

ESTUDIO MORFOMÉTRICO DIFERENCIAL DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN BOS TAURUS

Palacín, I.¹, Santolaria, P.¹, Alquezar-Baeta, C.², Soler, C.³, Silvestre, M.A.³, Yániz, J.L.^{1*}

¹Grupo de investigación BIOFITER, Instituto Universitario de Ciencias Ambientales (IUCA), Departamento de Producción Animal, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Zaragoza, Huesca, España

²Departamento de Informática e Ingeniería de Sistemas, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España.

³Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física, Universidad de Valencia, Valencia, España.

*yaniz@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El estudio de la morfología espermática se considera un parámetro fundamental en el análisis de calidad seminal, existiendo estudios que relacionan los parámetros morfométricos del espermatozoide con la fertilidad del macho (Yániz et al., 2015). Sin embargo, los métodos corrientemente empleados para la determinación morfométricas implican la realización previa de procesos de secado, fijación y tinción de las muestras, que matan los espermatozoides y alteran su morfología. Para evitarlo, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas para el análisis de la morfometría espermática en muestras líquidas (Yániz et al., 2015), si bien se basan en el análisis indiscriminado de toda la población espermática, sin considerar las diferentes subpoblaciones existentes.

En un trabajo reciente (Yániz et al., 2017) se ha descrito un nuevo método de fluorescencia (ISAS[®]3fun) que permite la identificación de espermatozoides en función de la integridad de la membrana plasmática y acrosómica en muestras líquidas. El objetivo de este trabajo es utilizar este nuevo método para estudiar en detalle las características morfométricas de las diferentes subpoblaciones espermáticas presentes en muestras seminales de toro.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 16 muestras congeladas de toros de raza Frisona. Tras su descongelación, se añadió a las muestras la combinación de fluorocromos suministrada en el kit comercial ISAS[®]3Fun (Proiser R+D, S.L., Paterna, España. Yániz et al., 2017), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, una vez añadidos los fluorocromos, se incubaron las muestras 5 min a 37°C en oscuridad, se colocó una gota de 3µl en un portaobjetos atemperado, se colocó un cubreobjetos y se inmovilizó la muestra mediante el sistema Trumorph[®] (Proiser R+D, S.L., Paterna, Spain. Soler et al., 2015).

Se obtuvieron imágenes de cada muestra teñida mediante un equipo formado por un microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica; Wetzlar, Alemania) equipado con una platina térmica, objetivo de inmersión 63x y filtros estándar Azul/Verde/Rojo. Las imágenes se capturaron con una cámara acoplada al microscopio (Canon Eos 600D Digital Camera, Canon Inc., Tokyo, Japón), utilizando un software de captura de imágenes (EOS Utility).

Los espermatozoides observados fueron clasificados en (Figura 1): espermatozoides con la membrana plasmática y acrosoma intactos (MNAN), espermatozoides con la membrana dañada y el acrosoma intacto (MDAN), espermatozoides con la membrana intacta y el acrosoma dañado (MNAD) y espermatozoides con membrana y acrosoma dañados (MDAD). Las imágenes se analizaron con el software libre ImageJ (versión 1.45e, disponible on-line <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>). De cada espermatozoide, se obtuvieron los diferentes parámetros morfométricos de la cabeza y el acrosoma. Se evaluó el área (A), perímetro (P), longitud (L) y anchura (An) del total de la cabeza espermática de las diferentes subpoblaciones y, en los espermatozoides con el acrosoma intacto, se evaluó el área y el porcentaje que ocupa en acrosoma con respecto al total del área de la cabeza. Se evaluaron al menos 200 espermatozoides por muestra. Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La combinación de los fluorocromos utilizados permitió el estudio detallado de la morfometría de las diferentes subpoblaciones en cada muestra. Tal y como se aprecia en la Tabla 1, las dimensiones de la cabeza de los espermatozoides con el acrosoma dañado (MNAD, MDAD), fué significativamente menor que las de los espermatozoides con acrosoma intacto (MNAN, MDAN) en todos los parámetros estudiados (A, P, L, An). Los parámetros de la subpoblación MDAN, fueron significativamente mayores cuando se compararon con las otras subpoblaciones. Estas diferencias suponen un incremento del 4% en el área espermática respecto a la subpoblación MNAN. Respecto al acrosoma, se observó un área superior en los espermatozoides con la membrana plasmática dañada (MDAN), aunque el porcentaje sobre el total de la cabeza fue similar al de los espermatozoides con el acrosoma y la membrana plasmática intacta (MNAN), posiblemente debido a que el acrosoma de la subpoblación MDAN, además de aumentar de tamaño, se desplaza en sentido apical.

En un estudio previo utilizando contraste de fases, Marco-Jiménez et al., (2006) observaron que los espermatozoides con la membrana plasmática dañada eran más pequeños que aquellos con la membrana plasmática intacta. Estas diferencias las atribuyeron a la pérdida de contenido celular por alteración de la membrana. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que estas diferencias probablemente se deban a una mayor incidencia de daño acrosómico en los espermatozoides con la membrana plasmática dañada.

El nuevo método utilizado para el estudio de la morfometría seminal en toros de la raza frisona ha permitido estudiar, de forma simultánea y en detalle, las características de la cabeza espermática en las diferentes subpoblaciones presentes en la muestra, observándose claras diferencias en función del estatus de la membrana plasmática y, especialmente, del acrosoma.

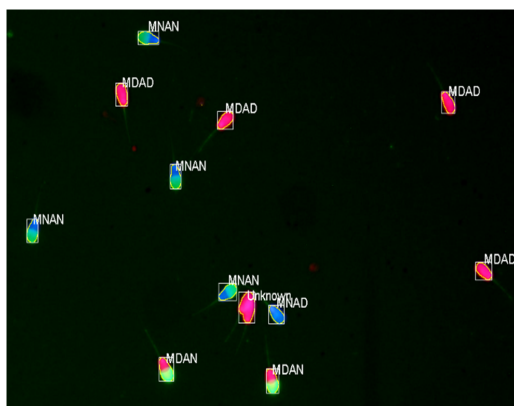


Figura 1 Diferenciación de subpoblaciones espermáticas: MNAN (membrana plasmática y acrosoma intacto; azul y rojo), MDAN (acrosoma intacto, membrana plasmática dañada; verde y rojo), MNAD (membrana plasmática intacta, acrosoma dañado; azul), MDAD (membrana y acrosoma dañado; rojo)

Tabla 1. Diferencias morfométricas (Media \pm SEM) observadas entre diferentes tipos de subpoblaciones espermáticas en toro.

	MNAN	MDAN	MNAD	MDAD
Cabeza				
Área (μm^2)	38,06 \pm 0,34 ^a	39,66 \pm 0,32 ^b	35,45 \pm 0,35 ^c	35,09 \pm 0,27 ^c
Perímetro (μm)	25,34 \pm 0,12 ^a	26,10 \pm 0,13 ^b	24,54 \pm 0,13 ^c	24,58 \pm 0,12 ^c
Longitud (μm)	9,38 \pm 0,05 ^a	9,61 \pm 0,06 ^b	9,13 \pm 0,06 ^c	9,11 \pm 0,05 ^c
Anchura (μm)	5,25 \pm 0,04 ^a	5,44 \pm 0,04 ^b	4,91 \pm 0,03 ^c	4,85 \pm 0,02 ^c
Acrosoma				
Área (μm^2)	22,51 \pm 0,14 ^a	23,50 \pm 0,25 ^b		
% Cabeza	59,20 \pm 0,36	59,29 \pm 0,49		

Superíndices^{a-c}, indican diferencias significativas entre subpoblaciones (P < 0.001)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Marco-Jimenez, F., Vicente, J.S., Lavara, R., Balasch, S., Viudes-De-Castro, M.P., 2010. *Reprod Domest Anim* 45, E118-E123.
- Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., Yaniz, J.L., 2013. *Small Ruminant Research* 112, 128-135.
- Soler, C., García, A., Silvestre, M., Sancho, M., 2015. *Anim. Reprod. Sci.* 158, 1-10.
- Yániz, J.L., Soler, C., Santolaria, P., 2015. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 1-12.
- Yániz, J.L., Soler, C., Alquezar-Baeta, C., Santolaria, P., 2017. *Anim. Reprod. Sci.* 181, 108-114.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía, Empresa y Competitividad (MINECO, proyecto AGL2017-85030-R) y el Gobierno de Aragón-Fondo Social Europeo del (DGA-FSE, proyecto A07-17R).

DIFFERENTIAL MORPHOMETRIC ASSESSMENT OF *BOS TARUS* SPERM SUBPOPULATIONS

ABSTRACT: Previous studies of sperm morphometry have evaluated the whole sperm population regardless of the sperm status. The aim of the present work was to evaluate in detail the morphometry of the different sperm subpopulations according to the membrane and acrosome integrity. Cryopreserved semen samples from 16 bulls were processed for sperm morphometry using the fluorochrome combination included in the ISAS®Fun kit. This allowed to assess sperm morphometry of the whole sperm head and the acrosome in the different sperm subpopulations present in the semen. The acrosome integrity has a great impact on the results of sperm morphometry as the head spermatozoa with damaged acrosome was significantly smaller than those of spermatozoa with normal acrosome. The head dimensions of spermatozoa with damaged plasma membrane but normal acrosome was significantly higher than those of other sperm subpopulations. No morphometric differences between spermatozoa with damaged acrosomes were found independently of the membrane status. It was concluded that the acrosome integrity has a great impact on the variability of head sperm morphometry.

Keywords: *Bos Taurus*, sperm morphometry, acrosome, subpopulations.