IDENTIFICACIÓN DE SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS CON PATRONES DE MOVIMIENTO ESPECÍFICOS EN EYACULADOS DE TOROS HOLSTEIN. INFLUENCIA DE LA CRIOPRESERVACIÓN

Muiño[1] R., Tamargo[2] C., Hidalgo[2] C.O., Peña[1]A.I.
[1] Unidad de Reproducción y Obstetricia, Facultad de Veterinaria de Lugo (USC), 27002, Lugo. España. rodrigomuino@colvet.es
2 Área de Selección y Reproducción Animal (SERIDA), 33203, Gijón, Asturias, España.

INTRODUCCIÓN

El uso de los sistemas CASA (Computer automated analyzer system) proporciona toda una serie de datos relativos a la velocidad y trayectoria de cada espermatozoide individual y ello permite identificar la existencia de subpoblaciones espermáticas con distintos patrones de movimiento que coexisten en la misma muestra de semen (Davis et al., 1995; Holt, 1996; Abaigar et al., 1999), lo cual es una visión más real que la motilidad media de la muestra, puesto que un eyaculado está constituido por una población heterogénea de espermatozoides. Existen numerosas evidencias de la existencia de subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de varias especies de mamíferos (Holt, 1996; Abaigar et al., 1999; 2001; Quintero-Moreno et al., 2003; 2004). Además, se ha observado que espermatozoides pertenecientes a distintas subpoblaciones responden de forma diferente ante procesos como la criopreservación o la exposición al efecto de agentes capacitantes (Holt, 1996; Abaigar et al., 1999). La presencia de estas subpoblaciones podría sugerir la existencia de alguna relación entre cambios en la estructura subpoblacional de una muestra de semen y su capacidad fecundante, pero esto todavía no se ha demostrado. Los objetivos de este estudio fueron:

Determinar la existencia de diferentes subpoblaciones espermáticas con patrones de movimiento específicos en eyaculados de toros Holstein: a) determinar la frecuencia de distribución de los espermatozoides en las distintas subpoblaciones; b) evaluar el efecto de la criopreservación del semen sobre la incidencia de las distintas subpoblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 54 eyaculados procedentes de 9 toros Holstein (6 eyaculados por toro). Tras una valoración inicial de los eyaculados, se tomó una alícuota de semen fresco y se diluyó con Bioxcell® (IMV, L'Aigle, Francia) hasta obtener una concentración aproximada de 40 x 10^6 esp/ml, esta dilución fue utilizada para analizar la motilidad mediante el sistema CASA. Se valoró la motilidad total y se obtuvieron 8 parámetros cinéticos individuales que describían el movimiento de cada espermatozoide en particular: VCL (velocidad curvilínea), VSL (velocidad rectilínea), VAP (velocidad media), LIN (índice de linealidad), STR (índice de rectitud), WOB (índice de oscilación), ALH (amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza) y BCF (frecuencia de batida de la cabeza). De cada eyaculado se descongelaron 3 pajuelas simultáneamente, se mezcló su contenido en un tubo de 5 ml, y se mantuvo en incubación a 37ºC durante 4 h. Al cabo de 0, 2 y 4 h de incubación, se tomó una alícuota y se analizó de nuevo la motilidad espermática mediante el sistema CASA.

Los datos de la motilidad espermática obtenidos de la evaluación de 54 eyaculados (9 toros x 6 eyaculados) y de 162 muestras de semen congeladas (9 toros x 6 eyaculados x 3 evaluaciones en el tiempo) fueron importadas como un único dato que representaba un total de 16.740 espermatozoides, cada uno definido por 8 parámetros descriptores de movimiento. Se realizó un análisis de clusters multivariante, utilizando el procedimiento k-medias. Dicho modelo utiliza distancias euclídeas calculadas a partir de las variables cuantitativas especificadas (en este caso los parámetros cinéticos) para separar el total de las observaciones en un número reducido de clusters.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el análisis de clusters multivariante realizado sobre 16.740 espermatozoides se identificaron cuatro subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento (Tabla

1). Los resultados de este estudio demostraron que en eyaculados bovinos, al igual que en los de otras especies de mamíferos, se pueden diferenciar varias subpoblaciones espermáticas con distintos tipos de movimiento. Tanto en semen fresco como en congelado se identificaron 4 subpoblaciones espermáticas determinadas en base a 8 parámetros cinéticos. La subpoblación 1 estaba constituida por espermatozoides con una velocidad moderada pero de trayectoria muy progresiva, mientras que la subpoblación 2 estaba representada por espermatozoides con un movimiento muy activo pero no progresivo. Esta subpoblación 2 podría considerarse con un movimiento similar a la hipercinesis. La subpoblación 3 incluía espermatozoides que mostraban muy baja velocidad y trayectoria no progresiva Y por último, la subpoblación 4 estaba constituida por aquellos espermatozoides con movimiento más rápido y progresivo.

El porcentaje de espermatozoides en cada subpoblación varió significativamente ($p<0.01$) con la criopreservación del semen (Gráfico 1). En eyaculados frescos el 34,1% de los espermatozoides formaba parte de la subpoblación 4, pero tras la descongelación, solo el 20,6% de los espermatozoides fue asignado a esta subpoblación, y tras 2 y 4 h de incubación post-descongelación, esta subpoblación sólo estuvo representada por un 15,2% y un 7,3% del total de espermatozoides. Por el contrario, la subpoblación 3, que en eyaculados frescos representaba al 10,7% del total de los espermatozoides, tras la criopreservación, se incrementó hasta un 27,2%. El porcentaje de espermatozoides asignado a la subpoblación 1, sin embargo, no varió de forma significativa con la congelación o durante la incubación post-descongelación.

Los cambios (inducidos por la criopreservación) en la frecuencia de distribución de las distintas subpoblaciones fueron bastante similares para los nueve toros del estudio, y las diferencias entre indivíduos quedaron establecidas casi exclusivamente por el porcentaje de espermatozoides asignados a la subpoblación 4, tanto en semen fresco, tras la descongelación, o durante la incubación post-descongelación. Además, se encontró una correlación significativa ($p<0.01$) entre la proporción de espermatozoides asignada a la subpoblación 4 en los eyaculados frescos y esa subpoblación en semen congelado a las 0 ($r=0.473$), 2 ($r=0.513$) y 4 h postdescongelación ($r=0.450$). Ello indicó que los eyaculados que contenían la mayor proporción de espermatozoides rápidos y progresivos fueron también los de mayor resistencia a la congelación y los que mostraron mayor longevidad post-descongelación. Resultados similares se encontraron también en eyaculados humanos (Davis et al., 1995) y de perros (Nuñez-Martínez et al., 2006a y b) y se ha sugerido que los espermatozoides que pertenecen a los clusters de mayor velocidad y con movimiento más progresivo pueden ser considerados los de mayor capacidad fecundante (Quintero-Moreno et al., 2003; Cremades et al., 2005; Nuñez-Martínez et al., 2006).

Tabla 1. Valores medios (rangos) de los parámetros cinéticos que definen las 4 subpoblaciones identificadas en muestras de semen fresco y congelado.

Parámetros cinéticos	Subpoblaciones espermáticas			
	1	2	3	4
Nº spz (%)	3880 (23.2)	2688 (16.0)	5937 (35.5)	4235 (25.3)
VCL (µm/s)	70.1 a	118.4 b	29.5 c	131.0 d
VSL (µm/s)	48.3 a	44.6 b	8.9 c	95.6 d
VAP (µm/s)	54.3 a	76.8 b	15.0 c	107.5 d
LIN (%)	69.8 a	38.1 b	31.4 c	73.9 d
STR (%)	88.9 a	59.4 b	59.2 b	89.1 a
WOB (%)	78.2 a	65.4 b	51.5 c	82.8 d
ALH (µm)	2.3 a	4.6 b	1.5 c	3.7 d
BCF (Hz)	9.0 a	7.6 b	5.0 c	9.5 d

a, b, c, d: las diferentes letras indicaron diferencias significativas entre subpoblaciones ($P<0.05$).

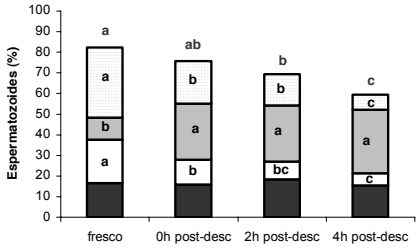


Gráfico 1: Frecuencia de distribución de espermatozoides móviles (porcentaje medio n=54) dentro de las subpoblaciones (1 columna negra, 2 columna blanca, 3 columna gris y 4 columna punteada) en semen fresco y congelado

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., Del Barrio, G., 1999. Biol. Reprod. 60, 32-41.
Abaigar, T., Cano, M., Pickard, A.R., Holt, W.V. 2001. Reproduction 122, 265-273.
Cremades, T., Roca, J., Rodríguez-Martínez, H., Abaigar, T., Vázquez, J.M., Martínez, E.A. 2005. J. Androl. 26, 610-618.
Davis, R.O., Drobnis, E.Z., Overstreet, J.W. 1995. Fertil. Steril. 63, 1051-1057.
Holt, W.V., 1996. Reprod. Dom. Anim. 31, 17-24.
Nuñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006a. Reprod. Dom. Anim. 41, 408-415.
Nuñez-Martínez, I., Moran, J.M., Peña, F.J., 2006b. J. Androl. 27, 596-603.
Quintero-Moreno, A., Miró, J., Rigau, A.T., Rodríguez-Gil, J.E., 2003.Theriogenology 59,1973-1990.
Quintero-Moreno, A., Rigau, T., Rodríguez-Gil, J.E., 2004. Theriogenology 61, 673-690.

IDENTIFICATION OF SPERM SUBPOPULATIONS WITH DEFINED MOTILITY PATRON IN EJACULATES FROM HOLSTEIN BULLS: INTERACTION OF CRYOPRESERVATION.

ABSTRACT: Six ejaculates were collected from each of 9 Holstein bulls and cryopreserved following a standard protocol. Overall sperm motility and the individual kinematic parameters of motile spermatozoa, determined using a CASA system, were evaluated before freezing and after 0, 2 and 4 h of post-thaw incubation at 37ºC. Data from 16,740 motile spermatozoa, defined by VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH and BCF, were analysed using a multivariate clustering procedure to identify and quantify specific subpopulations within the semen samples. The statistical analysis clustered all the motile spermatozoa into four separate subpopulations with defined patters of movement: Subpopulation (Subp.) 1) moderately slow but progressive spermatozoa (23.2%), Subp. 2) highly active but non-progressive spermatozoa (16.0%), Subp. 3) poorly motile non-progressive sperm (35.5%), and Subp. 4) highly active and progressive sperm (25.3%). Subpopulations 2 and 4 significantly ($P<0.01$) decreased during cryopreservation and post-thaw incubation (Subp. 2: 21.1%, 18.1%, 8.7% and 5.9%; and Subp. 4: 34.1%, 20.6%, 15.2% and 7.3%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw) whereas Subp. 3 significantly ($P<0.01$) increased (10.7%, 27.2%, 27.2% and 30.7%, respectively, for fresh, 0, 2 and 4 h post-thaw). The frequency distribution of spermatozoa within subpopulations was quite similar for the 9 bulls, either in fresh or frozen-thawed semen, and differences among bulls were mainly due to differences in the Subp. 4. Significant correlations ($P<0.01$) were found between the proportions of spermatozoa assigned to Subp. 4 in the fresh ejaculates and those in frozen-thawed semen after 0 ($r=0.473$), 2 ($r=0.513$) and 4 h post-thaw ($r=0.450$). This indicated that the ejaculates with the highest subpopulations of rapid and progressive sperm were also the most resistant to cryopreservation and showed the best post-thaw sperm longevity.

Key words: *bull semen, cryopreservation, kinematic parameters, sperm subpopulations.*