UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN MORUECOS DE ALTA Y BAJA FERTILIDAD EN CAMPO

Yániz, J.L., Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Sánchez-Nadal, J.A. , Santolaria, P.
Grupo de investigación TECNOGAM, Instituto IUCA, Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N 22071 Huesca. jyaniz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

La capacidad predictiva de los análisis de calidad seminal sobre la fertilidad potencial de machos y eyaculados debe mejorarse. La información incompleta proporcionada por el análisis está detrás de esta capacidad restringida para lograr predicciones precisas. En este sentido, aunque la existencia de las subpoblaciones de espermatozoides en el eyaculado es ampliamente reconocida (Holt y Van Look, 2004), la mayoría de estudios han abordado el análisis de la relación entre los parámetros de calidad seminal y la fertilidad del macho basándose en datos medios. El interés en las subpoblaciones espermáticas proviene de la evidencia creciente de que la heterogeneidad de las mismas puede tener relevancia funcional y relacionarse con la fertilidad (de Paz et al., 2011; Ramón et al., 2013). Teóricamente, una mayor heterogeneidad de espermatozoides garantizaría mayor potencial para fecundar un ovocito a intervalos impredecibles después de la eyaculación (Curry, 2000).

En el morueco, algunos estudios han descrito la existencia de subpoblaciones morfométricas y cinéticas. Sin embargo, que sepamos, solamente hay un estudio en el que se evaluó la posible asociación entre las subpoblaciones morfométricas y la fertilidad (de Paz et al., 2011) y ninguno que haya evaluado este aspecto en lo referente a las subpoblaciones cinéticas en esta especie. En un trabajo reciente en ovino, describimos una relación entre varios parámetros de calidad seminal, utilizando los valores medios, y la fertilidad en campo en ovino (Vicente-Fiel et al., 2014). El objetivo del presente estudio fue investigar si las diferencias en la fertilidad de los moruecos se relacionan con la estructura poblacional de los espermatozoides. Además se estudió la posible asociación entre las subpoblaciones cinéticas y morfométricas por primera vez en esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

El semen se recogió semanalmente con la ayuda de una vagina artificial de 8 moruecos adultos de la raza Rasa Aragonesa, 4 de alta y 4 de baja fertilidad en campo, durante 6 semanas consecutivas. Se estableció una rutina de recogida del semen de dos veces por semana, aunque solo se utilizó un eyaculado por macho y semana en el estudio y el otro fue descartado. Los moruecos se clasificaron previamente como de alta y baja fertilidad basándonos en los odds-ratio de un estudio epidemiológico previo (Palacin et al., 2012). Las muestras de semen se diluyeron hasta 50×10^6 espermatozoides/mL usando INRA96 ® para la evaluación de la motilidad espermática (Vicente-Fiel et al., 2014) o se prepararon para la evaluación de la morfometría espermática como se describió anteriormente (Yániz et al., 2012).

Los valores obtenidos se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete SPSS, versión 15.0. El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0.05$. Se utilizaron procedimientos clúster para identificar las subpoblaciones de espermatozoides utilizando datos cinéticos o morfométricos como se describió en Vicente-Fiel et al., (2013). Después de caracterizar las subpoblaciones espermáticas, se realizó un análisis de correlación de dos vías incluyendo todas las subpoblaciones para explorar posibles asociaciones entre la morfometría y velocidad espermáticas. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para explorar las relaciones entre la proporción de cada subpoblación de espermatozoides en la muestra seminal y la fertilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis clúster reveló la presencia de tres subpoblaciones cinéticas en moruecos: la subpoblación 1 (SP1mot) comprende espermatozoides lentos, no lineales y con baja ALH. La subpoblación 2 (SP2mot) incluye espermatozoides rápidos y lineales. En el mismo sentido, la subpoblación 3 (SP3mot) está formada por espermatozoides rápidos, no linealesy con alta ALH. De los espermatozoides móviles totales, 17,9%, 53,1% y 29,0% se incluyeron

en las subpoblaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Las tres subpoblaciones cinéticas descritas son similares a las de un estudio previo en la raza ovina Manchega (García-Alvarez et al., 2013).

En relación a los parámetros morfométricos, el análisis clúster reveló la presencia de tres subpoblaciones: la subpoblación 1 (SP1morpho) incluye espermatozoides pequeños (baja P, L, W). A la subpoblación 2 (SP2morpho) pertenecen espermatozoides de tamaño medio y con forma redondeada. La subpoblación 3 (SP3morpho) está formada por espermatozoides grandes y largos. De los espermatozoides totales, el 17,8, 34,8 y 47,0% se incluyeron en las subpoblaciones 1, 2 y 3, respectivamente. Estas subpoblaciones coinciden con las descritas en un estudio reciente de nuestro grupo, donde se identificaron tres subpoblaciones morfométricas utilizando el método de CASMA-F (Vicente-Fiel et al., 2013).

Los moruecos de alta fertilidad mostraron una mayor proporción de espermatozoides con movilidad eficiente (rápida y lineal, SP2mot) y con las cabezas grandes y largas (SP3morpho). Ambas subpoblaciones espermáticas podrían estar relacionadas con una mayor eficiencia migratoria a través del tracto genital femenino. En los ovinos, el cuello uterino y el istmo son las principales barreras para los espermatozoides después de la inseminación cervical (Yániz et al., 2014). En estas estructuras anatómicas, la mucosa epitelial produce moco viscoso que los espermatozoides deben penetrar para llegar al sitio de la fecundación en la unión ámpulo-istmica del oviducto. Junto con secreciones viscosas locales, la compleja arquitectura superficial de la mucosa cervical y oviductal (Yaniz et al., 2014) puede dificultar el paso de los espermatozoides. Los eyaculados con una mayor proporción de espermatozoides con un movimiento rápido y lineal probablemente tendrían una migración más eficiente a través del tracto reproductivo femenino. De acuerdo con nuestros resultados, Ramon et al., (2013) observaron que los machos de ciervo con altas tasas de fertilidad tenían eyaculados con altos porcentajes de espermatozoides exhibiendo los movimientos rápidos y lineales. Los espermatozoides con cabeza grande y larga también podrían estar relacionados con una migración más eficiente. En estudios de la competencia espermática, se ha demostrado que todos los componentes del espermatozoide aumentan de tamaño al mismo tiempo, y esto podría estar asociado con una mejor eficiencia migratoria (Tourmente et al., 2011).

Se buscaron posibles correlaciones entre subpoblaciones cinéticas y morfométricas (porcentajes de cada una) para evaluar si los espermatozoides en una subpoblación morfométrica particular tenían un movimiento característico. Encontramos que la proporción de espermatozoides con un núcleo pequeño (SP1morpho) mostró una correlación positiva ($r = 0, 32$, $P < 0,05$) con la proporción de espermatozoides con un movimiento lento, no lineal con baja ALH (SP1mot) y una correlación negativa ($r = -0,33$, $P < 0,05$) con la proporción de espermatozoides con un movimiento rápido y lineal (SP2mot). Esta es la primera vez que se estudia la correlación entre el diseño espermático y su cinética de movimiento en ovino. En el ciervo ibérico se ha demostrado que los espermatozoides con movimiento rápido y lineal se correlacionan con los espermatozoides con una cabeza pequeña y alargada, siendo ambas subpoblaciones más frecuentes en machos de alta fertilidad (Ramon et al., 2013). En el presente estudio, sin embargo, los espermatozoides rápidos y lineales y los de núcleos grandes y largos se correlacionaron con la alta fertilidad, pero ambas subpoblaciones no se correlacionaron entre sí. En general puede afirmarse que no se observó una clara correspondencia entre las subpoblaciones morfométricas y cinéticas en el morueco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de Paz, P. 2011. Theriogenology 76, 1313-1325.
- Garcia-Alvarez, O. 2014. Reprod. Fertil. Dev. 26, 725-732.
- Holt, W.V. 2004. Reproduction 127, 527-535.
- Palacín, I. 2012. Anim. Reprod. Sci. 132, 139-144.
- Ramon, M. 2013. Biol. Reprod. 89, 110.
- Tourmente, M. 2011. B.M.C. Evol. Biol. 11, 1-10.
- Vicente-Fiel, S. 2013. Anim. Reprod. Sci. 139, 182-189.
- Vicente-Fiel, S. 2014. Anim. Reprod. Sci. 146, 15-20.
- Yániz, J.L. 2012. Theriogenology 77, 1343-1350.

Agradecimientos: Los autores agradecen al CITA (DGA) por su ayuda con la adquisición de muestras de semen. Este trabajo fue financiado por el MINECO Español (proyectos IPT-010000-2010-33 y AGL2011-30353-C02-01) y la DGA-FSE (proyecto A40).

A COMPARATIVE STUDY OF SPERM SUBPOPULATIONS IN HIGH AND LOW FIELD FERTILITY RAMS

ABSTRACT: The aim of the present study was to investigate whether differences in field fertility of rams are reflected in differences in sperm morphometric and kinematic population structure. The association between sperm morphometric and kinematic subpopulations was also investigated. Ejaculates from 8 adult rams, 4 with high and 4 with low field fertility, were collected weekly using an artificial vagina over 6 consecutive weeks. Analyses of sperm motility using computer-assisted sperm analysis (CASA) and sperm nuclear morphometry using computer-assisted sperm morphometry-fluorescence were performed. Clustering procedures using the kinematic and morphometric data from high and low field fertility rams resulted in the classification of spermatozoa in three kinematic and three morphometric sperm subpopulations. The distribution of subpopulations between rams of high and low field fertility was significantly different, with higher percentages of spermatozoa exhibiting fast and linear movements and those with large and long nuclei in the high fertility group. However, these subpopulations were not correlated. It was concluded that high and low fertility rams present clear differences in sperm population structure.

Keywords*:* sheep, sperm subpopulations, CASA, CASMA