IMPORTANCIA DE LA VALORACIÓN DE PARÁMETROS APOPTÓTICOS EN MUESTRAS SEMINALES PARA LA SELECCIÓN DE SEMENTALES

Casao, A[1]., Macías A.[2], Laviña, A.[2], Cebrián-Pérez, J.A.[1], Muiño-Blanco, T[1]. y Pérez-Pé, R[1].
[1]Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Instituto de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), Facultad de Veterinaria, Miguel Servet 177, Zaragoza.
[2]ANGRA, Cabañera Real, s/n Zaragoza. adriana@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El objetivo de este estudio fue descubrir las razones de la baja fertilidad obtenida con muestras espermáticas de moruecos que presentaban valores aceptables de parámetros estándar de calidad seminal (viabilidad y motilidad), y que se encontraban incluidos en programas de mejora de la raza Rasa Aragonesa. Se analizaron varios eyaculados de tres machos cuya fertilidad tras inseminación artificial en campo fue inferior al 45%, y se compararon con los de un macho que alcanzó un valor medio del 66%. Este estudio se centró especialmente en el análisis de marcadores apoptóticos, ya que la presencia de espermatozoides apoptóticos en las dosis seminales se ha relacionado con problemas de infertilidad o baja fertilidad en varias especies (Said *et al*., 2006; Anzar *et al*., 2002). Además, nuestro grupo de investigación ha demostrado que en semen ovino fresco existe un cierto porcentaje de espermatozoides que presenta marcadores apoptóticos, como la translocación de la fosfaditilserina, la fragmentación del ADN o la presencia de caspasas activas (Martí *et al*., 2008; Mendoza *et al*., 2013), y que su análisis, junto con el de otros parámetros como el estado de capacitación, permite revelar diferencias entre medios de dilución o procesos de manipulación o conservación de dosis seminales que no resultaban evidentes tras la evaluación de los parámetros rutinarios de calidad espermática (Del Valle *et al*., 2010). Así, las diferencias encontradas en este estudio preliminar entre los eyaculados de machos de alta y baja fertilidad permiten concluir que la evaluación de marcadores no rutinarios de calidad seminal resulta fundamental para mejorar la predicción de la capacidad fecundante de dichos eyaculados, y de este modo, seleccionar adecuadamente a los sementales que van a ser incluidos en un programa de mejora, con el consiguiente ahorro económico y de tiempo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Moruecos adultos, de entre 2 y 4 años, pertenecientes a la Asociación Nacional de Criadores de Ganado selecto de la raza Rasa Aragonesa (ANGRA) y de fertilidad conocida se trasladaron a las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal (SEA) en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Los animales estudiados fueron un macho de alta fertilidad en inseminación artificial (A, fertilidad = 66%), y tres machos de baja fertilidad (B1, B2 y B3, fertilidad = 36, 39 y 43 %, respectivamente).

Tras un periodo de adaptación, se recogieron los primeros eyaculados de cada uno de los machos mediante vagina artificial y de forma individual, dos veces por semana durante un mes. Tras su obtención, las muestras se diluyeron (1:100 v/v) en un medio compuesto por 0,25 mol/L de sacarosa, 10 mmol/L Hepes, 2 mmol/L de KOH, 5 mmol/L de glucosa, 0,5 mol/L de NaH_2PO_4 y 100 mmol/L de EGTA, y se analizó su motilidad, viabilidad, parámetros apoptóticos (inversión de fosfatidilserina, activación de caspasas y daño en el ADN) y estado de capacitación.

La evaluación de la motilidad se realizó mediante un sistema de análisis computerizado (ISAS 1.0.4; Proiser SL, Valencia, Spain). La determinación de la viabilidad (integridad de la membrana plasmática) se llevó a cabo mediante la doble tinción con diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) y ioduro de propidio (IP). La traslocación de fosfatidilserina (FS) se evaluó con Anexina V-FITC en combinación con IP. Para la determinación de la actividad de caspasas se utilizó el kit *Vibrant FAM Caspase-3 and -7 Assay* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) combinado con homodímero de etidio. El daño en el ADN se estudió mediante la técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase mediated-dUTP Nick End Labelling*) usando el kit *In situ cell death detection kit*, con fluoresceína (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Todos estos parámetros se analizaron por citometría de flujo. La valoración del estado de capacitación se llevó a cabo mediante la tinción con

clorotetraciclina (CTC) (Pérez-Pé *et al*. 2002), y se analizó mediante microscopía de fluorescencia.
Los datos obtenidos se analizaron mediante chi-cuadrado, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, NY, Estados Unidos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de los parámetros de motilidad y viabilidad (integridad de membrana plasmática) no mostró diferencias significativas entre los moruecos estudiados. Sin embargo, el estudio de los parámetros apoptóticos reveló que el macho de alta fertilidad (A) presentaba un porcentaje significativamente menor de espermatozoides con inversión de fosfatidilserina (15,4 ± 4.3 %) y daño en el ADN (27,3 ± 3,1 %) que los machos B2 y B3 (31,2 ± 8,1 % y 27,8 ± 8,4 % de inversión de fosfatidilserina y 40,8 ± 4,5 % y 38,5 ± 1,1 % de daño en el ADN para B2 y B3, respectivamente; $P<0,05$, Fig. 1a y 1c). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides con caspasas activas entre los machos baja fertilidad (22,1 ± 2,9 %, 27,4 ± 5,1 % y 27,9 ± 3,7 % para B1, B2 y B3, respectivamente) y el macho de alta fertilidad (23,9 ± 2,9 %, Fig. 1b).
Por otro lado, el estudio del estado de capacitación de los eyaculados, mediante la tinción con CTC, reveló que el morueco de alta fertilidad presentaba unos porcentajes de espermatozoides capacitados significativamente menores (26,3 ± 3,7 %) que los tres machos de baja fertilidad (42,1 ± 6,3 %, 39,1 ± 6,3 % y 52,0 ± 6,0 %, para B1, B2 y B3, respectivamente; $P<0,05$, Fig. 2).
En base a los análisis rutinarios de calidad seminal, es decir, motilidad e integridad de membrana, junto como otros parámetros de comportamiento, los machos B1, B2 y B3 habían sido incluidos como sementales en un programa de selección y mejora de la raza Rasa Aragonesa, dando como resultado unos valores de fertilidad muy bajos cuando sus dosis seminales se usaron para inseminación artificial. Una valoración más exhaustiva de sus eyaculados, incluyendo otros parámetros como los marcadores apoptóticos, especialmente los niveles de inversión de fosfatidilserina y el daño en el ADN, así como el grado de capacitación espermática, hubiese servido para descartar a estos animales como sementales y evitar así tanto los gastos económicos como de tiempo y esfuerzo, derivados de su mantenimiento, entrenamiento, preparación de sus dosis seminales, sincronización de las hembras e inseminación artificial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anzar, M., He, L., Buhr, M.M., Kroetsch, T.G., Pauls, K.P., 2002. Biol Reprod 66: 354-360.
- Del Valle, I., Mendoza, N., Casao, A., Cebrián-Pérez, J.A., Pérez-Pé, R. y Muiño-Blanco, T., 2010. Reprod Dom Anim 45: 260-268
- Martí, E., Pérez-Pé, R., Colás, C., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J.A. 2008. Anim Reprod Sci. 106: 113-132
- Mendoza, N., Casao, A., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. 2013. Biol Reprod 88 (6): 149
- Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M. L., Cebrián-Pérez, J. A. and Muiño-Blanco, T. 2002. 61(2): 226-233.
- Said, T., Agarwal, A., Grunewald, S., Rasch, M., Baumann, T., Kriegel, C., Li, L., Glander, H.J., Thomas, A.J., Paasch, U. 2006. Biol. Reprod. 74: 530-537

Agradecimientos: Financiado por DGA A-26FSE y CICYT-AGL2013-3328-P

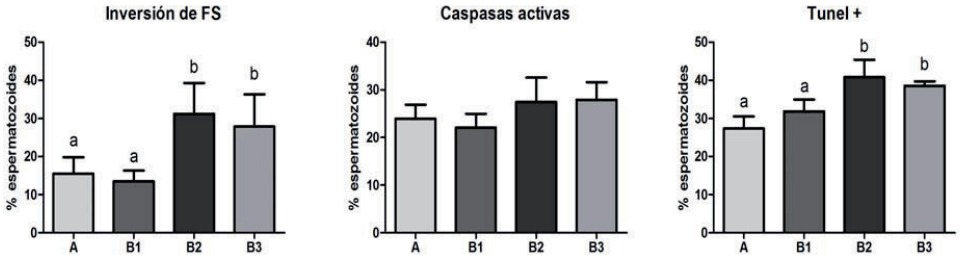


***Figura 1**. Evaluación de parámetros apoptóticos en espermatozoides de machos ovinos de alta (A) y baja (B1, B2 y B3) fertilidad. Media ± SEM de n=5. a, b indica P<0,05.*

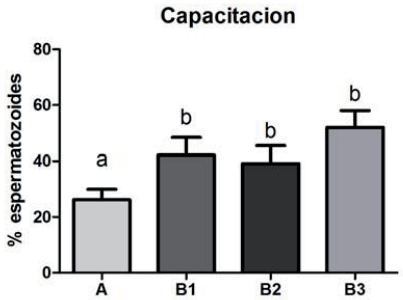


***Figura 2**. Evaluación del estado de capacitación de espermatozoides de machos ovinos de alta (A) y baja (B1, B2 y B3) fertilidad. Media ± SEM de n=5. a, b indica P < 0,05*

RELEVANCE OF THE EVALUATION OF APOPTOTIC PARAMETERS IN EJACULATES FOR APROPIATE SELECTION OF OVINE MALES

ABSTRACT: The aim of this study was to discover the reasons for the low fertility obtained after artificial insemination (<45%) with sperm samples from three rams (B3, B1 y B2) that had acceptable values of standard semen quality parameters (viability and motility). Comparisons of ejaculates of each animal with those of a male (A) who reached high values of fertility (66%) showed no significant differences in motility and viability (plasma membrane integrity) values between them. However, the study of apoptotic parameters revealed that male A had a significantly lower percentage of spermatozoa with inversion of phosphatidylserine (P <0.05) and DNA damage (P <0.05) when compared with males B3 and B2, but not with B1. No significant differences were observed in the percentage of spermatozoa with active caspases among low fertility and high fertility rams. Analysis of the capacitation state revealed that male A had a percentage of capacitated sperm significantly lower (P <0.05) than males with low fertility. On the basis of these preliminary results it would be advisable the inclusion of non-routine semen quality parameters in sire tests in order to improve the prediction of their fertilizing ability.

Keywords*:* Apoptosis, capacitation, sperm fertility.