

USO DEL ANÁLISIS GRÁFICO EN LA EVALUACIÓN DE LA MOVILIDAD ESPERMÁTICA

Becerril M.¹, Maximino Méndez Mendoza², Rubén Huerta Crispín² y Andrés Aragón Martínez. 2014. Los Porcicultores y su entorno N° 89, BM Editores.

1) Departamento de biología de la Reproducción, UAM, Unidad Iztapalapa.

2) Laboratorio de Mejoramiento Genético, FMVZ. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Autor para correspondencia: andresammx@yahoo.com

www.produccion-animal.com.ar

Volver a: [Reproducción e I. A. en porcinos](#)

INTRODUCCIÓN

La constante necesidad por mejorar la productividad en los sementales de las explotaciones pecuarias ha llevado al establecimiento de tratamientos para mejorar la calidad del semen. Algunos pueden ser aplicados a los sementales y otros al eyaculado. En el eyaculado se han utilizado diversos aditivos para mantener la calidad espermática. Al implementar el uso de herramientas como el sistema de análisis espermático asistido por computadora (CASA), se puede realizar un análisis de diferentes descriptores de movilidad espermática para determinar de qué forma los aditivos afectan a los espermatozoides. Al comprender estos efectos es posible diseñar nuevos protocolos para el mejoramiento de las técnicas de reproducción asistida y finalmente lograr un aumento en la fertilización.

Los cambios de temperatura en los eyaculados afectan negativamente la movilidad espermática. Esto es importante debido a que la conservación del semen de cerdo requiere la aplicación de bajas temperaturas; sin embargo, esto genera cambios en la membrana citoplasmática, la pérdida de movilidad y de viabilidad favorece los procesos peroxidativos (Moran, 2008; Am-in y col., 2011). Lo anterior es debido a la generación de especies reactivas de oxígeno en niveles superiores a los presentes durante el metabolismo normal de la célula (Breininger y col., 2005), situación que daña la capacidad de fertilización por parte del espermatozoide y disminuye la eficiencia de los programas de reproducción asistida (Gadella y col., 2001; Lewis y Aitken, 2005).

La presencia de progesterona en el tracto reproductor femenino y en la zona pelúcida del ovocito estimula la hiperactivación de los espermatozoides, la reacción acrosomal, promueve la fosforilación de la tirosina y estimula la entrada del calcio extra celular (Luconi y col., 2001). Lo anterior puede ayudar a entender los cambios en el desplazamiento del espermatozoide en el tracto reproductor femenino y la quimiotaxis inducida por el ovocito en el ambiente folicular (Wood y col., 2007; Bejarano y col., 2008).

Rutinariamente el análisis espermático incluye la evaluación de la movilidad total, la concentración, la aglutinación, pH, el color y la morfología. En la actualidad los sistemas CASA permiten evaluar el porcentaje total de espermatozoides en movimiento (MTO%), a partir del cual se pueden obtener las velocidades de desplazamiento en las categorías rápido (4 $\mu\text{m/s}$), medio (3 $\mu\text{m/s}$) y estático (1 $\mu\text{m/s}$); igualmente el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo con respecto al número total de espermatozoides, el porcentaje de espermatozoides con desplazamiento lineal (LIN), el porcentaje de espermatozoides con desplazamiento curvilíneo (STR), la velocidad promedio de la trayectoria real en $\mu\text{m/s}$ (VAP), la velocidad del desplazamiento progresivo en línea recta en $\mu\text{m/s}$ (VSL), la velocidad curvilínea del recorrido en $\mu\text{m/s}$ (VCL), la frecuencia de batido del flagelo en Hert (BCF), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza en μm (ALH), la elongación (ELONG) y el área que ocupa la cabeza del espermatozoide en μm . La evaluación de estos descriptores de movilidad permite ampliar la comprensión de la calidad de los espermatozoides presentes en un eyaculado (Fuse y col.; Pastor y col., 2005; Gagnon y Lamirande, 2006).

La muerte celular o apoptosis es un proceso de muerte fisiológico presente en células que han terminado su función. La apoptosis ocurre durante la regeneración celular, la homeostasis del desarrollo corporal (Delhalle y col., 2003; Almeida y col., 2005). Los componentes moleculares encargados de llevar a cabo la apoptosis son miembros de una familia de proteasas llamadas caspasas (CPS). Las CPS se han detectado en los espermatozoides eyaculados de diferentes especies, incluido el cerdo (Pichardo y col., 2010; Morales y col., 2012; Delhalle y col., 2003; Said y col., 2004) y se ha sugerido que su presencia puede ser un indicador de la calidad espermática (Marchetti y col., 2004).

En el presente trabajo se determinó el efecto que tiene la progesterona sobre los descriptores de movilidad espermática y el porcentaje de caspasas activas, adicionada previo a un proceso de conservación a 17°C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron cuatro cerdos de la línea Camborough (PIC, Querétaro, México) de edad promedio de 1.5 años y un peso aproximado de 200 kg, todos con registro de descendencia. De cada animal se obtuvieron cuatro eyaculados (dos eyaculados por semana) mediante la técnica de la mano enguantada. Del total del eyaculado únicamente se trabajó con la porción rica en espermatozoides (Córdova y Pérez, 2005) la cual fue diluida con un diluyente comercial (VITASEM-LD, MagaporTM, Zaragoza, España).

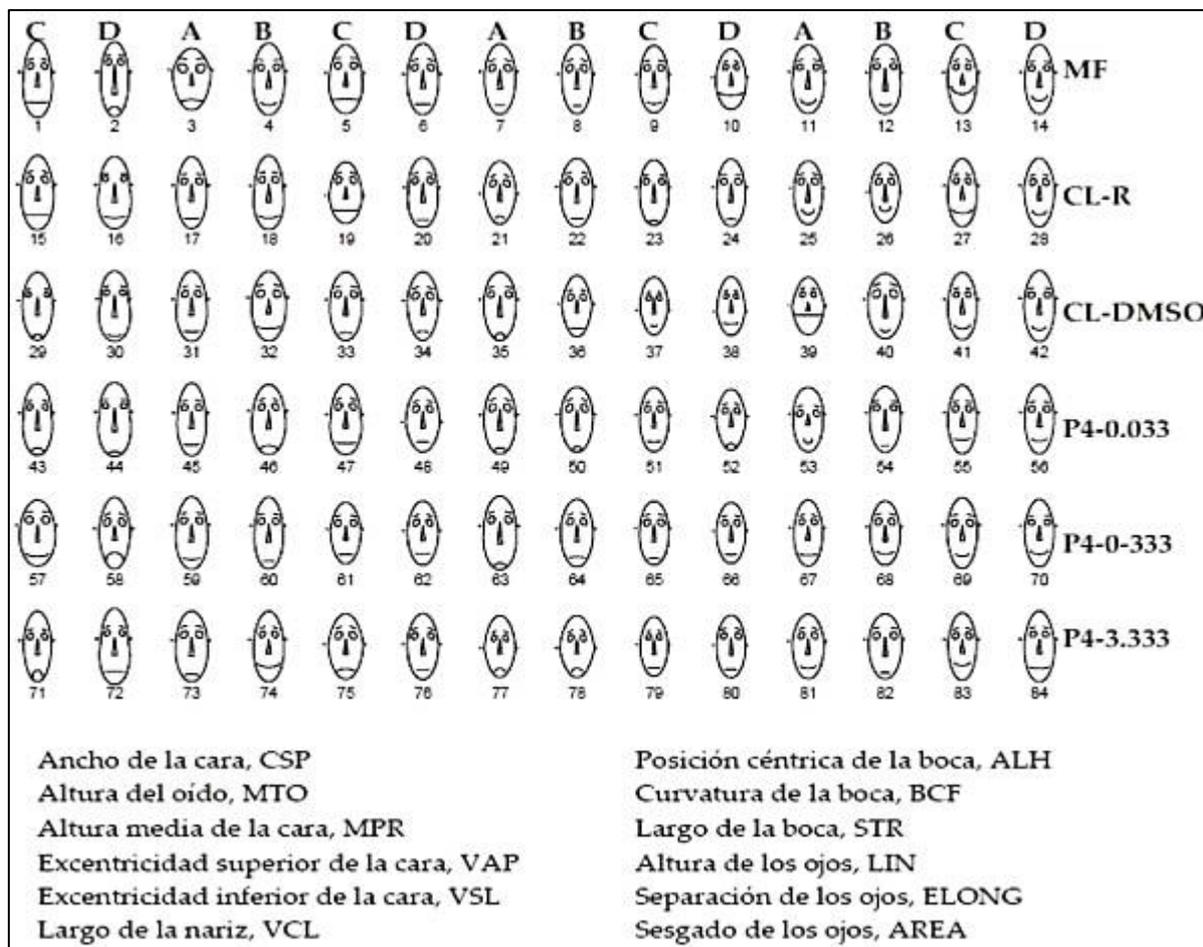


Figura 1. gráfico multivariado de Caras de Chernoff. las literales de cada columna corresponden a la identificación de cada uno de los animales utilizados y sus repeticiones, las leyendas de las filas identifican los controles y los tratamientos utilizados de progesterona (P4-0.033 P4-0.333 o P4-3.333 $\mu\text{g/ml}$), mientras que las leyendas inferiores identifican el rasgo facial asignado a cada descriptor de movilidad. La evaluación de la movilidad se realizó con un equipo CASA (Ultimate Sperm AnalyzerTM, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly MA, USA) con los siguientes ajustes:
45 cuadros por segundo a 60 Hz. Contraste mínimo 25. Tamaño mínimo de la célula 7 pixeles.
STR 45%. VAP 45 $\mu\text{/s}$. VSL 5 $\mu\text{/s}$. Intensidad de la célula 40. Intensidad de iluminación 2100.

Se realizó un primer análisis de movilidad a cada muestra, a la que se consideró como muestra fresca (MF), de cada una de ellas se realizaron 5 alícuotas para la asignación de los tratamientos, previo a un proceso corto de conservación de 30 minutos a 17°C, tiempo tras el cual se evaluó nuevamente la movilidad.

TRATAMIENTOS

La sal de progesterona (P4) (Sigma, St. Louis, MO, USA) se diluyó en dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma), para ser utilizada a las concentraciones de 0.033, 0.333 ó 3.333 μg de progesterona por ml de eyaculado.

De cada eyaculado se realizaron cinco alícuotas de 296 μl , se colocaron en tubos de 1.5 ml. A tres alícuotas se les adicionó progesterona con una de las concentraciones mencionadas, las dos alícuotas restantes se utilizaron como controles, a una de ellas se le adicionó 4 μl de DMSO, la otra únicamente con semen, a éstas se les denominó CL-DMSO y CL-Refrigerado, respectivamente.

Tras la adición de las hormonas las muestras se mantuvieron durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz, posteriormente se llevaron a una cámara de conservación en donde se mantuvieron durante 30 minutos a 17°C. Posteriormente las muestras fueron mantenidas nuevamente a temperatura ambiente durante

15 minutos para que se estabilizaran. Finalmente, se realizó el análisis de movilidad postconservación. El procedimiento de evaluación fue el mismo que el utilizado para la MF.

Para determinar el porcentaje de caspasas activas se recuperó una alícuota de 14.5 µl de cada tratamiento, se depositaron en tubos de 1.5 ml, a los que se adicionó 0.5 µl del reactivo FLICA (Image-iT Red caspase -3 and -7 detection kit, Molecular Probes Inc. Eugene, OR), se incubaron por 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de esto se agregó 1 µl de SYTOX (1 µM; Molecular Probes) se incubó nuevamente durante 10 minutos, enseguida se fijaron con formaldehído al 10% y conservadas a 4°C hasta su análisis en un citómetro de flujo (FACScalibur; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA), se realizó un conteo mínimo de 10,000 células por muestra.

ESTADÍSTICA

Con la finalidad de identificar diferencias entre los valores expresados con la suplementación con progesterona, los datos de los descriptores de movilidad del CASA, se estandarizaron para realizar una representación gráfica con caras de Chernoff, en el que cada una de las variables analizadas así como los valores de caspasas, se asignaron a un rasgo facial. Se realizó un análisis de varianza seguido de Tukey, para identificar el efecto de las diferentes concentraciones de progesterona sobre los descriptores de movilidad. Se realizó un análisis de correlación para determinar la relación entre la movilidad espermática y la expresión de caspasas activas. $P < 0.05$ se consideró significativo. Los datos se analizaron con el software STATISTICA 8.0 (StatSoft, inc. 2007) en una PC con Windows Vista.

RESULTADOS

Cada uno de los rasgos faciales de las caras de Chernoff (Chernoff, 1973) se formó a partir de los valores obtenidos de los descriptores de movilidad espermática (Figura 1). Con el total de los datos analizados se observaron cambios debidos al manejo de las muestras y no a los tratamientos, por lo que se decidió eliminar del estudio la primera repetición del animal A y B. también se determinó que con la concentración de P4 a 0.033 µg/ml, se mantiene un mayor porcentaje de movilidad progresiva.

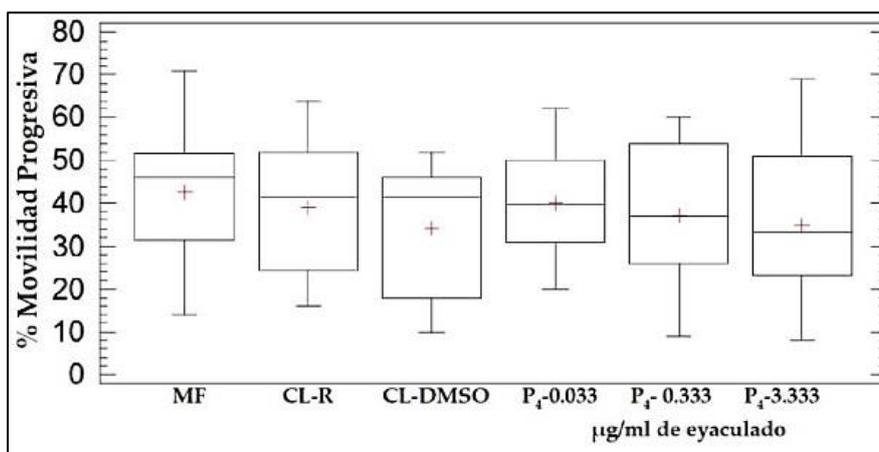


Figura 2. distribución de los porcentajes de movilidad progresiva con la suplementación de las diferentes concentraciones de progesterona (P4-0.033, P4-0.333 ó P4-3.333 µg/ml) después de un proceso de conservación, con respecto a las muestras fresca (mF), control refrigerado (cl-R) y control dimetil sulfóxido (cldms). los extremos representan los valores mínimo y máximo, las cajas representan el 50% de las observaciones, las líneas dentro de las cajas indican la mediana, las cruces la media, figuras por encima de los límites se consideran como valores atípicos.

Cuadro 1. Correlación entre los porcentajes de movilidad total, progresiva y el porcentaje de espermatozoides con expresión de caspasas activas.

| | Movilidad total | Movilidad progresiva | Espermatozoides con caspasas activas |
|--------------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| Movilidad total | ----- | ----- | ----- |
| Movilidad progresiva | $r=0.7557$ $p=0.0000$ | ----- | ----- |
| Espermatozoides con caspasas activas | $r=0.0028$ $p=0.9697$ | $r=-0.0092$ $p=0.8999$ | ----- |

Al analizar la movilidad progresiva se observó que al incrementar la dosis de progesterona la movilidad tiende a disminuir (Figura 2), aun cuando la diferencia entre los porcentajes de movilidad no es estadísticamente sig-

nificativa la media de la dosis de 0.033 $\mu\text{g/ml}$ fue mayor a la presentada en ambos controles y las dos concentraciones restantes.

No se observaron diferencias entre el número de espermatozoides móviles para cada categoría de velocidad de desplazamientos después de la conservación en el semen suplementado con las diferentes concentraciones de la progesterona (Figura 3). Sin encontrar diferencias significativas, la concentración más baja de progesterona mantuvo un mayor número de espermatozoides con movimiento. No se observó una correlación significativa entre los porcentajes de espermatozoides con expresión de caspasas activas y los porcentajes de movilidad total o progresiva, tanto en la muestra fresca como en las muestras con los tratamientos, después de haberlas sometidas al proceso de conservación (Cuadro 1).

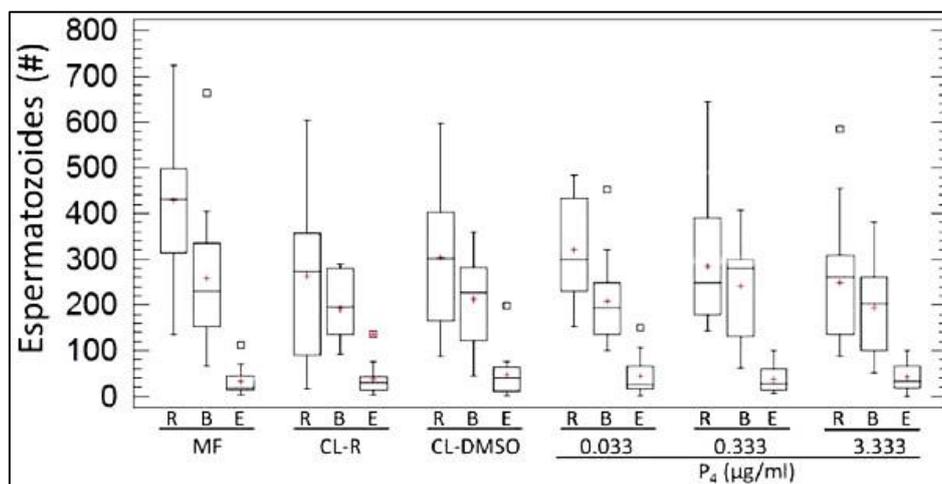


Figura 3. cajas con bigotes para analizar el número de espermatozoides por tipo de movimiento. Rápido 4 μs (R), bajo 3 μs (B) y estático 1 μs (E), de muestra fresca (MF); control refrigerado (CL-R); control dimetil sulfóxido (CL-DMSO); Progesterona P4-0.033 P4-0.333 o P4-3.333 $\mu\text{g/ml}$. los extremos representan los valores mínimo y máximo, las cajas representan el 50% de las observaciones, las líneas dentro de las cajas indican la mediana, las cruces la media, figuras por encima de los límites se consideran como valores atípicos.

DISCUSIÓN

De forma rutinaria la calidad seminal se estima con las evaluaciones de movilidad total, concentración, aglutinación, pH, color y morfología (Garner y col., 1997; Graham, 2001; Akashi y col., 2005; Fuse y col., 2005); sin embargo, al implementar el uso de equipos automatizados para el análisis espermático, se han identificado diferentes subpoblaciones espermáticas en un mismo eyaculado. De estas subpoblaciones se han estudiado sus patrones de movimiento, aun cuando no es claro el papel de dichas subpoblaciones espermáticas se cree que pueden estar relacionadas con la susceptibilidad a los cambios de temperatura, con los porcentajes de capacitación espermática, la resistencia a la refrigeración y la habilidad para fertilizar (Pastor y col., 2005; Pastor y col., 2011).

En estudios previos (Perticarari y col., 2007; Kotwica y col., 2008) no encontraron relación entre la expresión de caspasas activas con la movilidad espermática, lo que concuerda con nuestros resultados. Sin embargo; Bejarano y col. (2008), quienes suplementaron con progesterona (20 $\mu\text{M/ml}$ de eyaculado), encontraron una correlación negativa entre la expresión de caspasas activas y la movilidad.

En el presente estudio se realizó un análisis gráfico multivariado de los descriptores de movilidad obtenidos del CASA y la expresión de caspasas activas en los espermatozoides, al final se pudo determinar que había un mal manejo en la toma de las muestras por parte del técnico, el análisis gráfico con caras de Chernoff permite la observación simultánea de múltiples variables así como la rápida identificación de los cambios existentes de los datos en estudio; como fue en este caso, al observar que la progesterona a dosis bajas puede mantener la movilidad progresiva y el desplazamiento rápido de los espermatozoides, con respecto a las muestras frescas y que la progesterona no influye sobre la expresión de caspasas activas.

CONCLUSIÓN

El uso del análisis gráfico con caras de Chernoff permitió identificar con facilidad la tendencia de los datos de los descriptores de movilidad espermática obtenidos con el CASA. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de movilidad espermática, ni en los tipos de velocidad en el desplazamiento después de la adición con diferentes concentraciones de progesterona y de haber mantenido las muestras a baja temperatura; sin embargo se mantuvo un porcentaje mayor de movilidad progresiva post conservación, con respecto a los controles, así mismo el más alto número de espermatozoides con movimiento rápido y el más bajo con espermatozoides con movimiento vibratorio con la concentración de 0.033 de progesterona por ml de eyaculado. Debido a que la con-

centración más baja de progesterona, mantuvo los mejores indicadores en el análisis espermático, se puede diseñar un nuevo experimento con la implementación de nuevas dosis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico de Claudia Leticia Morales Evangelista.

BIBLIOGRAFÍA

- Akashi T., Mizuno I., Okumura A. y Fuse H. (2005). Usefulness of sperm quality analyzer-V (SQA-V) for the assessment of sperm quality in infertile men. *Archives of Andrology*. 51:437-442.
- Almeida C., Cardoso MF., Sousa M., Viana P., Goncalves A., Silva J. y Barros A. (2005). Quantitative study of caspase-3 activity in semen and after swim-up preparation in relation to sperm quality. *Human Reproduction*. 20 (5): 1307-1313.
- Am-in N., Kirkwood RN., Techakumphu M., Tantasuparuk W. (2011). Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology* 75: 897-903.
- Bejarano I., Lozano MG., Ortiz A., García F.J., Paredes DS., Rodríguez BA. y Pariente AJ. (2008). Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertility and Sterility*. 90 (2): 1340-1347.
- Breining E., Beorlegui NB., O'Flaherty CM. y Beconi MT. (2005): Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 63: 2126-2135.
- Chernoff, H. (1973). The use of faces to represent points in k-dimensional space graphically. *Journal of American Statistical Association*, 68, 361-368.
- Córdova IA. y Pérez GJF. (2005). Crioconservación del semen porcino. *Asociación Colombiana de Porcicultores*, Septiembre- Octubre 2005. 99: 15-17.
- Delhalle S., Duvoix A., Schnekenburgerm, Morceau F., Dicato M. y Diederich M. (2003). An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis; En *Apoptosis from signaling pathways to therapeutic tools*. *Annals of the New York academy of Science*. 1010:1-8.
- Fuse H., Acashi T., Nozaki T., Nishio R. y Mizuno I. (2005). Assessment of sperm quality analyzer II B: Comparison with manual semen analysis and CASA. *Archives of Andrology*. 51:65-67.
- Gadella BM., Rath R., Brouwers JFHM., Stout TAE., Colenbrander B. (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*. 68:249-265.
- Gagnon C. y de Lamirande E. (2006). Controls of sperm motility. En: *The sperm cell production maturation fertilization*. De Jonge CJ., y Barratt CLR. Cambridge University Press. USA. pp. 108-133.
- Garner DL., Thomas CA., Joerg HW., Dejarrette JM. and Marshall CE. (1997). Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in criopreserved bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 57: 1401-1406.
- Graham JK. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Animal Reproduction Science*. 68:239-247.
- Kotwicka M., Filipiak K., Jedrzejczak P. y Warchol JB. (2008). Caspa- se-3 activation and phosphatidylserine membrane translocation in human spermatozoa: is there a relationship? *Reproductive BioMedicine Online*. 16 (5): 657-663.
- Lewis SEM. y Aitken RJ. (2005): DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cellular Tissue Research*. 322: 33-41.
- Luconi M., Bonaccorsi L., Forti G. y Baldi E. (2001): Effects of estrogenic compounds on human spermatozoa: evidence for interaction with a nongenomic receptor for estrogen on human sperm membrane. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 178: 39-45.
- Marchetti C., Jouy N., Laroy-Martin B., Defosse A., Formstecher P. y Martchetti P. 2004. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. *Human Reproduction*. 19:2267-2276.
- Morales ECL., Aragón MA., Pescador SN. y Salazar GF. (2012). Swim- Up procedure in boar semen improves motility and viability but recovered sperm could carry active caspases and chromatin dama- ge. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11 (4): 431-437.
- Pastor FM., Garcia-Macias V., Alvarez M, Herraez P., Anel L. y Paz P. (2005). Sperm subpopulations in iberian red deer epididymal sperm and their changes through the cryopreservation process. *Biology of Reproduction*. 72: 316-327.
- Pastor FM., Tizado EJ., Garde JJ., Anel L. y De Paz P. (2011). Statistical series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*. 75: 783-795.
- Perticarari S., Ricci G., Granzotto M., Boscolo R., Pozzobon C., Guarnieri S., Sartore A., y Presani G. (2007). A new multiparameter flow cytometric method for human semen analysis. *Human Reproduction*. 22 (2): 485-494.
- Pichardo AI., Aragón MA., Ayala EME., y Domínguez VI. (2010). Viability test, active caspase -3 and 7 and chromatin structure in ram sperm selected using the swim-up procedure. *Journal of Andrology*. 31: 169-176.
- Said TM., Paasch U., Grandler HJ., y Agarwal A. (2004). Role of caspases in male infertility. *Human Reproduction*. 10 (1): 39-51.
- Wood DC., Nishigaki T., Tatsu Y., Yumoto N., Baba AS., Whitaker M., y Darzon A. (2007). Altering the speract-induced ion permeability changes that generate flagellar. Ca²⁺ spikes regulates their kinetics and sea urchin sperm motility. *Developmental Biology*. 306: 525-537.

Volver a: [Reproducción e I. A. en porcinos](#)