

LA APTITUD FECUNDANTE DEL SEMEN EN PORCINO

Sergi Bonet¹, María Dolores Briz¹, Anna Fàgrega¹, Marta Puigmulé¹, Rosa Argentina Rodríguez² y Marc Yeste³. 2012.
PV ALBEITAR 51/2012

1-TechnoSperm. Parque Científico y Tecnológico. Universidad de Girona. España.

2.-Departamento de Veterinaria. Universidad Nacional Agraria. Nicaragua.

3.-Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona. España.

www.produccion-animal.com.ar

INTRODUCCIÓN

El análisis del conjunto de varios parámetros proporciona información sobre la calidad espermática. Sin embargo, eyaculados o dosis seminales con valores aceptables en todos ellos presentan un poder fecundante bajo, afectando la fertilidad y prolificidad de las explotaciones porcinas.

Para la determinación rutinaria de la calidad espermática de un eyaculado o de una dosis seminal refrigerada o criopreservada, se analizan habitualmente parámetros como la concentración, la morfología, la motilidad y la viabilidad espermática. Otros parámetros, como la integridad del acrosoma, de la vaina mitocondrial, de las membranas o del ADN, se analizan en casos más excepcionales. Para el análisis de dichos parámetros se han descrito multitud de técnicas basadas en el uso del microscopio óptico de contraste de fases o de fluorescencia, y la citometría de flujo. Así, por ejemplo, los sistemas computarizados de análisis de imagen (*software* específico más cámara digital) acoplados a un microscopio de contraste de fases nos permiten analizar parámetros como la concentración, la morfología y la motilidad espermáticas. Para el resto de los parámetros, se utilizan, habitualmente, el microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo, y fluorocromos con afinidad directa y específica de una estructura del espermatozoide (tinción directa) o con afinidad indirecta para lectinas que a su vez son afines a un determinado resto glucosídico presente en una de las estructuras del espermatozoide (tinción indirecta). De este modo, para la determinación de la viabilidad espermática podemos utilizar, por ejemplo, los fluorocromos diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) o el SYBR-14 combinados con el yoduro de propidio.

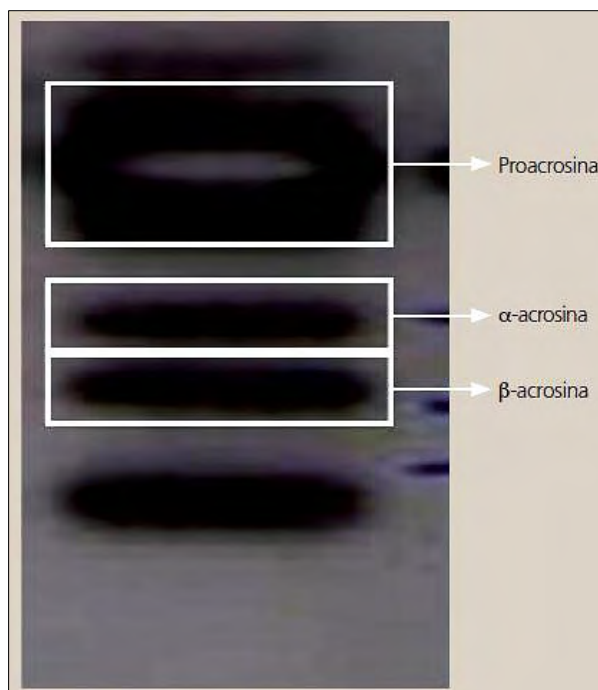


Figura 1. Identificación por Western blot de la proacrosina, a-acrosina y b-acrosina.

Para determinar la integridad acrosómica suele usarse el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la lectina *Arachis hypogea* (PNA) combinados nuevamente con el yoduro de propidio. Para la determinación de la integridad mitocondrial puede utilizarse el fluorocromo JC-1. Para determinar la integridad de membranas podemos recurrir a los test de resistencia osmótica (ORT) o de endósmosis (HOST) o podemos practicar la múltiple tinción con los fluorocromos Hoeschst 33258, yoduro de propidio, Mitotracker Green FM y Alexa Fluor 488 que nos proporciona la información conjunta sobre la viabilidad espermática y la integridad de los acrosomas y de la

vaina mitocondrial. Finalmente, para determinar la integridad del ADN podemos utilizar la técnica SCD (Sperm chromatin dispersión) que utiliza el colorante Wright o el fluorocromo SYBR-Green (Bonet y col., 2000, 2006 y 2012).

El análisis del conjunto de dichos parámetros nos proporciona una buena información sobre la calidad espermática, sin embargo, eyaculados o dosis seminales con valores aceptables en todos ellos presentan un poder fecundante bajo, afectando la fertilidad y prolificidad de las explotaciones porcinas.

MADURACIÓN ESPERMÁTICA

La aptitud fecundante y la motilidad progresiva de los espermatozoides se adquieren en su tránsito por el epidídimo (15 días) a lo largo de un complejo proceso que se conoce como maduración espermática.

El epidídimo es un órgano andrógono dependiente que contiene un largo conducto epididimario revestido por epitelio pseudoestratificado y con esterocilios. La función secretora y absortiva del epitelio epididimario varía a lo largo del conducto epididimario. Tras el análisis de la composición química del fluido epididimario se pueden determinar hasta diez subregiones distintas (Pruneda y col., 2007). En cada una de estas regiones, las glicoproteínas de membrana de los espermatozoides experimentan modificaciones características (Fágrega y col., 2012). De todos los cambios que experimentan los espermatozoides en su paso por el epidídimo podemos distinguir los siguientes:

1. La estabilización de la cromatina nuclear y de algunas estructuras esqueléticas (fibras densas, vaina fibrosa, lámina densa postacrosómica, capítulum y columnas segmentadas) mediante puentes disulfuro entre cisteínas.
2. El desplazamiento y la pérdida de la gota citoplasmática.
3. Los cambios en la naturaleza y distribución de glicoproteínas de membrana (modificaciones de los dominios de membrana y de los receptores específicos del oolema y zona pelúcida del oocito).
4. La redistribución de la proacrosina/acrosina desde la región acrosómica apical a toda la vesícula acrosómica.

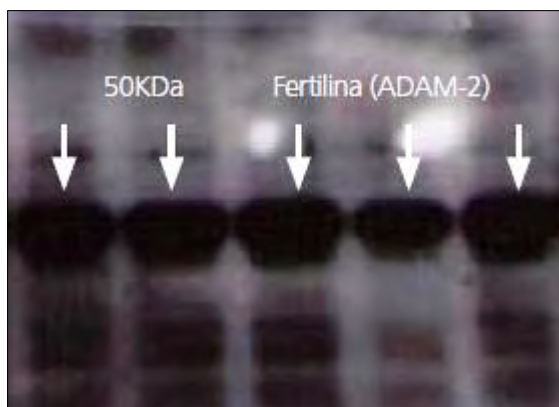


Figura 2. Identificación por Western blot de la fertilina (ADAM-2).

MOVILIDAD Y APTITUD FECUNDANTE

Distintos factores pueden alterar la maduración espermática, afectando la motilidad espermática y la aptitud fecundante de los espermatozoides. Factores estresantes derivados del manejo (ritmo de extracciones de semen, transporte de los animales, etc.), ambientales (estación, temperatura, etc.), alimentarios (déficits nutricionales, etc.) y sanitarios (administración de determinadas vacunas, etc.) pueden afectar gravemente el proceso de maduración espermática y, en consecuencia, la motilidad espermática y la aptitud fecundante del semen. Por otra parte, la manipulación in vitro de las dosis seminales (tiempo y temperatura de refrigeración, criopreservación, etc.) también puede dañar la motilidad espermática y la aptitud fecundante alcanzada por los espermatozoides tras el proceso de maduración espermática.

Para determinar la afectación de la motilidad espermática disponemos de sistemas de análisis de imagen (CASA, Computer Assisted Semen Analysis) que nos permiten calibrar con mucha precisión su afectación en parámetros de la motilidad como: la velocidad curvilínea (VCL); la velocidad lineal (VSL); la velocidad media (VAP); la linealidad de la trayectoria ($LIN=VSL/VCL$); la rectitud de la trayectoria ($STR=VSL/VAP$); la oscilación de la trayectoria ($WOB = VAP/VCL$); la frecuencia del batido de cola (BCF) y el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH). Sin embargo, una dosis seminal con unos buenos valores para la motilidad espermática puede adolecer de una aptitud fecundante baja o muy baja.

IDENTIFICACIÓN E INMUNOLocalIZACIÓN DE LA ACROSINA Y LA FERTILINA

Se requieren técnicas que nos permitan evaluar el poder fecundante de un eyaculado o una dosis seminal, es decir, técnicas que nos permitan conocer si los espermatozoides serán capaces de disolver las cubiertas oocitarias

y de reconocer al oocito. Para ello, nuestro grupo de investigación (TechnoSperm) ha desarrollado las técnicas de identificación e inmunolocalización de la acrosina (Puigmulé y col., 2011) y la fertilina (Fábrega y col., 2011), respectivamente. La identificación de ambas proteínas, es decir, de su integridad, se ha llevado a cabo por técnicas de Western blot (figuras 1 y 2). La localización de la acrosina y la fertilina se ha llevado a cabo por técnicas de inmunolocalización (Alexa Fluor 488) (figuras 3 y 4).

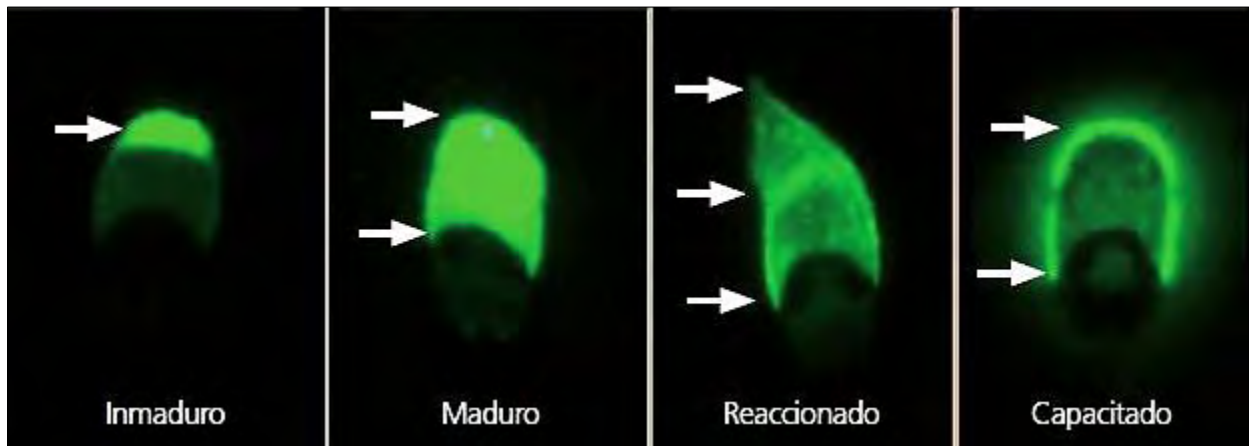


Figura 3. Inmunolocalización (Alexa Fluor 488) de la acrosina. Patrón de distribución en espermatozoides inmaduros, maduros, reaccionados y capacitados.

La proacrosina es una proteasa que se sintetiza durante la espermiogénesis en forma de un cimógeno inactivo. La activación de la proacrosina en acrosina se da por hidrólisis dando lugar a 3 isoformas: a-acrosina (45-49 kDa), b-acrosina (34-38 kDa), g-acrosina (25 kDa). La acrosina y la hialurodinasa son las enzimas acrosómicas más abundantes. Mientras que la hialurodinasa interviene en la disolución de las células de la corona radiata (células granulosa), la acrosina permite la penetración del espermatozoide en la zona pelúcida tras la digestión enzimática de la misma. En un espermatozoide inmaduro (sin aptitud fecundante), la acrosina se dispone en la región apical de la vesícula acrosómica, mientras que en un espermatozoide maduro (con aptitud fecundante), la acrosina se extiende a lo largo de toda la vesícula acrosómica (figura 3).

La fertilina (PH-30 o ADAM-1 y ADAM-2) es una glicoproteína heterodimérica transmembrana esencial para la migración del espermatozoide a través del oviducto y la zona pelúcida y para la iniciación de la fecundación durante la interacción espermatozoide-oocito. En un espermatozoide inmaduro (sin aptitud fecundante), la fertilina se dispone a lo largo de la membrana plasmática que recubre a la vesícula acrosómica; mientras que en un espermatozoide maduro (con aptitud fecundante), la fertilina se redistribuye en la membrana plasmática que limita los bordes de la cabeza del espermatozoide (figura 4).

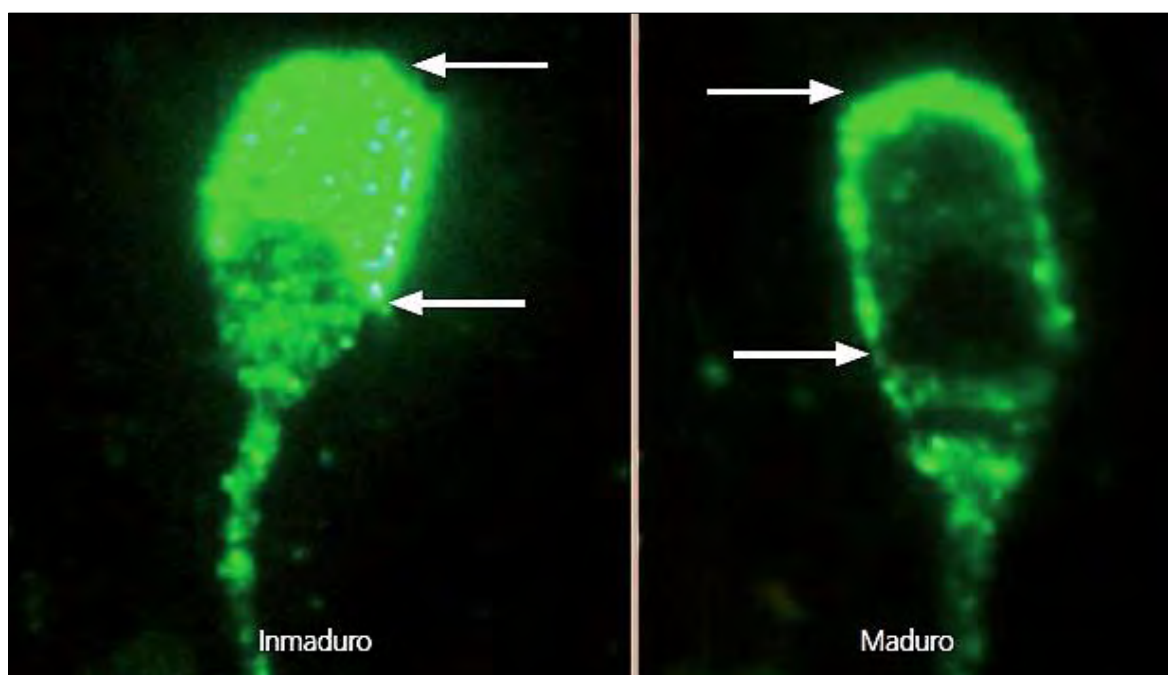


Figura 4. Inmunolocalización (Alexa Fluor 488) de la fertilina. Patrón de distribución en espermatozoides inmaduros y maduros.

BIBLIOGRAFÍA

- Bonet, S.; Briz, M. and Yeste, M. 2012. A proper assessment of boar sperm function may not only require conventional analyses but also others focused on molecular markers of epididymal maturation. *Reproduction in Domestic Animals* (doi:10.1111/j:1439-0531.2012.02033.x)
- Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N. y Badia, E. 2000. *Morfología Espermiática en Porcino (Morphology of Boar Spermatozoa / Morfologia Espermiática en Porcí)*. 242 pp. Institut d'Estudis Catalans (ISBN: 84-7283-533-2)
- Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E. y Barrera, X. 2006. *Bioteconología de la Reproducción Porcina. Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino*. (ISBN 84-8458-241-8). Ed. Universitat de Girona y Red Temática de la Reproducción Porcina
- Fàbrega, A.; Guyonnet, B; Dacheux, J.L.; Gatti, J.L.; Puigmulé, M; Bonet, S.; and Pinart, E. 2011 Expression, immunolocalization and processing of fertilins ADAM-1 and ADAM-2 in the boar (*Sus domesticus*) spermatozoa during epididymal maturation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 96-109.
- Fàbrega, A.; Puigmulé, M.; Dacheux, J.L.; Bonet, S. and Pinart, E. Glycocalix characterization and glycoproteic expression of *Sus domesticus* epididymal sperm surface samples. 2012. *Reproduction, Fertility and Development* (doi.org/10.1071/RD11064).
- Pruneda, A.; Yeung, C.H.; Bonet, S.; Pinart, E. y Cooper, T.G. 2007. Concentrations of carnitine, glutamate, myo-inositol and sorbitol in epididymal fluid and spermatozoa from boars: comparison of two different semen collection frequencies. *Animal Reproduction Science*, 97: 344-355.
- Puigmulé, M.; Fàbrega, A.; Yeste, M.; Bonet, S.; and Pinart, E. 2011. Study of the proacrosin/acrosin system in epididymal, ejaculated and in vitro capacitated boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 23: 837-845.
-