EFECTO DEL FLUIDO UTERINO Y DEL PLASMA SEMINAL SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN LA ESPECIE PORCINA

Abril-Sánchez, S., Soriano-Úbeda, C., Matás, C., García-Vázquez, F.A [1]
Departamento de Fisiología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia
Campus *Mare Nostrum*, 30100, Murcia e IMIB, Murcia. [1] fagarcia@um.es

INTRODUCCIÓN

En la especie porcina, tras una monta natural o inseminación artificial tradicional, los espermatozoides son depositados en la porción intracervical del útero. Desde ahí inician un largo viaje hacia la unión útero-tubárica, pasando por los cuernos uterinos (Hunter, 1981). Durante su transcurso, normalmente se produce una disminución de la población espermática y, aunque se depositan millones de espermatozoides en el tracto genital de la hembra, solamente unos pocos miles alcanzan el oviducto (Sumransap et al., 2007). Esta pérdida de población espermática puede deberse a diversos factores, como la acción fagocítica de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) en el útero (Matthijs et al., 2003; Taylor et al., 2009), el reflujo de semen (Steverink et al., 1998; Hernández-Caravaca et al., 2012, 2015) u otros factores desconocidos presentes en el fluido uterino (FU) (Kawano et al., 2014). Frente a esto, se ha visto que el plasma seminal (PS) minimiza algunos de estos factores, como por ejemplo el reclutamiento de los PMNs (Rozeboom et al; 1998, 1999), o también manteniendo la funcionalidad espermática por la presencia de algunas proteínas (Centurión et al., 2013). Además, en ratón se ha observado que la presencia de PS implica una mejora de la calidad espermática (motilidad, vitalidad y daño acrosomal), mientras que el FU daña la funcionalidad de los espermatozoides, afectando a la vitalidad, motilidad y membrana acrosomal (Kawano et al., 2014).

Por todo lo dicho, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del FU porcino sobre la calidad de espermatozoides eyaculados (vitalidad, motilidad y daño acrosomal) en presencia o ausencia de PS.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras de eyaculado se obtuvieron de cerdos de fertilidad probada. Tras la extracción del semen, una parte se destinó a la obtención de PS. Para ello, se centrifugaron las muestras de eyaculado (3200 *g*, 10 min, 4ºC) hasta la eliminación total de restos celulares. Se recolectó el sobrenadante y seguidamente las muestras de PS se alicuotaron y congelaron a -80 ºC hasta su uso.

El FU se extrajo de úteros de cerdas que se encontraban en fase folicular tardía (basado en la morfología del ovario según Carrasco et al., 2008) procedentes del matadero “El Pozo Alimentación S.A.” (Alhama de Murcia, Murcia, España). Para la extracción, se realizó una presión mecánica desde la porción craneal (cerca de la unión útero-tubárica) hasta la porción caudal (próxima al cuerpo del útero). El contenido fue recogido en placas *petri* y seguidamente se depositó en tubos *eppendorf* para ser centrifugados (7000 *g*, 10 min, 4ºC). Finalmente, se recolectó el sobrenadante y se congelaron a -80 ºC hasta su uso.

Para medir el efecto del FU sobre la calidad espermática en presencia o ausencia de PS, se realizaron 4 grupos experimentales:

a) Grupo (-/-): grupo control, exento de PS y FU.
b) Grupo (+/-): 20% de PS, sin FU.
c) Grupo (-/+): sin PS, 20% de FU.
d) Grupo (+/+): 20% de PS + 20% FU.

Se ajustó la concentración espermática a 40 x 10^6 espermatozoides/ml en un volumen final de 500 µl en PBS (*Phosphate Buffer Solution*). Posteriormente, los grupos experimentales se incubaron a 38ºC durante 2 horas. A los 15 min y 1 y 2 horas de incubación se evaluó la motilidad (%) y motilidad progresiva (escala [0-5], donde 0= estáticos; 5= máxima progresividad) de forma subjetiva, así como la vitalidad (eosina/nigrosina) y el daño acrosomal (PNA-FITC, según Kawano et al., [2007]).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la motilidad (%) y vitalidad entre los distintos grupos experimentales (Tabla 1). Sin embargo, en los grupos en los que estaba presente el PS [(+/+) y (+/-)] se apreciaron niveles significativamente mayores ($p<0,05$) en motilidad progresiva respecto a los grupos en ausencia de PS [(-/+) y (-/-)]. En cuanto al daño acrosomal, a las 2 h de incubación se observó que los grupos sin PS [(-/-) y (-/+)] presentaron porcentajes más elevados ($p<0,05$) que los grupos con PS [(+/-) y (+/+)]. Respecto a este parámetro, se puede estimar una tendencia creciente, aunque no significativa, en el grupo exento de PS, en presencia de FU (-/+), respecto al grupo control (-/-).

***Tabla 1**. Parámetros de motilidad (%), motilidad progresiva (0-5), vitalidad (%) y daño acrosomal (%) medidos en diferentes tiempos de incubación (15 min, 1h y 2h) en espermatozoides con FU y/o PS. Los datos se expresan como Media ± error típico.*

Tiempo incubación	Grupos	Motilidad (%)	Motilidad Progresiva (0-5)	Vitalidad (%)	Daño Acrosomal (%)
15 min	(-/-)	82,00±2,54	2,30±0,14^{a}	87,33±1,45	10,00±1,00^{a}
	(+/-)	84,00±1,87	2,75±0,07^{b}	87,00±1,52	1,00±0,00^{b}
	(-/+)	85,00±1,58	2,40±0,12^{ab}	87,66±2,33	7,33±0,88^{a}
	(+/+)	85,00±1,58	2,80±0,05^{b}	87,66±3,17	1,33±0,33^{b}
1h	(-/-)	77,00±1,22	2,00±1,76^{a}	83,00±1,52	11,33±1,76
	(+/-)	82,00±1,22	2,70±0,05^{b}	85,00±0,57	3,33±1,85
	(-/+)	80,00±0,00	2,45±0,16^{ab}	81,33±1,33	11,33±2,84
	(+/+)	83,00±1,22	2,80±0,05^{b}	86,00±1,52	5,66±2,33
2h	(-/-)	72,00±4,06	2,00±0,15^{a}	84,00±0,57	12,66±2,40^{ab}
	(+/-)	81,00±2,44	2,70±0,05^{b}	82,00±1,52	4,00±0,57^{c}
	(-/+)	75,00±1,58	2,30±0,09^{a}	76,66±4,40	19,00±1,00^{a}
	(+/+)	80,00±2,73	2,70±0,05^{b}	81,66±1,66	9,00±1,00^{bc}

Todos los datos fueron analizados por ANOVA ($p<0,05$), comparando las medias entre los grupos experimentales en un mismo tiempo de incubación.
Letras diferentes en una misma columna en un mismo tiempo de incubación indican diferencias significativas.
n=5: número de replicados realizados para los parámetros de motilidad (%) y motilidad progresiva.
n=3: número de replicados realizados para los parámetros de vitalidad (%) y daño acrosomal (%).

Por un lado, el daño acrosomal, producido por el FU sobre espermatozoides sin PS, puede ser uno de los factores que presenta el tracto genital femenino para la eliminación (selectiva o al azar) de carga espermática durante su paso por los cuernos uterinos, en la especie porcina. De igual forma, se han detectado factores similares en otras especies, como por ejemplo en roedores, donde se ha observado que el FU aumenta el daño acrosomal o reacción acrosómica prematura, disminuye la vitalidad así como los parámetros de motilidad en las células espermáticas (Kawano et al., 2014). Por otra parte, se observa que el PS mejora la funcionalidad espermática, manteniendo la progresividad y la integridad de la membrana acrosomal, incluso en presencia de FU. Algo similar ha sido observado en roedores, donde el PS protege a los espermatozoides de los efectos nocivos del FU, impidiendo daño acrosomal o reacción acrosómica prematura y manteniendo los niveles de vitalidad y motilidad altos. También se ha visto un efecto beneficioso del PS en ovino (Rickard et al., 2014), donde se ha observado que el PS mejora el tránsito de los espermatozoides a través del cuello uterino. Respecto al efecto del PS en la especie porcina, otros autores (Centurion et al., 2003) han observado efectos similares a los obtenidos en nuestro estudio. Éstos han detectado que algunas proteínas, denominadas espermadhesinas

(presentes en PS) actúan protegiendo a las células espermáticas de posibles daños externos, preservando la integridad de la membrana, la motilidad y la actividad mitocondrial. Además, también se ha comprobado que el PS posee propiedades inmunosupresoras, un conjunto de antioxidantes y citoquinas que modulan la respuesta inmunológica del tracto genital femenino (Aitken y Baker, 2013).
Tras la valoración de estos resultados se puede concluir que, en la especie porcina, el FU podría influir sobre la funcionalidad espermática, aunque es necesario realizar diversos estudios complementarios. Además, el PS tiene la capacidad de proteger a las células espermáticas de un daño acrosomal y de mejorar la motilidad, optimizando la linealidad y progresividad. Una de las posibles aplicaciones en granja derivadas de este estudio, sería el uso de dosis seminales con una mayor proporción de plasma seminal que las actuales, ya que mejoraría la calidad de las mismas tras la deposición del semen en el tracto genital de la hembra.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

•Aitken, R.J. & Baker, M.A. 2013. J. Reprod. Immunol. 100, 11-19. •Carrasco et al., 2008. Reproduction. 136, 833-842. •Centurion et al., 2003. Biol. Reprod. 69, 640-646. •Hernández-Caravaca et al., 2012. Anim. Reprod. Sci. 139, 14-22. •Hernández-Caravaca et al., 2015. Theriogenology. In press. •Hunter, R.H.F. 1981. J. Reprod. Fertil. 63, 109-117. •Kawano et al., 2014. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 4145-4150. •Kawano et al., 2007. Biol. Reprod. 76, 353-361. •Matthijs et al., 2003. Reproduction. 125, 357-267. •Rickard et al., 2014. Reproduction. 248, 469-478. •Rozeboom et al., 1998. J. Reprod. Fertil. 114, 195-199. •Rozeboom et al; 1999. J. Anim. Sci. 77, 2201-2206. •Steverink et al., 1998. Anim. Reprod. Sci. 51, 109-119. J. Reprod. Fertil. 114, 195-199. •Taylor et al., 2009. Anim. Reprod. Sci. 115, 279-289.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subvencionado por el Ministerio Español de Economía y Competencia (MINECO) y por el Fondo de Desarrollo Regional Europeo (FEDER; código del proyecto, AGL2012-40180-C03-01).

EFFECT OF UTERINE FLUID AND SEMINAL PLASMA ON QUALITY PORCINE SPERM

ABSTRACT: The aim of the present study was to analyze the effect of the uterine fluid (late follicular phase) on sperm quality with or without seminal plasma. Four experimental groups were used: 1) (-/-): spermatozoa incubated without seminal plasma and uterine fluid (control group); 2) (+/-) spermatozoa incubated with 20% of seminal plasma and without uterine fluid; 3) (-/+): spermatozoa incubated without seminal plasma and with 20 % of uterine fluid, 4) (+/+): spermatozoa with seminal plasma (20%) and uterine fluid (20%). Motility (%), progressive motility (scale [0-5], 0= non motile; 5= high progressivity), vitality and acrosomal damage were measured at 15 min, 1 and 2 hour of incubation. Results showed that seminal plasma has a positive effect on sperm quality, improving linearity and progressive motility. Besides, seminal plasma prevents acrosomal damage. On the other hand, the uterine fluid doesn´t affect any of these parameters (motility, progressive motility and vitality). Although, the uterine fluid whether affects acrosomal integrity in absence of seminal plasma. Therefore, the adding of seminal plasma to insemination seminal doses could be a strategy to improve artificial insemination efficiency.

Keywords: motility, porcine, seminal plasma, uterine fluid.