

UN CASO DE SUBFERTILIDAD ASOCIADO AL DEFECTO DAG EN UN PERRO

Jurado, S.B.^{1*}, Sarmiento, P.², Stornelli, M.A.^{3,4}

¹ Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

² Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido. Facultad Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata.

³ Instituto de Teriogenología, (4) Laboratorio Central, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

*Autor de correspondencia: sjurado@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN

Algunas causas de subfertilidad en el macho canino son concomitantes con la ocurrencia de morfoanomalías espermáticas. Ciertas anomalías morfológicas de la cola del espermatozoide se relacionan con alteración de la motilidad y pueden asociarse con defectos cromosómicos. El defecto Dag es una anomalía primaria de la cola y afecta la funcionalidad espermática. El objetivo de este trabajo es comunicar un caso de subfertilidad asociado al defecto Dag en un canino. La fracción espermática del eyaculado de un reproductor Ovejero Alemán de 4 años de edad con baja eficiencia reproductiva fue utilizada para la realización de un espermograma completo. La evaluación seminal de rutina mostró un bajo porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y una baja concentración espermática. El estudio de la morfología espermática mediante microscopía óptica permitió observar un gran número de espermatozoides con colas enrolladas mostrando una imagen compatible con la presencia de defecto Dag. A nivel ultraestructural, se observaron colas enrolladas alrededor del núcleo rodeadas por la membrana plasmática. También se hallaron varios cortes transversales de la pieza principal e intermedia envueltos por una membrana celular común. Los hallazgos obtenidos a partir de la evaluación rutinaria del semen permitieron arribar al diagnóstico presuntivo de subfertilidad asociada al defecto Dag. Estos hallazgos impulsaron el estudio ultraestructural de los espermatozoides del paciente. El análisis ultraestructural del semen de perro permitió confirmar la ocurrencia del defecto Dag hallado el 80% de los espermatozoides lo cual estaría asociado a la disfunción reproductiva del animal estudiado.

Palabras clave: subfertilidad - defecto Dag – canino

A SUBFERTILITY CASE ASSOCIATED TO A DAG DEFECT IN DOGS

SUMMARY

Male subfertility in dogs is usually coexistent with abnormal sperm morphology. Abnormal morphology of the sperm tail is related to motility changes that may be associated with chromosomal defects. The Dag defect is a primary abnormality of the tail that affects sperm function. The aim of this work is to report a case of male subfertility in a dog associated with the Dag defect. The sperm-rich fraction of an ejaculate from a 4-years-old German Shepard dog with known low reproductive efficiency was used to perform a complete spermogram. A light microscopy study of sperm morphology revealed a large number of spermatozoa with coiled tails images-Dag defect. The ultrastructural study showed coiled tails around the nucleus surrounded by the plasma membrane. Several transversal sections of principal- and middle-piece covered by a common cellular membrane were found. The routine spermogram allowed us to make a presumptive diagnostic of subfertility associated with the Dag defect. Furthermore, the ultrastructural study of the sperm cells, allowed us to confirm the occurrence of the Dag defect. This sperm abnormality was found in 80% of the spermatozoa of the ejaculate and could be associated with the subfertility of this male dog.

Keywords: subfertility - Dag defect- canine

INTRODUCCIÓN

Las alteraciones seminales que se relacionan con disminución de la capacidad fecundante son de suma importancia en animales utilizados como reproductores. El defecto Dag es una morfoanomalía espermática detectada en la pieza media y es una causa de esterilidad (1). Este defecto podría estar presente (<4%) en el semen

normal (2). Niveles superiores al 50 % pueden traer aparejados serios trastornos en la fertilidad (3). En los individuos que padecen esta tipo de alteración morfológica la capacidad de cópula y lívido es normal, aunque el recuento de espermatozoides es menor y la motilidad está disminuida.

Jurado *et al.*

Es bien conocida la importancia de la motilidad espermática como un indicador de la calidad del eyaculado canino (4). La astenozoospermia así como la morfoanomalías espermáticas pueden afectar la fertilidad de manera significativa (5). Las morfoanomalías espermáticas detectadas en el eyaculado pueden reflejar alteraciones ocurridas en el testículo o en el epidídimo y varían desde defectos morfológicos evidentes durante el espermograma de rutina, hasta defectos más sutiles solo observables mediante ultramicroscopía.

En los animales domésticos las anomalías espermáticas han sido asociadas con subfertilidad e infertilidad. El defecto Dag es una anomalía primaria que se produce durante la espermatogénesis, afecta la funcionalidad espermática y compromete la capacidad fecundante del semen de un reproductor (2). Este defecto está caracterizado por el plegamiento, enrollamiento y fractura de los elementos constitutivos de la parte distal de la pieza media del espermatozoide.

Según Olson y col (6), el defecto Dag es un defecto genético donde la morfología del axonema espermático aparece normal en el testículo y/o en la parte proximal del epidídimo, pero en la porción distal de la cola del epidídimo el espermatozoide exhibe un patrón similar a la desintegración axonómica. Los defectos espermáticos de origen genéticos son defectos específicos que han demostrado ser transmisibles a la descendencia y han sido asociados con variadas morfoanomalías (acrosoma “nudoso”, “arrugado” e incompleto; cabezas redondas, condensación anormal de la cromatina; anomalías de la pieza intermedia como defecto Dag, pseudogota o defecto de “tirabuzón”; defectos en la cola como disquinesia ciliar primaria) en distintas especies (Chenoweth, 2005).

Blom (1) fue uno de los primeros en describir el defecto Dag en el semen de dos toros hermanos subfértiles de la raza Jersey inmediatamente después de la madurez sexual, y observó colas enrolladas, dobladas y rotas que involucraron al 40-50% de las células. A nivel

Acta Microscópica, Vol. 13, Nos. 1 y 2, 2004, pp. 30-36

ultraestructural, las fibras axiales del flagelo eran anormales, estaban desplazadas o ausentes. Además, la cola enrollada estaba encerrada en una membrana celular común. El defecto involucró a la pieza principal de la cola más frecuentemente y a la pieza media sólo ocasionalmente. Más tarde, Koefoed y Pederson (7) confirmaron estos hallazgos.

Las anomalías morfológicas de la cola y del axonema del espermatozoide son una causa de astenozoospermia. Si bien muchas veces se asocia a defectos genéticos del flagelo, también puede ocurrir por procesos patológicos de otro origen. La deficiencia motriz del espermatozoide puede tener origen en el testículo, durante el paso de la célula espermática por el epidídimo o por efecto de otros elementos del plasma seminal (8). Si bien el defecto Dag puede detectarse mediante la microscopía óptica convencional, el estudio ultramicroscópico permite confirmar el diagnóstico. Mediante el microscopio electrónico se puede obtener información detallada a cerca de las alteraciones morfológicas que se producen en la estructura fina de los componentes espermáticos involucrados en la fertilidad (9). En el presente estudio se analizaron las características estructurales y ultraestructurales de los espermatozoides del eyaculado de un paciente canino con subfertilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animal

Se utilizó un reproductor Ovejero Alemán de 4 años de edad. El mismo fue derivado al Servicio de Reproducción Animal por presentar baja eficiencia reproductiva. En el examen físico general así como en el examen particular del aparato genital no se encontraron alteraciones. Para obtener información sobre la calidad de semen del reproductor se indicó la realización de un espermograma. La fracción espermática del eyaculado del paciente se obtuvo mediante masturbación (10; 11) y fue utilizada para la evaluación seminal.

Evaluación de semen

Con la muestra de semen obtenida se realizó:

1. Examen macroscópico: Volumen, color, aspecto.
2. Examen microscópico:
 - Concentración espermática total: se estimó con cámara de Neubauer haciendo una dilución 1:200 con solución fisiológica formolada. (12).
 - Motilidad individual: el semen fresco diluido con una gota de diluyente isotónico se colocó en un portaobjetos limpio a 37 °C, sobre el que se depositó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el tipo de movimiento individual (12).
 - Tinción supravital: se utilizó la tinción de eosina-nigrosina (12).
 - Morfología espermática: se utilizó microscopía de contraste de fase (13).
3. Pruebas bioquímicas: Fosfatasa Alcalina: se utilizó el método colorimétrico usando fenilfosfato de sodio como sustrato (12, 14)
4. Microscopía electrónica de barrido: La fracción espermática se diluyó en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4) y se fijó con glutaraldehído al 1 % durante 2 horas. 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 (Jeol Fine Coat 1100). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6360 LV.

Microscopía electrónica de transmisión

La fracción espermática se fijó en glutaraldehído al 2 % en buffer de fosfato (pH 7,2-7,4). Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y el pellet obtenido permaneció en el fijador durante 2 horas a 4 °C. La fijación

Acta Microscópica, Vol. 13, Nos. 1 y 2, 2004, pp. 30-36
secundaria se realizó con tetróxido de osmio al 1 % durante 1 hora a 4 °C y posteriormente, se deshidrató en una serie creciente de alcoholes y se incluyó en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (90 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y fueron examinados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (Jeol).

RESULTADOS

El volumen de la fracción espermática del eyaculado fue de 1,5 ml, el aspecto opalescente y el color blanquecino. Los datos obtenidos en el espermograma mostraron un bajo porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (20 %) y una baja concentración espermática total (50 x 10⁶/espermatozoides/ml). El valor de fosfatasa alcalina obtenido fue de 10.000 U/L, lo cual permitió establecer que el paciente no presentaba un cuadro de obstrucción ductal unilateral.

El estudio de la morfología espermática mediante microscopía óptica permitió observar un 80% de espermatozoides con colas enrolladas alrededor de si mismas o alrededor de la cabeza espermática mostrando una imagen compatible con la presencia de defecto Dag (Fig. 1).



Fig. 1. Defecto Dag (x100).

A nivel ultraestructural, las células espermáticas mostraron defecto Dag como anomalía predominante. Se observaron espermatozoides con colas enrolladas envueltas por una misma membrana (Fig. 2) y colas enrolladas alrededor del núcleo rodeadas por la membrana plasmática (Fig. 3). También se hallaron

varios cortes transversales de la pieza principal e intermedia envueltos por una membrana celular común (Fig. 4).

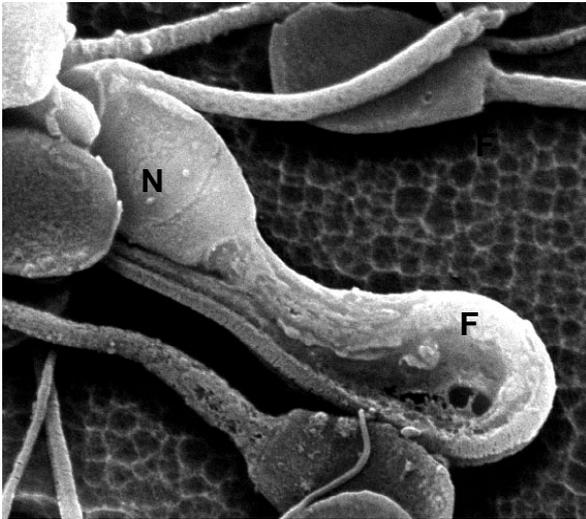


Figura 2- Se observa un espermatozoide con la cola enrollada envuelta por una misma membrana. N: núcleo, F: flagelo (x 4500).

CONCLUSIONES

Las observaciones de la célula espermática a nivel estructural y ultraestructural revelaron que el 80% los espermatozoides del reproductor canino evaluado presentaron defecto Dag. Las alteraciones observadas permitieron establecer una estrecha relación entre los defectos morfológicos espermáticos y la subfertilidad del reproductor evaluado.

La presencia de un defecto monomórfico específico en el semen de pacientes con trastornos de fertilidad se correlaciona con morfoanomalías de origen genético. En animales consanguíneos aumenta la probabilidad de aparición de este tipo de anomalías (2, 15). Es necesario diferenciar el defecto Dag del enrollamiento de la cola detrás de la cabeza por otras causas. Mientras que el defecto Dag podría tener bases hereditarias (2), el enrollamiento del flagelo estaría causado por ciertas condiciones del medio ambiente (el pH y la composición química de los fluidos del tracto seminal) asociadas a dietas ricas en zinc (16, 17). En concordancia con lo

postulado por Blom y Wolstrup (16), Otros investigadores (6) han establecido que dietas pobres en nutrientes esenciales como el selenio podrían inducir la reducción o pérdida de la motilidad y exhibir defectos flagelares localizados primariamente en la pieza media.

En estudios realizados por Blom y Wolstrup (16) se indicó que la destrucción del aparato motor en la cola espermática (defecto Dag) en toros de la raza Jersey estaría relacionada a una condición bioquímica anormal asociada con niveles elevados de zinc en el espermatozoide y en un menor grado al plasma seminal. Además, señalaron que el daño sería infligido cuando la gota citoplasmática proximal cambia a la posición distal.

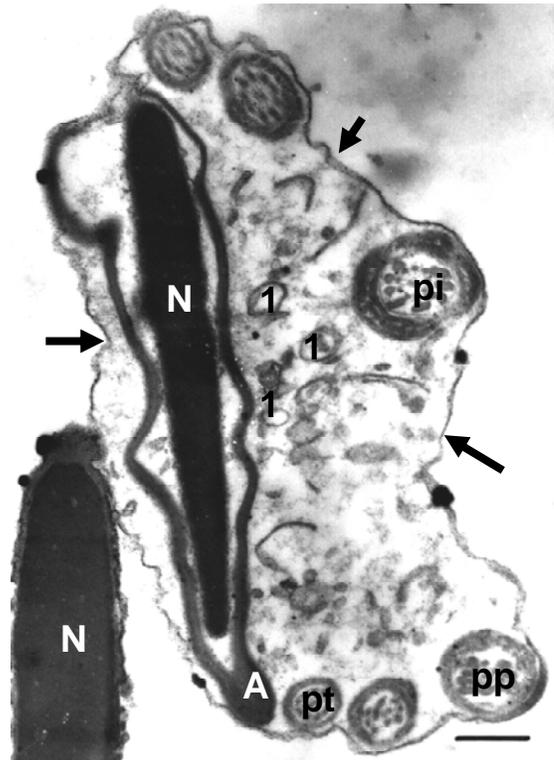


Fig. 3. Defecto Dag: caracterizado por el enrollamiento de la cola alrededor de la cabeza envuelta por una membrana plasmática intacta (flechas). Se observa el acrosoma (A) desprendido y material membranoso (1) en el citoplasma. Se distinguen cortes transversales de la pieza intermedia (pi), pieza principal (pp) y pieza terminal (pt) con diferente grado de distorsión de la arquitectura normal del axonema. N: núcleo (Barra= 500 nm).

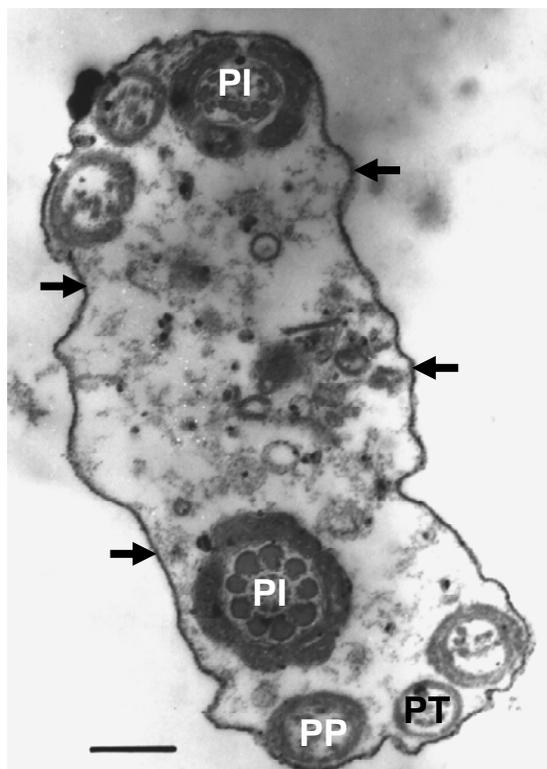


Fig. 4. Diferentes segmentos de la cola envueltos por una membrana plasmática común (flechas). PI: pieza intermedia, PP: pieza principal, PT: pieza terminal (Barra= 500 nm).

También se sugirió que la migración defectuosa de la gota citoplasmática durante la maduración epididimaria podría estar asociada con la patogénesis del defecto Dag en cerdos (18).

En el defecto Dag los espermatozoides muestran la cola enrollada alrededor de sí misma o alrededor de la cabeza. Suzuki-Toyota y col (19) sugirieron que el enrollamiento del flagelo alrededor de la cabeza del espermatozoide se relacionaría con la migración de la gota citoplasmática cuando la formación del anillo posterior es defectuosa o está ausente. Ese anillo es una estructura anular que se encuentra en la cabeza del espermatozoide, posterior a la vaina postacrosomal, el cual une la membrana plasmática espermática a la envoltura nuclear (20). Por lo tanto, al faltar el anillo posterior, el núcleo se mueve junto con la gota citoplasmática cuando ésta se desplaza distalmente. Como consecuencia, el núcleo aparece dentro de la gota

citoplasmática y la forma resultante es la cola enrollada alrededor del núcleo (19).

Si bien se puede inferir que el defecto Dag detectado en los espermatozoides eyaculados del reproductor canino analizado podría tener un origen genético, también se lo podría asociar a trastornos en la funcionalidad epididimaria. Se ha sugerido que en el epidídimo habría un control de la calidad espermática, ya que la ubiquitina secretada por el epitelio epididimario se une a la superficie de los espermatozoides defectuosos (21) y muchos de esos espermatozoides ubiquitinados son fagocitados por las células epiteliales del epidídimo (22). Sutovsky y col (23) proponen que las colas enrolladas son el blanco primario de la ubiquitina epididimaria. La elevada cantidad de espermatozoides con defecto Dag detectada en el eyaculado estudiado podría evidenciar la falta de control ejercido por el epidídimo.

Las alteraciones submicroscópicas de la estructura citoesquelética del flagelo espermático están asociadas con una motilidad reducida o completamente ausente en animales subfértiles o infértiles (15). Estos elementos flagelares juegan un rol clave al permitir que los espermatozoides se muevan efectivamente en dirección anterógrada (9). Al estar partidos los componentes del axonema o el flagelo enrollado y envuelto por una membrana plasmática común, como se observó en el semen del reproductor evaluado, es imposible que estos espermatozoides se muevan en forma progresiva y logren fecundar un óvulo. El bajo recuento espermático, el bajo porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y el alto porcentaje de espermatozoides con defecto Dag presentes en el semen del macho estudiado indicarían que el animal no podría ser utilizado como reproductor. Si bien este animal podría llegar a tener descendencia se debe tener en cuenta la posible heredabilidad de este defecto lo cual sería motivo para desalentar la utilización de este semen para lograr descendencia (24).

La implementación del examen ultraestructural de la célula espermática depende de los datos obtenidos

Jurado *et al.*

mediante microscopía óptica y del diagnóstico presuntivo al cual se arriba. Así mismo la cuantificación de las alteraciones ultraestructurales es necesaria para estimar la influencia de la anomalía en la capacidad reproductiva del macho (25).

Los hallazgos obtenidos a partir de la evaluación rutinaria del semen permitieron arribar al diagnóstico presuntivo de subfertilidad asociada al defecto Dag en el paciente. El análisis ultraestructural del semen permitió confirmar que el defecto Dag hallado en la mayoría de los espermatozoides sería el responsable de la disfunción reproductiva del animal estudiado.

AGRADECIMIENTOS

En la realización de este trabajo se contó con la colaboración del Ht. Silvio Igal del Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

REFERENCIAS

- [1] Blom E. (1966) "A new sterilizing and hereditary defect (the 'dag' defect) located in the bull sperm tail". *Nature* 209: 739-740.
- [2] Chenoweth P. (2005) "Genetic sperm defects". *Theriogenology* 64:457-468.
- [3] Barth A., Oko R. (1989) "Abnormal morphology of bovine spermatozoa". *Can Vet J*, 27:379-384.
- [4] Rigau T., Farre M., Ballester J., Mogas T., Pena A., Rodriguez-Gil J.E. (2001) "Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates". *Theriogenology* 56(5):801-15.
- [5] Pesch S., Bostedt H., Failing K., Bergmann M. (2006) "Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy". *Anim Reprod Sci* 91(3-4):285-98.
- [6] Olson G., Winfrey V., Hill K., Burk R. (2004) "Sequential development of flagellar defects in

Acta Microscópica, Vol. 13, Nos. 1 y 2, 2004, pp. 30-36

- spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats". *Reproduction* 127: 335-342.
- [7] Koefoed-Johnsen H., Pedersen H. (1971) "Further observations on the Dag-defect of the tail of the bull spermatozoon". *J Reprod Fertil* 26: 77-83.
- [8] Gopalkrishnan K., Padwal V., D'Souza S., Shah R. (1995) "Severe asthenozoospermia: a structural and functional study". *Int J Androl. 18 Suppl* 1:67-74.
- [9] Pei J., Strehler E., Noss U., Abt M., Piomboni P., Baccetti B., Sterzik K. (2005) "Quantitative evaluation of spermatozoa ultrastructure after acupuncture treatment for idiopathic male infertility". *Fertility and Sterility* 84(1): 141-147.
- [10] Andersen K. (1980) "Artificial insemination and storage of canine semen". *Morrow Reproductive Diseases in Animals*. W.B. Saunders, Philadelphia, PA. pp 661-665.
- [11] Fastford W (1996) "Semen cryopreservation in dogs and foxes". *Anim. Reprod. Sci.* 42: 251-260.
- [12] Johnston S.D. (1991) "Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital". *Clin. North. Am. Small. Anim. Pract* 21:545-551.
- [13] Pursel V.G., Jonshon L.A. (1974) "Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation". *Theriogenology* 1 (2): 63-68.
- [14] Stornelli M.A., Arauz M., Baschard H., De la Sota R.L. (2003) "Unilateral and bilateral vasectomy in the dog: Alkaline Phosphatase as an Indicator of Tubular Patency". *Reproduction in Domestic Animals* 38 (1): 1-4.
- [15] Baccetti B., Capitani S., Collodel G., Di Cairano G., Gambera L., Moretti E., Piomboni P. (2001) "Genetic sperm defects and consanguinity". *Hum Reprod.* 16(7):1365-71.
- [16] Blom E., Wolstrup C. (1976) "Zinc as a possible causal factor in the sterilizing sperm tail defect, in Jersey bulls". *Proceeding of the VIIIth International Congress Anim Reprod an AI*, vol. IV pp 690-693.

- [17] Schepers G., Wolbag H. (1986) "The phenomenon of coiled spermatozoan tail". *Andrologia* 18(4):341-52.
- [18] Holt W.Y. (1982) "Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar". *J Reprod Fertil* 64(2):485-9.
- [19] Suzuki-Toyota F., Ito C., Toyama Y., Maekawa M., Yao R., Noda T., Toshimori K. (2004) "The coiled tail of the round-headed spermatozoa appears during epididymal passage in GOPC-deficient mice". *Arch Histol Cytol* 67 (4): 361-371.
- [20] Mortimer D (1994) *Practical Laboratory Andrology (Hardcover)*. New York, Oxford. Oxford University Press pp 159-174.
- [21] Kirchhoff C., Krull N., Pera I., Ivell R. (1993) "A major mRNA of the human epididymal principal cells, HE5, encodes the leucocyte differentiation CDw52 antigen peptide backbone". *Mol Reprod Dev.* 34(1):8-15.
- [22] Lasserre A., Barrozzo R., Tezón J., Miranda P., Vazquez-Levin M. (2001) "Productos génicos epididimarios asociados a los procesos de maduración espermática, unión espermatozoide-zonapélucida y fusión entre gametas". *Revista Argentina de Andrología* 1: 3- 14.
- [23] Sutovsky P., Terada Y., Schatten G. (2001) "Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility". *Hum Reprod* 16(2):250-8.
- [24] Oettlé E.E., Soley J.T. (1988) "Sperm abnormalities in the dog: a light and electron microscopy study". *Vet Med Rev* 59 28-70.
- [25] Dadoune J.P. (1988) "Ultrastructural abnormalities of human spermatozoa". *Human Reprod* 3(3):311-8.