LA SELECCIÓN ESPERMÁTICA EN EL ÚTERO DE LA CERDA ESTÁ INFLUENCIADA POR LA CALIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES: ANÁLISIS DEL REFLUJO

Soriano-Úbeda[1], C., Hernández-Caravaca[1,2], I., Izquierdo-Rico[3], M.J., Matás[1], C. y García-Vázquez[1], F.A.

[1]Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus *Mare Nostrum*, 30100 Murcia., [2]Boehringer-Ingelheim España, S.A. [3] Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus *Mare Nostrum*, 30100, Murcia. fagarcia@um.es

INTRODUCCIÓN

En la especie porcina, durante la cubrición o inseminación artificial (IA) millones de espermatozoides (spz) son depositados en el tracto reproductor de la hembra, pero sólo unos miles llegan al lugar de fecundación y finalmente uno de ellos es el que fecunda al ovocito. Los espermatozoides sufren una serie de mecanismos selectivos a su paso por el tracto genital femenino, responsables de eliminar espermatozoides inmaduros y/o dañados no aptos para fecundar (Suarez, 2007). Por tanto, aquellos espermatozoides que sean funcional y morfológicamente normales serán los que alcancen el oviducto. Entre los mecanismos conocidos de eliminación de espermatozoides en el tracto genital femenino se encuentra la fagocitosis (mediante polimorfonucleares) y el reflujo que tiene lugar tras la inseminación o monta. Se ha comprobado que tras la IA un 15-25% de los espermatozoides son eliminados en el reflujo (Hernández-Caravaca et al., 2012), aunque todavía no se ha determinado si la eliminación de espermatozoides mediante este mecanismo se produce de manera aleatoria o es un proceso selectivo.

El objetivo de este trabajo fue el estudio de la calidad de las subpoblaciones espermáticas en el reflujo a diferentes tiempos tras la IA en la especie porcina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación de las dosis seminales: Se utilizaron dosis de inseminación procedentes de machos reproductores (Duroc) de fertilidad probada. Las dosis de inseminación (DI) estaban formadas por la mezcla en iguales proporciones de 750 x 10^6 spz/12,5 ml de la dosis original (DO) conteniendo espermatozoides de alto porcentaje de motilidad (>70% spz mótiles) con 750 x 10^6 spz/12,5 ml marcados con una tinción vital fluorescente a base de bisbencimida (Hoechst 33342) y clasificados según su motilidad (ALTA: >70%; MEDIA: 35-70%; BAJA: <35%).

*Tinción de las muestras: S*e procedió a la incubación de las muestras durante 10 min en oscuridad y a temperatura ambiente con 5 mg/ml de bisbencimida por cada 100 x 10^6 spz. Posteriormente, se realizó una centrifugación de las muestras a 500g durante 5 min para eliminar el exceso de tinción. Tras la retirada del sobrenadante se resuspendió de nuevo en diluyente (BTS) hasta la concentración inicial. Por último, se clasificaron las muestras según su motilidad tal y como se ha descrito anteriormente (ALTA, MEDIA, BAJA).

Inseminación artificial: Se inseminaron un total de 25 cerdas (Landrace x Large White) distribuidas en los 3 grupos experimentales [ALTA (n=8), MEDIA (n=8) y BAJA (n=9]. A las 24 h post-detección del celo, se procedió a la inseminación post-cervical utilizando un catéter combinado con una cánula interna (Soft & Quick®, Import-Vet S.A., España) y con DI de 1500 x 10^6 spz/25 ml [50% spz no teñidos motilidad alta + 50% spz teñidos (motilidad ALTA, MEDIA o BAJA)].

Recogida de reflujos y análisis espermático: Inmediatamente tras la inseminación de las cerdas, se les colocó una bolsa de colostomía humana fijada firmemente alrededor de la vulva. De estas bolsas se recogió el reflujo seminal a diferentes tiempos post-inseminación: 0-15 min, 16-30 min y 31-60 min. Las muestras contaminadas con orina se eliminaron del

experimento. Una vez en el laboratorio y mediante microscopía de fluorescencia (UV) se determinó el porcentaje de espermatozoides teñidos de la DI (control) y de cada uno de los reflujos recogidos a diferentes tiempos en los 3 grupos experimentales. Al menos se contabilizaron 200 espermatozoides en cada reflujo por tiempo y cerda.

Análisis estadístico: El análisis estadístico de los datos (expresados como la media ± error estándar) se realizó con el programa informático SPSS v.15, mediante un análisis ANOVA de una vía y un test de *Tukey* de comparaciones múltiples con un nivel de significación $p<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 quedan reflejados los porcentajes de espermatozoides teñidos recogidos en el reflujo en diferentes periodos (0-15, 16-30, 31-60 min) en los distintos grupos de inseminación utilizados (ALTA, MEDIA y BAJA). En los primeros momentos tras la inseminación (0-15 min), los espermatozoides observados en el reflujo se encontraban en igual proporción (% de teñidos y no teñidos) en las cerdas inseminadas independientemente de la calidad inicial del grupo experimental utilizado. Sin embargo, en el reflujo recogido en momentos más avanzados post-inseminación (16-30 min) el porcentaje de espermatozoides teñidos fue significativamente superior en aquellas cerdas inseminadas con dosis de menor calidad (ALTA: 54,47%; MEDIA 73,78%; BAJA: 83,57%, $p<0,05$). Finalmente, en el último periodo recolectado (31-60 min post-inseminación) la mayor parte de espermatozoides teñidos de los reflujos pertenecían a dosis de inseminación BAJA y MEDIA (89,85% y 84,27%, respectivamente), en comparación con las cerdas inseminadas con espermatozoides teñidos de ALTA calidad (59,37%, $p<0,05$).

Estos resultados nos muestran el efecto que el útero ejerce sobre los espermatozoides según transcurre el tiempo post-inseminación. Estos datos nos indican que inicialmente no existe un proceso selectivo como tal, sino que los espermatozoides son eliminados al exterior en el reflujo ayudados por las contracciones uterinas y con independencia de su calidad. Conforme transcurre el tiempo post-inseminación, el útero comienza a ejercer un efecto selectivo específico sobre los espermatozoides, seleccionando aquellos con mejor calidad para continuar en su trayecto por el tracto genital de la hembra y descartando aquellos menos competitivos en el reflujo (Hernández-Caravaca et al., 2012), llegando a eliminar a los 60 min post-inseminación la mayor parte de la subpoblación de espermatozoides con un bajo porcentaje de motilidad.

La retención de espermatozoides en el útero podría servir como efecto protector de los espermatozoides viables frente a su eliminación en el reflujo (Taylor et al., 2008). Se ha demostrado que espermatozoides adheridos al epitelio uterino tienen una ultraestructura normal y una mayor viabilidad que aquellos que se encuentran en el lumen (Rodríguez-Martínez et al., 2009; Taylor et al., 2008, 2009) y por tanto, estos últimos son más susceptibles de ser eliminados mediante el reflujo a través de las contracciones uterinas.

En conclusión, tras la IA se produce en el útero de la especie porcina una selección de aquellos espermatozoides más aptos para alcanzar el lugar de fecundación, desechando en el reflujo aquellos menos válidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Hernández-Caravaca, I., Izquierdo-Rico, M.J., Matás, C., Carvajal, J.A., Vieira, L., Abril, D., Soriano-Úbeda, C., García-Vázquez, F.A. 2012. Anim. Reprod. Sci. 136: 14-22. • Rodríguez-Martínez, H., Nicander, L., Viring, S., Einarsson, S., and Larsson, K. 1990. Anatomia, Histologia, Embryologia. 19: 16–36. • Suarez, S. S. 2007. Reprod Fertil Dev. 19: 103–110. • Taylor, U., Rath, D., Zerbe, H., Schuberth, H.J. 2008. Reprod. Domest. Anim. 43: 166-175. • Taylor, U., Schuberth, H. J., Rath, D., Michelmann, H. W., Sauter-Louis, C., Zerbe, H. 2009. Reprod Dom Anim. 44: 180–188. •

Agradecimientos: Este estudio ha sido posible gracias a la colaboración de la granja Agropecuaria-La Fontana S.A. (Murcia) (especialmente su propietario D. Francisco Vera) y la Granja de la Universidad de Murcia. Nuestro agradecimiento a la empresa IMPORT-VET S.A., especialmente a D. Pedro José Llamas por su asesoramiento técnico.

Tabla 1. *Porcentaje medio de espermatozoides teñidos en las muestras de reflujo recogidas a diferentes tiempos de cerdas inseminadas con DI obtenidas de la mezcla de espermatozoides no teñidos con dosis teñidas de ALTA, MEDIA y BAJA motilidad espermática. Diferentes superíndices (^{a,b,c}) en una misma columna indican diferencias significativas.*

		% espermatozoides teñidos recogidos en el reflujo tras IA		
Motilidad subpoblación espermática	**Nº cerdas inseminadas**	**0-15 min**	**16-30 min**	**31-60 min**
ALTA	8	48,81±2,68	54,47±2,60^{a}	59,37±2,46^{a}
MEDIA	8	55,29±5,05	72,78±2,53^{b}	84,27±2,29^{b}
BAJA	9	55,45±3,23	83,57±2,87^{c}	89,85±2,40^{b}

SPERM SELECTION IN UTERUS IS INFLUENCED BY SPERM QUALITY: A BACKFLOW STUDY

ABSTRACT: The aim was to examine the way in which spermatozoa are selected by the uterus after artificial insemination. In total, 25 sows were post-cervical inseminated ($1500x10^6$ spz/25ml) using 3 different sperm doses: 1) HIGH motility: 50% of the sperm not stained and with high motility (>70%) + 50% of the sperm stained (with Hoechst 33342) with high motility (>70%); 2) MEDIUM motility: 50% of the sperm not stained with high motility (>70%) + 50% of the sperm stained with medium motility (35-70%); 3) LOW motility: 50% of the sperm not stained with high motility (>70%) + 50% of the sperm stained with low motility (<35%). Backflow was collected at different times after insemination (0-15, 16-30 and 31-60 min) and % of stained sperm was determined using fluorescence microscope (UV). The results showed that during the first moments after insemination (0-15 min) the uterus performs an indiscriminate removal (measure in the backflow) of sperm regardless of their motility (HIGH: 48.81; MEDIUM: 55.29; LOW: 55.45%). During 16-30 and 31-60 min intervals the majority of sperm in backflow were stained in MEDIUM (73.78 and 84.27%, respectively) and LOW (83.57 and 89.85%, respectively) groups but not in the HIGH one (54.47 and 59.37%). The uterus sperm selection is not specific during the first moments after insemination, but later the uterus selects those sperm with better motility, discarding those less competitive in the backflow.

Keywords: Backflow, sperm, porcine, uterine selection.