesis, luminal blockage and certain sperm abnormalities. Acta vet. scand. 7, *suppl* 17, 1966.

Hancock J. L. The morphology of boar spermatozoa. *Jl. R. Microsc. Soc.* **X** 76, 84, 1957.

Holy L. y Barba F. Zootecnia y Sanidad Animal en Cuba. Instituto del Libro, 1967.

Knudsen O. Cytomorphological investigations into the spermiocytogenesis of bulls with normal fertility and bulls with acquired disturbances in spermiogenesis. *Acta path. microbiol. scand. suppl.* 101, 1954.

Lagerlöf N. Morphologische Untersuchugen über Veränderungenim Spermabild und in den Hoden bei Bullen mit verminderter oder aufgehobener. Fertilität. *Acta Path. microbiol. Scand. suppl.* 19, 1934.

Lagerlöf N. Investigations on sterility in Swedish bulls during the period 1928-1949. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr.* **XIX**, 285, 1950.

Lagerlöf N. The history of cytological and histological examination of sperm and testis. International Symposium on Physiology and Pathology of Spermatogenesis". Feb. 1966.

Rao, R. Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Thesis. Stockholm, 1971.

Snedecor G. W. "Statistical Method". 6ta. Ed. The Iowa State University Press, Amer., Iowa, U.S.A. 1968.

Williams W. L. The Diseases of genital organs of domestic animals. Ithaca. N. Y. 1921.