

PREDICCIÓN DE LA CAPACIDAD FERTILIZANTE MEDIANTE ANÁLISIS POR DISTRIBUCIÓN EN CONTRACORRIENTE: CORRELACIÓN ENTRE VIABILIDAD Y HETEROGENEIDAD ESPERMÁTICA CON FERTILIDAD EN CAMPO

R. Pérez-Pé, E. Sevilla¹, Equipo Técnico de ANGRA, Equipo Técnico de Carnes-Oviaragón, S.C.L., J. A. Cebrián-Pérez, and T. Muiño-Blanco
Dep. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza. ¹CENSYRA, Movera (DGA). Zaragoza.

INTRODUCCIÓN

Los espermatozoides de un eyaculado presentan características muy heterogéneas, con importantes diferencias en cuanto a estructura y estado funcional. Una población espermática heterogénea tendrá mayor poder fertilizante que una homogénea, ya que aumenta la probabilidad de que la activación espermática se produzca en las inmediaciones del ovocito (1). Por ello, esta heterogeneidad poblacional es de gran importancia en la determinación del potencial fertilizante de una muestra seminal.

Dado que la heterogeneidad se manifiesta, entre otras características, en la diferente composición y estructura de la membrana, la distribución en contracorriente con centrifugación (CCCD) resulta de gran utilidad para analizar esta heterogeneidad, dada su capacidad para detectar pequeños cambios en la superficie celular.

En base a estos hechos, se planteó la posibilidad de aplicar la tecnología de CCCD para predecir la capacidad fertilizante de una muestra seminal. Se ha analizado la posible existencia de alguna correlación entre el porcentaje de fertilidad en campo y distintos parámetros obtenidos tras el estudio de las dosis seminales por CCCD.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se empleó semen ovino procedente de moruecos de raza "Rasa Aragonesa" estabulados en el Centro de Selección y Reproducción Animal de la Dirección General de Aragón (CENSYRA). Las extracciones se llevaron a cabo por personal técnico especializado de dicho centro mediante vagina artificial. El semen se mantuvo a 30°C en baño de agua hasta su llegada al laboratorio, momento en el que se determinó su motilidad, viabilidad y concentración como se describe previamente (2). La inseminación artificial la realizaron los equipos técnicos de ANGRA y Carnes Oviaragón en diferentes granjas pertenecientes a ambas cooperativas. El semen se diluyó hasta 800×10^6 sperm/ml, y se mantuvieron a 15°C hasta el momento de la inseminación. Se inseminaron 522 hembras con 53 eyaculados diferentes obtenidos a partir de 25 sementales, y muestras de los mismos eyaculados se utilizaron para los análisis de parámetros de calidad seminal y de CCCD.

El plasma seminal se eliminó por filtración en filtros Millipore de 5 μ m de poro, y las células se resuspendieron en medio de bifase. Sobre estas muestras se realizaron cromatografías de reparto en una unidad de distribución en contracorriente con centrifugación, cargando aproximadamente $1,25 \times 10^8$ células en las cámaras 0 y 30 de la unidad de CCCD. El sistema bifásico utilizado (3) se preparó para 3 experimentos, y se analizaron dos muestras simultáneamente; es decir, se estudiaron 6 eyaculados distintos en idénticas condiciones experimentales.

Los parámetros post-CCCD analizados se derivan del estudio del perfil de distribución obtenido. El nº total de células se llama *área celular total* (ACT), y el nº total de células viables se expresa como *área de viabilidad* (AV), la cual se dividió en 3 fracciones (V_1 , V_2 y V_3), correspondientes a las cámaras 0-9, 10-19 y 20-29, respectivamente. La *heterogeneidad* del perfil (H) se definió como el porcentaje de cámaras que contienen 50% o más células.

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó con el programa SAS (Institute Inc., NC). La ecuación predictiva de la fertilidad se determinó mediante análisis de regresión lineal múltiple.

RESULTADOS Y DISCUSION

La fertilidad en campo varió desde 12,5 hasta 75%, con un valor medio de 46,75%. Dada esta diferencia, los eyaculados se clasificaron en dos categorías según la fertilidad obtenida: mayor o menor que dicho valor medio. De los parámetros estándar analizados, el único que presentó correlación positiva (no significativa) con la fertilidad fue la viabilidad determinada después de la filtración (Tabla 1). Sin embargo, si se obtuvieron correlaciones significativas con los parámetros derivados del estudio por CCCD. La mayor correlación se encontró con el área de viabilidad, tanto total (AV, $r=0,40$) como en las cámaras centrales (V_2 , $r=0,44$), con un alto grado de significación ($p<0.001$). Además, este parámetro permitiría discriminar entre eyaculados de fertilidad alta o baja, respecto al valor medio de fertilidad obtenido en este estudio ($p=0.03$). Asimismo, la heterogeneidad del eyaculado también correlacionó con la fertilidad ($r=0.23$), con tendencia a la significación ($p<0.09$).

Tabla 1. Correlaciones entre parámetros espermáticos y fertilidad

<i>Parámetros</i>	r	p
(a) parámetros standard		
Concentración	-0.0114	0.935
Motilidad masal	-0.0225	0.873
Motilidad individual	-0.0341	0.808
Viabilidad inicial	-0.0722	0.607
Viabilidad post-filtration	0.1348	0.336
(b) parámetros post-CCCD		
Área celular total (ACT)	0.2091	0.133
Área de viabilidad total (AV)	0.4083	0.002
Área de viabilidad 1 (V_1)	0.2479	0.074
Área de viabilidad 2 (V_2)	0.4416	0.001
Área de viabilidad 3 (V_3)	0.0114	0.935
VA/TCA	0.2161	0.120
Heterogeneidad	0.2310	0.096

La Fig. 1 muestra 4 perfiles de distribución representativos de muestras de semen de alta fertilidad. Como característica general se observó un gran área de viabilidad, especialmente en las cámaras centrales (V_2), variando desde 5,69 a 6,81 cm^2 , excepto la muestra de la Fig. 2d. Este eyaculado obtuvo un 57,14% de fertilidad a pesar del menor valor de V_2 (3,86 cm^2), que podría explicarse por su alta

heterogeneidad (46.6%) la cual podría compensar la menor viabilidad. Las muestras de fertilidad baja, presentaron menores valores de V_2 y heterogeneidad en todos los casos.

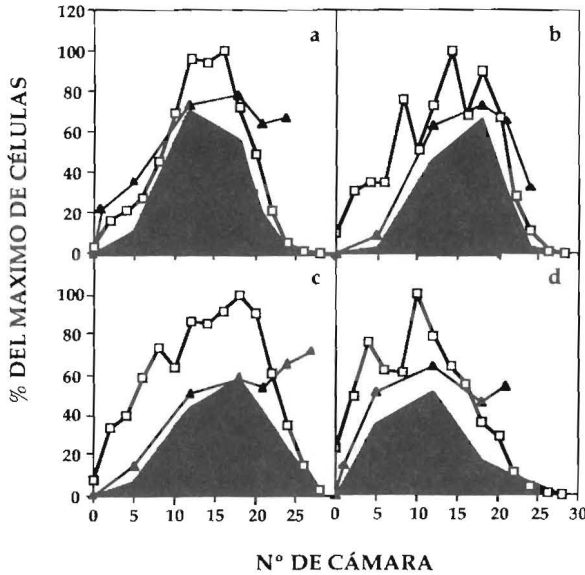


Fig. 1. Perfiles de CCD representativos de muestras de semen de fertilidad alta: (a) 75%, (b) 69,2%, (c) 62%, (d) 57,14% de fertilidad

Estos resultados indican que la heterogeneidad de una muestra seminal debe considerarse junto con la viabilidad recuperada tras el proceso de CCD. La heterogeneidad, aunque tiene una correlación positiva con la fertilidad, por sí sola no permite discriminar entre eyaculados con fertilidad mayor o menor que la media. Esto parece confirmar que, a pesar de la importancia de la heterogeneidad, no se debe olvidar la influencia de la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides, en la capacidad fertilizante. Es decir, que aunque una muestra espermática presente un elevado número de subpoblaciones celulares que difieren en su estado funcional, si la viabilidad (entendida como integridad de membrana) de estas subpoblaciones es baja, probablemente, la capacidad fertilizante de esta muestra será baja. De esta forma, la consideración conjunta de ambos parámetros se expresa en una ecuación de regresión respecto de la fertilidad con un altísimo nivel de significación ($p=0,0006$).

$$\text{Predicción de fertilidad} = 3,979 + 0,066V_2 + 0,304H$$

El hecho de que el valor del coeficiente de regresión múltiple obtenido ($R=0,50$) no sea muy alto, podría deberse a la gran cantidad de factores externos que afectarían a los resultados de fertilidad, tales como: la propia hembra, la inseminación de ovejas de distintas ganaderías, la variación en la distancia al punto de inseminación, la participación de distintos inseminadores, etc

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Amann R P, Hammerstedt R H, Veeramachaneni D N R. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 361-381.
- 2.- Pascual M L, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez J A, López-Pérez M J. *J Chromatogr* 1993; 617: 51-57.
- 3.- Ollero M, Cebrián-Pérez J A, Muiño-Blanco T. *J Androl* 1997; 18:732-739.

Este trabajo ha sido financiado por las ayudas: DGA 48/99 AV y CICYT AGL 2000-1221