

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MORFOMETRÍA DE LAS SUBPOBLACIONES ESPERMÁTICAS EN LA ESPECIE) BOVINA, CAPRINA, OVINA Y PORCINA UTILIZANDO EL MÉTODO CASMA-F

Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P. y Yániz, J.L.

Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N 22071 Huesca, España. 526035@unizar.es.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de sistemas de análisis de la morfometría del espermatozoide asistidos por ordenador (CASMA) ha permitido el uso de los parámetros morfométricos para identificar subpoblaciones espermáticas en diferentes especies (Esteso et al, 2009; Martí et al, 2011; Maroto Morales et al., 2012). Teóricamente, la heterogeneidad de los espermatozoides garantiza un mayor potencial para fecundar un oocito en algún intervalo después de la eyaculación (Curry, 2000). Los métodos utilizados hasta la fecha para el procesamiento, captura y análisis de subpoblaciones espermáticas son diversos. Recientemente, hemos desarrollado un método automático de evaluación de la morfometría del núcleo espermático (CASMA-F), que combina la microscopía de fluorescencia con el análisis de imágenes con software libre (Yániz et al., 2012). Con el uso de CASMA-F, los núcleos espermáticos de distintas especies pueden ser teñidos con éxito con la misma sonda de fluorescencia, permitiendo una comparación directa entre las especies (Vicente-Fiel et al., 2013). El objetivo de este estudio fue aplicar el método CASMA-F para comparar las subpoblaciones espermáticas morfométricas de cuatro especies de artiodáctilos domésticos, vacuna (*Bos taurus taurus*), ovina (*Ovis orientalis aries*) y caprina (*Capra hircus aegagrus*) y porcina (*Sus scrofa domestica*).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 20 machos para cada especie. Los diferentes eyaculados fueron tomados con una vagina artificial para moruecos adultos de Rasa Aragonesa, toros frisonos, machos cabríos Murciano-Granadinos y manualmente en verracos Pietrain. Las muestras se conservaron en fresco en un frigorífico a 15°C, dentro de las primeras 24 h las muestras se diluyeron a 200×10^6 espermatozoides/ml con una solución de Tris-base (Yániz et al., 2012). Para el CASMA-F (Vicente-Fiel et al., 2013) se prepararon los frotis de semen colocando 5 μ l de las muestras en el extremo libre de un portaobjetos y arrastrando la gota a través del portaobjetos con el borde de otro portaobjetos. Los frotis se dejaron secar al aire durante un mínimo de 2 h y se fijaron con glutaraldehído al 2% en PBS durante 3 min, se lavaron con agua destilada y se marcaron colocando 2 gotas de 5 μ l entre el frotis y el cubreobjetos de una solución de 20 μ l de Hoechst 33342 en Tris-base, que se incubó durante 20 min en la oscuridad a temperatura ambiente (Yániz et al., 2012). Los cubreobjetos se retiraron, se lavó el frotis con agua destilada y se dejó secar. Las imágenes digitales de los núcleos espermáticos se registraron utilizando un microscopio de epifluorescencia (DM4500B, Leica, Alemania) con un objetivo apocromático de 63X al que iba acoplado una cámara Canon Eos 400D digital. La cámara se controló mediante un ordenador con software DSLR Remote Pro (Breeze Systems, Reino Unido). De cada especie, se capturaron automáticamente 200 núcleos espermáticos y se analizaron usando el software libre Image J (versión 1.45e), con un *plug-in* creado para este fin (Yániz et al., 2012). En cada núcleo espermático se midieron cuatro parámetros primarios (Área en μm^2 (A), perímetro (P), longitud (L) y anchura (W) todos ellos en μm) y cuatro parámetros secundarios (Elipticidad (L / W), rugosidad ($4\pi A/P^2$), elongación ($(LW) / (L + W)$) y regularidad ($\pi LW/4A$). Se analizaron un total de 16.000 núcleos espermáticos utilizando el paquete estadístico SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

El nivel de significación estadística se fijó en $P < 0,05$. Se llevó a cabo un análisis *cluster* en dos pasos. En el primer paso se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de los datos de morfometría. En el segundo paso se realizó un análisis de conglomerados en dos fases con los índices de espermatozoides obtenidos después de la PCA. Las diferencias de los parámetros morfométricos del núcleo del espermatozoide entre los grupos dentro y entre especies se estudiaron mediante un análisis de varianza (ANOVA). Para estudiar la distribución de las subpoblaciones dentro de las especies (entre animales), se utilizó la prueba de χ^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis estadísticos revelaron 4 subpoblaciones espermáticas para el toro y 3 para el morueco, verraco y macho cabrío. La distribución de las subpoblaciones dentro de las especies fue significativamente diferente en las cuatro especies estudiadas. Como se puede observar en la tabla 1 al comparar las subpoblaciones espermáticas en estas cuatro especies, el toro y el verraco tenían dos subpoblaciones claramente diferenciadas por el tamaño: grande y pequeña. Sin embargo, las subpoblaciones espermáticas finales para el toro eran 4 (grande, grande y alargada, pequeña y redondeada, alargada y pequeña) y sólo tres en el verraco (grande, pequeña y alargada, pequeña y redondeada). Para el morueco se establecieron tres subpoblaciones por el tamaño: grande, media y pequeña, mientras que para el macho cabrío se describieron como: redondas, pequeñas y alargadas. En experimentos recientes (Vicente-Fiel et al., 2013), se comparó la morfometría del núcleo espermático en las mismas especies, pero sin una distinción entre subpoblaciones espermáticas. En el macho cabrío, se describió el núcleo espermático más pequeño (Vicente-Fiel et al., 2013) que se corresponde con un tamaño más pequeño de las subpoblaciones que se describen para en este ensayo. Del mismo modo, el tamaño más grande de núcleo espermático se obtuvo para toro (Vicente-Fiel et al., 2013) coincidiendo con la subpoblación 1 en este ensayo. De los resultados obtenidos se desprende que la combinación de la tecnología CASMA-F con análisis de *cluster* multivariante proporciona información sobre las características biológicas de los eyaculados en las cuatro especies estudiadas y entre las distintas especies, mostrando variaciones importantes que pueden existir entre especies. Esta variabilidad de las subpoblaciones espermáticas también se identificó dentro de las especies, con posibles implicaciones funcionales. Algunos autores han obtenido mayores tasas de fertilidad en toro cuando la proporción de espermatozoides con cabeza pequeña se ha incrementado en las muestras (Gravance et al., 1996). En conclusión la utilización de CASMA-F unida al análisis de subpoblaciones podrían complementar los análisis clásicos de calidad seminal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Curry, M.R. 2000. Rev. Reprod. 5: 46-52.
- Esteso, M.C., Fernández-Santos, M.R., Soler, A.J., Montoro, V., Martínez-Pastor, F., Garde, J.J. 2009. Reprod Domest Anim. 44: 206-211.
- Gravance, C.G., Liu, I.K., Davis, R.O., Hughes, J.P., Casey, P.J. 1996. J Reprod Fertil. 108:41-46.
- Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Soler, A.J., Fernandez-Santos, M.R., Roldan, E.R.S., Gomendio, M., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J. 2012. Therio. 77: 1529-1539.
- Martí, J.I., Aparicio, I.M., García-Herreros, M. 2011. Therio. 76: 97-109.
- Martínez-Pastor, F., Cabrita, E., Soares, F., Anel, L., Dinis, M.T., 2008. Reprod. 135: 449-459.
- Vicente-Fiel, S., Palacín, I., Santolaria, P., Hidalgo C.O., Silvestre, M.A., Arrebola, F., Yániz J.L. 2013. Therio. 79: 436.
- Yániz, J.L., Vicente-Fiel, S., Capistrós, S., Palacín, I., Santolaria, P. 2012. Therio. 77: 1343-1350.

Agradecimientos: Los autores agradecen al CITA (DGA), SERIDA (Asturias), Explotaciones Ganaderas Estiche SL, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (CITA-IVIA) y al IFAPA (Córdoba) por su ayuda con la adquisición de muestras de semen. Este trabajo fue apoyado por el MINECO (concesiones IPT-010000-2010-33 y AGL2011-30353-C02-01) y la DGA-FSE (subvención A40).

Tabla 1. Medidas morfométricas del núcleo espermático (media $\pm$ desviación estándar) para cada subpoblación en las cuatro especies estudiadas.

Subpoblaciones detectadas	Área (μm^2)	Perímetro (μm)	Longitud (μm)	Anchura (μm)
Toro				
1-Grande	34,10 $\pm$ 1,79 ^a	24,07 $\pm$ 0,69 ^a	9,00 $\pm$ 0,30 ^a	4,81 $\pm$ 0,16 ^a
2-Pequeña y redondeada	30,08 $\pm$ 1,32 ^{bc}	22,80 $\pm$ 0,50 ^{bc}	8,59 $\pm$ 0,25 ^b	4,44 $\pm$ 0,16 ^b
3-Pequeña y alargada	30,33 $\pm$ 2,23 ^b	23,59 $\pm$ 0,87 ^d	9,04 $\pm$ 0,38 ^a	4,38 $\pm$ 0,24 ^b
4-Grande y alargada	33,03 $\pm$ 1,60 ^d	24,30 $\pm$ 0,62 ^a	9,31 $\pm$ 0,27 ^c	4,47 $\pm$ 0,15 ^b
Verraco				
1-Pequeña y alargada	26,58 $\pm$ 2,25 ^{ef}	22,11 $\pm$ 0,92 ^e	8,43 $\pm$ 0,42 ^b	3,93 $\pm$ 0,18 ^c
2-Grande	29,22 $\pm$ 1,38 ^c	22,47 $\pm$ 0,57 ^{ce}	8,46 $\pm$ 0,24 ^b	4,27 $\pm$ 0,18 ^d
3-Pequeña y redondeada	26,58 $\pm$ 1,44 ^{ef}	21,26 $\pm$ 0,49 ^f	7,93 $\pm$ 0,22 ^{de}	4,16 $\pm$ 0,18 ^e
Morueco				
1-Grande	32,53 $\pm$ 1,51 ^d	23,08 $\pm$ 0,57 ^b	8,52 $\pm$ 0,16 ^b	4,81 $\pm$ 0,20 ^a
2-Mediana	30,32 $\pm$ 1,09 ^b	22,19 $\pm$ 0,45 ^e	8,13 $\pm$ 0,16 ^f	4,72 $\pm$ 0,13 ^a
3-Pequeña	27,38 $\pm$ 1,21 ^f	21,45 $\pm$ 0,58 ^f	7,95 $\pm$ 0,22 ^e	4,38 $\pm$ 0,14 ^b
Macho cabrío				
1-Redonda	25,91 $\pm$ 1,33 ^e	20,72 $\pm$ 0,54 ^g	7,77 $\pm$ 0,22 ^d	4,15 $\pm$ 0,13 ^e
2-Alargada	24,69 $\pm$ 1,21 ^g	20,73 $\pm$ 0,46 ^g	7,94 $\pm$ 0,19 ^{de}	3,87 $\pm$ 0,13 ^c
3-Pequeña	22,68 $\pm$ 1,12 ^h	19,66 $\pm$ 0,43 ^h	7,42 $\pm$ 0,18 ^g	3,83 $\pm$ 0,13 ^c

^{a-h} - Denotan diferencias dentro de las columnas de $P < 0,05$.

A COMPARATIVE STUDY OF SPERM MORPHOMETRIC SUBPOPULATIONS IN CATTLE, GOAT, SHEEP AND PIGS USING THE CASMA-F METHOD

ABSTRACT: This study was designed to compare the sperm nuclear morphometric subpopulations of four species of domestic artiodactyls (cattle, sheep, goat and pigs). Samples from 20 males of each species were collected. Smears were fixed with 2% glutaraldehyde, stained with Hoechst 33342 and photographed. At least 200 spermatozoa per sample were processed using the Image J analysis open software. Clustering procedures were performed to identify sperm subpopulations using the morphometric data obtained from each species. Our results show that, applying the CASMA-F technology and multivariate cluster analyses, it was possible to determine the subpopulations of spermatozoa with different morphometric characteristics in the four species studied. When comparing sperm subpopulations in these four species, the bull and the boar had two clearly differentiated size categories: large and small. However, in small ruminant species, 3 sperm nucleus size categories were established: large, average size and small. Male variability was identified in the distribution of sperm subpopulations described in the four species studied. It was concluded that the combination of CASMA-F technology with multivariate cluster analyses allow the study of morphometric sperm subpopulations and that there are important variations in the subpopulations among the four species studied.

Keywords: artiodactyls, sperm morphometry, sperm subpopulations, ASMA.