

ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS EN EL GATO DOMÉSTICO (*FELIS SILVESTRIS CATUS*)

M.C. Bonaura^{a,c}, S. Jurado^a, R. Nuñez Favre^{a,b}, M. García^{a,b}, P. Sarmiento^d, M.A. Stornelli^{a,*}

^aFacultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Calle 60 y 118 s/n. La Plata. Argentina. B1900AVW.

^bCONICET.

^cCIC.

^dServicio de Microscopía Electrónica de Barrido. Fac. Cs. Naturales y Museo. UNLP.

*Autor de correspondencia, email: astornel@fcv.unlp.edu.ar. Dirección: calle 60 y 118 s/n (1900) La Plata, Argentina, Tel (54) (0221) 4236663/64. Int 455.

Recibido: Septiembre 2013. Aprobado: Julio 2014

Publicado: Noviembre 2014.

RESUMEN

El gato doméstico ha sido clasificado como teratospermico en relación al alto porcentaje de anomalías espermáticas presentes en el semen de gatos sanos y fértiles. El objetivo fue estudiar el tipo de anomalías espermáticas en el gato doméstico. Se utilizaron 50 gatos (n=50) mestizos. Los espermatozoides epididimales obtenidos fueron procesados para estudio de microscopía óptica y electrónica. El estudio de microscopía óptica permitió observar alteraciones acrosomales (quistes, hinchamientos), de la cabeza (macro y microcefalia, cabezas globosas, piriformes, alargadas y dobles), de la pieza intermedia (doble, deshinchada, doblada, gotas distales e inserción excéntrica), de la cola (cola doble, enrollada, Dag y falta de la porción terminal). El estudio de microscopía electrónica permitió observar alteraciones acrosomales, defecto de "Dag", colas dobles, cabezas dobles, axonemas incompletos. Nuestros resultados muestran gran variedad de anomalías espermáticas tanto en el estudio de microscopía óptica como en el de microscopía electrónica. En el presente trabajo se describen por primera vez en felinos las anomalías espermáticas observadas al microscopio electrónico y se las relaciona con las observadas al microscopio óptico.

Palabras claves: espermatozoides, gato, morfoanomalías.

SPERM ABNORMALITIES IN DOMESTIC CAT (*FELIS SILVESTRIS CATUS*).

ABSTRACT

The domestic cat is classified as teratospermic in relation to the high percentage of abnormal sperm in semen of healthy and fertile cats. The aim was to study the kind of sperm abnormalities in the domestic cat. Fifty short-hair mixed breed male cats were used (n = 50). The epididymal sperm were processed using light and electronic microscopy. Microscopically study allowed to observe acrosomal abnormalities (cysts, swelling), head disorders (macro and microcephaly, heads globose, pyriform, elongated and double), sperm midpiece abnormalities (double, frayed, bent, and insertion distal eccentric drops) and tail disorders (tail double coiled Dag and lack terminal portion). Ultramicroscopical study allowed to observe acrosomal disorders, Dag, double tails, double heads and incomplete axonemes. Our results show a variety of sperm abnormalities. Our results showed several sperm abnormalities in cat epididymal sperm. In this paper we describe for first time ultramicroscopic sperm abnormalities and relate them to sperm microscopic abnormalities.

Keywords: sperm, cat, abnormal morphology.

INTRODUCCIÓN

El estudio morfológico de la célula espermática es uno de los indicadores de funcionalidad celular [1]. En algunas especies como en los bovinos el impacto de las morfoanomalías sobre la fertilidad se encuentra bien

definido. En los felinos el conocimiento en ésta área es escaso. Es probable que así como ocurre en otras especies, las alteraciones de la morfología espermática afecte la capacidad fecundante de la célula.

Las anomalías espermáticas disminuyen durante el tránsito en el epidídimo, mientras que algunas anomalías de la cola se originan en el epidídimo [2]. La influencia de la estación del año sobre la producción espermática ha sido bien definida en los últimos años [3, 4]. Es así que el porcentaje y tipo de morfoanomalía variará según el gato se encuentre o no en la estación reproductiva [5]. Así como la estación del año, la edad del animal es otro factor relacionado con la ocurrencia de anomalías espermáticas [3]. Howard y col. han demostrado que gatos con menos del 40% de espermatozoides morfológicamente normales tienen bajas tasas de penetración en la zona pelúcida comparado con gatos con 60% o más de espermatozoides normales [6].

El gato doméstico ha sido clasificado como teratospérmico en relación al alto porcentaje de anomalías espermáticas presentes en el semen de gatos sanos y fértiles [3, 7].

Células espermáticas que son consideradas normales al microscopio óptico (MO) pueden presentar alteraciones en su morfología que solo son detectables al microscopio electrónico (ME).

Aunque la morfología espermática puede evaluarse con un microscopio de contraste de fase en las especies de producción, el principal método para diferenciar entre células normales y anormales en caninos y felinos es el uso de extendidos de semen teñido con coloraciones especiales [8, 9]. El estudio morfológico permite detectar anomalías de la cabeza, pieza intermedia y cola, defectos acrosomales específicos o variaciones del tamaño de las cabezas. No obstante, este método está basado en criterios subjetivos, los cuales producen una gran variabilidad dentro y entre los laboratorios [10]. El uso del sistema CASA provee mediciones más objetivas y confiables de la motilidad y morfología espermática [11]. Sin embargo, el sistema CASA es costoso y necesita una calibración exacta [12].

La evaluación morfológica usando microscopía electrónica de transmisión o de barrido es muy valiosa porque provee información detallada a cerca de la morfología e integridad de la célula espermática que no es posible obtener por medio de otras metodologías. Esta información posibilita estimar la fertilidad del semen analizado con mayor exactitud que otras pruebas de análisis de semen *in vitro* [13]. Los detalles ultraestructurales de cualquier alteración morfológica del semen o el grado de daño de membrana son mejor evaluados usando este tipo de microscopios de alta resolución [14, 15]. El microscopio electrónico de barrido permite examinar el espermatozoide completo a un nivel de magnificación elevado y con mayor poder de resolución que el microscopio óptico. Además, el secado por punto crítico empleado en este tipo de microscopía evita las deformaciones de las células espermáticas apreciándose mejor las estructuras superficiales [16, 17]. Por otro lado, el microscopio electrónico de transmisión es una herramienta que permite realizar la evaluación de las estructuras intracelulares e identificar numerosos defectos estructurales, tanto de la cabeza como de la cola, que interfieren en el proceso de la fecundación.

Si bien la morfología espermática y la motilidad son pruebas de contrastación usadas en la evaluación seminal, no son eficientes para detectar alteraciones cuando los defectos morfológicos poseen magnitud a escala ultramicroscópica [18]. Por otra parte el daño subcelular puede afectar la fertilidad sin tener necesariamente un impacto en la motilidad [19]. El estudio ultraestructural de la célula espermática ofrece información detallada sobre la integridad estructural del espermatozoide pudiendo ser una herramienta sumamente útil en la detección de alteraciones estructurales que interfieren en el proceso de fecundación [13].

Existen escasos estudios sobre la ultraestructura de los espermatozoides felinos [7]. El estudio de los espermatozoides frescos permitirá observar anomalías

morfológicas microscópicas y ultramicroscópicas presentes en espermatozoides felinos y estimar su capacidad fecundante.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el tipo de anomalías espermáticas observadas al MO y al ME, en el gato doméstico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se utilizaron 50 gatos (n=50) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg., incluidos en un plan urbano de control de la reproducción, los cuales fueron sometidos a orquiectomía bilateral [20]. Cuarenta y cinco gatos castrados en estación reproductiva y no reproductiva fueron utilizados para microscopía óptica y 5 gatos castrados en estación reproductiva para microscopía electrónica. Luego de la orquiectomía, los testículos y epidídimos (EPI) de cada animal fueron colocados en solución fisiológica (SF) con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a temperatura ambiente y enviados rápidamente al laboratorio. Los EPI se procesaron dentro de las 4 hs posteriores a la orquiectomía, tiempo que se tarda desde la orquiectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separó cada cola del epidídimo y se atemperó en un baño termostático a 37°C durante 10 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100 ml). La recuperación de los espermatozoides epididimales (EE) se realizó por la técnica de “cutting” de la cola del epidídimo [21].

Estudio microscópico

Para microscopía óptica, una gota de EE se extendió sobre portaobjetos pre-calentado, se tiñó utilizando tinción 15[®] (Biopur S.R.L. Argentina). Posteriormente se contaron 100 células por muestra con objetivo de

inmersión. Las morfoanomalías se clasificaron en anomalías de cabeza, pieza intermedia y cola.

Estudio ultraestructural

Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido permaneció en el fijador durante 2 hs a 4 °C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 hora a 4 °C y posteriormente, los espermatozoides se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina Epoxi [13]. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Estas muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (MET) Jeol JEM 1200 EX II (JEOL Ltd., Tokio, Japón). Se evaluaron 100 cabezas y 100 colas.

Microscopía electrónica de barrido

Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 1 % durante 2 hs. La dilución se filtró a través de un filtro Millipore (5µ de diámetro) y los filtros se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico (10 % a 100 %). Posteriormente, los espermatozoides depositados sobre los filtros fueron transferidos a acetato de amilo y sometidos al secado por punto crítico (Balzer CP 30) y finalmente se metalizaron con oro-paladio (Jeol Fine Coat 1100). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido (MEB) Jeol JSM 6360 LV.

RESULTADOS

Estudio microscópico

El estudio mediante microscopía óptica permitió observar alteraciones acrosomales (quistes, hinchamientos), de la cabeza [macro y microcefalia, cabezas globosas, piriformes, alargadas y dobles (Fig. 1)], de la pieza

intermedia [doble (Fig. 1), deshilachada, doblada, gotas distales e inserción excéntrica], de la cola [cola doble, enrollada (Fig. 2), Dag (Fig. 2) y falta de la porción terminal].



Fig. 1. Tinción 15[®] Biopur SRL. Objetivo 100X. Se observa un espermatozoide felino con cabezas y piezas intermedia dobles.

Al estudiar el total de las muestras obtenidas, el porcentaje de espermatozoides normales fue de 53%, y 47% presentaron una morfología anormal, de las cuales el 37,1% de las anomalías encontradas se observaron en la cola, 8,33% en la cabeza y alrededor del 2% se presentaron en ambas localizaciones.

Cuando se comparó el porcentaje de espermatozoides normales de la estación reproductiva (primavera-verano) versus la estación no reproductiva (otoño-invierno) pudo observarse una tendencia a ser superior el porcentaje de espermatozoides normales en la estación reproductiva $57,13 \pm 2,11$ vs $52,36 \pm 2,48$.

Estudio ultramicroscópico

El estudio mediante el MET permitió observar alteraciones acrosomales (Fig. 3), defecto de "Dag" (Fig. 4, 7), colas dobles (Fig. 5), cabezas dobles (Fig. 5, 6), axonemas incompletos (Fig. 5). EL 80,75% de las

cabezas y el 91,75% de las colas de los EE mostraron una morfología normal al MET.



Fig. 2. Tinción 15[®] Biopur SRL. Objetivo 100X. Se observa un espermatozoide felino con defecto de "Dag" a la izquierda y un espermatozoide con cola enrollada a la derecha.

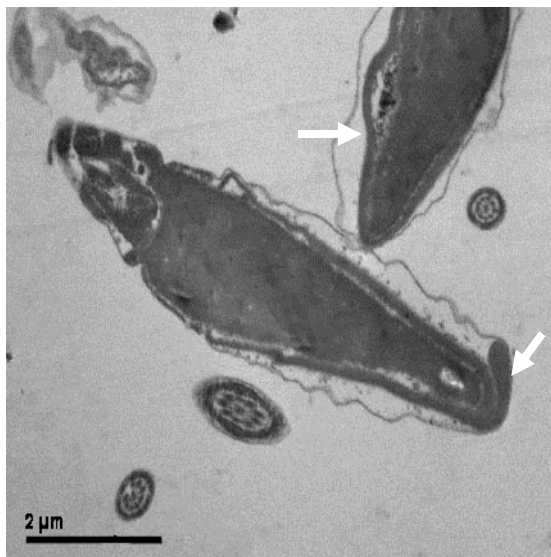


Fig. 3. MET: Corte longitudinal a nivel de la cabeza de 2 espermatozoides. Se observan acrosomas defectuosos.

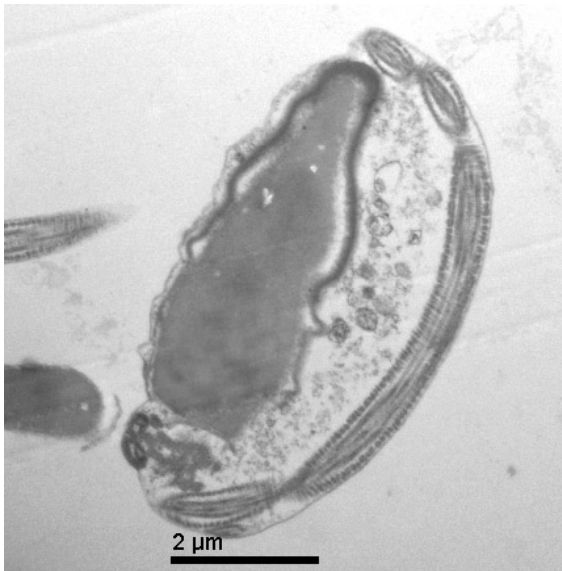


Fig. 4. MET: “Dag”: caracterizado por el enrollamiento de la cola alrededor de la cabeza envuelta por una membrana plasmática intacta.

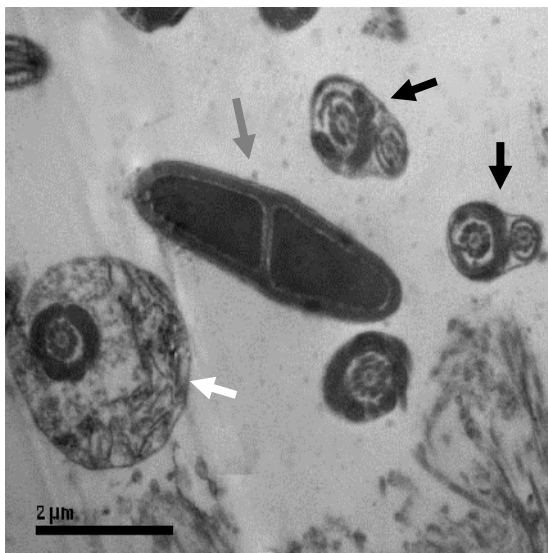


Fig. 5. MET: Se observan cabezas dobles (flecha gris), gota citoplasmática (flecha blanca), colas dobladas (flechas negras).

En el MEB se pudieron observar anomalías como: quiste acrosomal, acrosomas dañados, cabezas anormales, inserción excéntrica de pieza intermedia, colas dobladas y gotas citoplasmáticas.

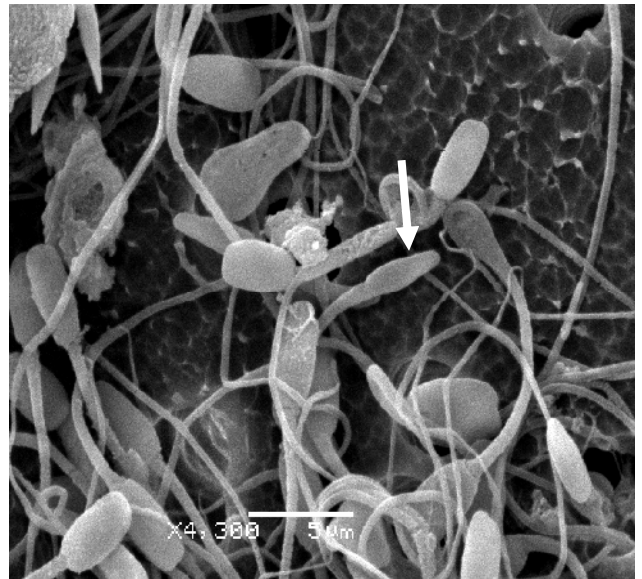


Fig. 6. MEB: Cabeza piriforme (flecha).

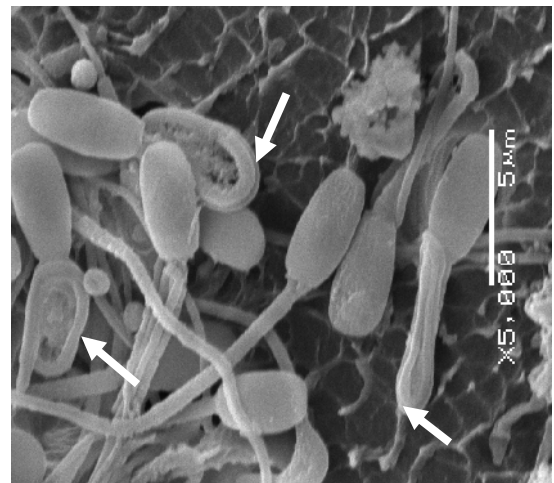


Fig. 7. MEB: Colas enrolladas. Dag (flecha).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se describen por primera vez las anomalías espermiáticas observadas al ME y se las relaciona con las observadas al MO. Nuestros resultados muestran gran variedad de anomalías espermiáticas tanto en el estudio de microscopía óptica como en el de microscopía electrónica de EE del gato doméstico. Los hallazgos al MO se correlacionan con lo observado previamente por Axner y col. [3] y Nuñez Favre y col. [9].

Los daños detectados en los acrosomas podrían comprometer el proceso de capacitación al causar disfunción acrosomal, lo que podría ser responsable del bajo éxito en la fertilización en gatos domésticos teratospérmicos [7]. La capacitación espermática es un pre-requisito para la reacción acrosomal. Si bien la disfunción acrosomal en gatos teratospérmicos podría no estar exclusivamente relacionada a la morfología, la capacidad reproductiva se vería comprometida al aumentar la teratospermia [7]. En concordancia con lo expresado por Long y col., en nuestro trabajo el estudio ultraestructural mostró diferentes alteraciones acrosomales.

Por otro lado, Axner y *col.* han demostrado que gatos con bajos porcentajes de espermatozoides normales son capaces de producir crías [3].

Es así que los resultados obtenidos en este estudio permitirían hipotetizar que los animales utilizados en nuestros experimentos serían capaces de fecundar. Sin embargo se requieren futuras investigaciones para confirmarlo.

En el presente trabajo las muestras estudiadas mediante microscopía óptica provenían de animales en estación reproductiva y no reproductiva mientras que las estudiadas mediante microscopía electrónica provenían solo de animales en estación reproductiva. Se ha comunicado un efecto estacional en la morfología espermática, con una tendencia a producir mayor porcentaje de células normales durante la estación reproductiva [3]. En concordancia con los mencionados hallazgos, Nuñez Favre y *col.* observaron un alto porcentaje de formas normales en EE normales en gatos castrados en el período anual de ascenso lumínico. Si bien muchos gatos poseen un alto porcentaje de formas anormales en el eyaculado, la disponibilidad de más de 12 hs luz permitiría un mayor número de individuos con más de 60% de espermatozoides normales y mayor motilidad, vigor y concentración espermática [9]. En

concordancia con lo observado por otros autores [3, 9] las diferencias encontradas en el porcentaje de anomalías observadas mediante microscopía óptica y electrónica podría deberse a la estación en la que se encontraban los animales utilizados en el presente estudio.

Podemos concluir que la microscopía electrónica nos brinda una herramienta útil para evaluar la morfología celular. Así mismo el estudio de la estructura espermática es un importante parámetro para evaluar la calidad seminal de un individuo y aproximar el diagnóstico de trastornos de la fertilidad.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo se contó con la colaboración de la Técnica Biológica Roxana Peralta del Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Centro de Zoonosis de la ciudad de La Plata, Municipalidad de La Plata.

REFERENCIAS

- [1] Claassens OE, Mankvel R, Franken DR, Pretotius E, Swart Y, Lombard CJ, Kruger TF. (1992). "The Acridine Orange test: determining the relationship between sperm morphology and fertilization in vitro". *Hum. Reprod.* 7 (2): 242-7.
- [2] Axner E, Linde Forsberg C. and Einarsson S. (1999). "Morphology and Motility of spermatozoa from different regions of the epididymal, duct in the Domestic Cat". *Theriogenology.* 767-777
- [3] Axner E and Linde Forsberg C. (2007). "Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study". *Reprod. Dom. Anim.* 42: 282-291
- [4] Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, Nuñez Favre R, Savignone CA, Tittarelli CM, de la Sota RL. (2009). "Seasonal changes in testis cell morphology in male

- domestic cats (*Felis catus*)". *Reprod. Dom. Anim.* 44 (2): 287-290.
- [5] Núñez-Favre R, Bonaura MC, Tittarelli CM, Mansilla-Hermann D, de la Sota RL, Stornelli MA. (2012). "Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis silvestris catus*)". *Reprod. Dom. Anim.* 47 (6): 232-234.
- [6] Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA, Wildt DE, (1993) "Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats". *Biol. Reprod.* 49: 131-139.
- [7] Long JA, Wildt DE, Wolfè BA, Critser JK, De Rossi RV, Howard J. (1996). "Sperm capacitation and the acrosome reaction are compromised in teratospermic domestic cats". *Biology of reproduction.* 54: 638-646
- [8] Stornelli MA. (2007). "Basic and advanced evaluation of cat's semen". *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31(1): 135-140.
- [9] Núñez Favre R, Bonaura MC, Praderio R, de la Sota RL, Rojas Zamora CA, Stornelli MA. (2011). "Ocurrencia de anomalías espermáticas en el gato doméstico (*Felis catus*). I Simposio Latinoamericano de Reproducción Animal. Viña del Mar. Chile.
- [10] Zaini A, Jennings MG, Baker HW. (1985). "Are conventional sperm morphology and motility assessments of predictive value in subfertile men?" *Int. J. Androl.* 8 (6): 427-435.
- [11] Irvine S. "Computer assisted semen analysis system: sperm motility assessment". (1995). *Hum. Reprod.* 10 (Suppl 1): 53-59 18.
- [12] Vestergren J, Iguer-Ouada M, Onclin K. (2002). "Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice". *Theriogenology.* 57: 149-179.
- [13] Jurado S, Sarmiento P, Stornelli MA. (2008) "La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino". *Analecta Veterinaria.* 28(1): 7-14.
- [14] Oettlé EE, Soley JT. (1988). "Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopy study". *Vet. Med. Rev.* 59: 28-70.
- [15] Rodríguez-Martínez H, Ekwall H, Linde-Forsberg C. (1993). "Fine structure and elemental composition of fresh and frozen dog spermatozoa". *J. Reprod. Fertil.* 47: 279-285.
- [16] Liakatas J, Williams AE, Hargreave TB. (1982). "Scoring sperm morphology using the scanning electron microscope". *Fertil. Steril.* 38 (2): 227-232
- [17] Sterzik K, De Santo M, Uhlich S, Gagsteiger F, Strehler E. (1998). "Glass wool filtration leads to a higher percentage of spermatozoa with intact acrosomes: an ultrastructural analysis". *Hum. Reprod.* 13 (9): 2506-2511.
- [18] Crespilho AM, Landim-Alvarenga FC, Papa FO. (2006). "Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão". *Ciencia rural.*v. 36: 1507-1510.
- [19] Blotner S, Warnke C, Tuschscherer A, Heinen, V, Torner H. (2000) "Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season". *Animal Reproduction Science.* 25: 75-88
- [20] Slatter D., (1993) "Textbook of small animal surgery". Philadelphia. Saunders W, 2° ed. pp. 1325-1335.
- [21] Tittarelli CM, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli, MA, de la Sota RL. (2006) "Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline Epididymides". *Theriogenology* 66:1637-1640.