

## ANÁLISIS INTEGRADO DE LA CALIDAD SEMINAL EN RUMIANTES

J.L. Yániz<sup>1</sup>, C. Soler<sup>2</sup>, C. Alquézar-Baeta<sup>3</sup>, P. Santolaria<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de investigación TECNOGAM, Instituto IUCA, Escuela Politécnica Superior de Huesca, Universidad de Zaragoza, Ctra. Cuarte S/N 22071 Huesca. [lyaniz@unizar.es](mailto:lyaniz@unizar.es)

<sup>2</sup>Departamento de biología celular, biología funcional y antropología física, Universidad de Valencia, Valencia

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Celular y Molecular, Instituto IUCA Universidad de Zaragoza, Zaragoza

### INTRODUCCIÓN

La capacidad predictiva del espermiograma sobre la fertilidad potencial del semen es todavía limitada (Rodríguez-Martínez, 2003; Santolaria et al., 2015), aunque puede mejorarse combinando diferentes tipos de análisis (Sellem et al., 2015; Utt, 2016). En consecuencia, la complejidad de los análisis del semen se ha incrementado progresivamente con la esperanza de mejorar las predicciones de fertilidad (Fraser et al., 2001; Yániz et al., 2008). Sin embargo, algunos de estos parámetros de calidad están altamente correlacionados, y el simple aumento del número de pruebas analíticas no siempre mejora la capacidad predictiva del espermiograma (Brito et al., 2003; Utt, 2016). Una limitación de las pruebas de calidad *in vitro* es que los diferentes parámetros se evalúan por separado sobre la muestra en su conjunto, perdiendo la capacidad de integrar las variables. El desarrollo de métodos de análisis de calidad seminal más integradores, que permitan evaluar diferentes parámetros simultáneamente, célula a célula, podría aportar información muy valiosa para el análisis de la funcionalidad espermática. En este trabajo presentamos un nuevo test multi-paramétrico capaz de discriminar diferentes subpoblaciones de espermatozoides en base a su patrón de fluorescencia y características de motilidad.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de semen congelado de 20 toros Frisones comerciales en los análisis. Las pajuelas con 0,25 ml de semen congelado se descongelaron durante 1 minuto a 37°C al baño maría y se procesaron para la evaluación de la calidad seminal. Las muestras se tiñeron con el kit ISAS@3Fun (Proiser, Paterna, España), desarrollado por el grupo de investigación TECNOGAM. En resumen, se pipetearon 40 µl de la muestra en viales de 1,5 ml, se añadieron 4 µl de la combinación fluorocromo proporcionada por el kit y se incubaron las muestras durante 5 minutos a 37°C en un baño maría. Las alícuotas de la muestra se colocaron directamente en un portaobjetos precalentado para evaluar la motilidad de las subpoblaciones espermáticas fluorescentes.

Las imágenes de los espermatozoides marcados con fluorescencia se obtuvieron utilizando un microscopio de epifluorescencia (DM4500B Leica, Wetzlar, Alemania) equipado con una base calefactada y un filtro de banda triple (filtro de banda triple B/G/R, Leica, Wetzlar, Alemania). Se utilizó una cámara CCD JenOptik ProgRes CF (JenOptik AG, Jena, Alemania) junto con el software de adquisición de imágenes Jenoptik Progress Capture Pro para la evaluación de la motilidad. La detección de las diferentes subpoblaciones fluorescentes y la evaluación de sus características de motilidad se realizó con el software ISAS® (ISAS®, Versión 1.1, PROISER, Valencia, España). Las variables de motilidad medidas incluyeron el porcentaje de espermatozoides móviles (MS,%), la velocidad curvilínea (VCL, µm / s), la velocidad rectilínea (VSL, µm / s), la velocidad de la trayectoria media (VAP, µm / s), la linealidad (LIN, VSL / VCL), la rectitud (STR, VSL / VAP), la oscilación (WOB, VAP / VCL) y la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH, µm).

Para un estudio más detallado de la morfología de las subpoblaciones espermáticas fluorescentes, se obtuvieron imágenes digitales a partir de muestras inmovilizadas con formaldehído. Para ello se utilizó el mismo microscopio descrito anteriormente, equipado con un objetivo plano 63X al que se incorporó una cámara Canon Eos 400D (Canon Inc., Tokio, Japón). La cámara se controló con un ordenador utilizando el software DSLR Remote Pro (Breeze Systems, Camberley, Reino Unido).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete SPSS, versión 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.). La normalidad de la distribución y la homogeneidad de varianza se verificaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Como

los datos de la motilidad espermática en las muestras fluorescentes teñidas no presentaron una distribución normal, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar la motilidad, seguida de la prueba a posteriori de Mann-Whitney.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nuevo método permitió una clara discriminación de las subpoblaciones espermáticas, basada en la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, la motilidad y la morfología. La subpoblación con membrana plasmática y acrosoma intactos mostró una mayor proporción de espermatozoides móviles que aquellos con acrosoma dañado o una mayor intensidad de fluorescencia. Los espermatozoides con plasmalema intacto y acrosoma dañado se encontraban inmóviles o exhibían un movimiento débil.

También fue posible observar espermatozoides vivos con signos de capacitación, como una motilidad hiperactivada, cambios en la estructura acrosomal y aumento de la actividad enzimática en acrosoma y flagelo. La hiperactivación del espermatozoide y la capacidad de someterse a la reacción acrosómica son dos signos determinantes de la capacitación. Este proceso fisiológico es un requisito previo para la fecundación, pero debe tener lugar en el tracto reproductivo femenino, no durante el enfriamiento o almacenamiento del semen (Del Valle et al., 2010). Se ha sugerido que el enfriamiento del semen puede inducir la formación prematura de espermatozoides (Watson, 1995), y su magnitud puede afectar la capacidad de fecundación del semen. En consecuencia, el estudio de este parámetro puede ser de interés en semen de toro criopreservado.

El nuevo método abre la posibilidad de evaluar simultáneamente los diferentes cambios asociados a la capacitación de los espermatozoides célula a célula. Concluimos que el ISAS@3Fun es un método integrado que representa un avance en el análisis de la calidad seminal con el potencial de mejorar las predicciones de fertilidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brito, L.F.C. 2003. *Theriogenology* 60, 1539-1551.
- Del Valle, I. 2010. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 260-268.
- Fraser, L. 2001. *Reprod. Domest. Anim.* 36, 325-329.
- Rodríguez-Martínez, H. 2003. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 312-318.
- Santolaria, P. 2015. *Anim. Reprod. Sci.* 163, 82-88.
- Sellem, E. 2015. *Theriogenology* 84, 1447-1454.
- Utt, M.D. 2016. *Anim. Reprod. Sci.* 169, 37-44.
- Watson, P.F. 1995. *Reprod. Fertil. Dev.* 7(4), 871-891.
- Yániz, J.L. 2008. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 184-184.

**Agradecimientos:** Este trabajo fue financiado por el MINECO Español (proyecto AGL2014-52775-P), y la DGA-FSE (proyecto A40).

## INTEGRATED SPERM ANALYSIS IN RUMINANTS

**ABSTRACT:** In this work, we present a new multi-parametric fluorescent test able to discriminate different sperm subpopulations based on their labeling pattern and motility characteristics. Cryopreserved semen samples from 20 Holstein bulls were multi-parametric assessed by the ISAS@3Fun kit. The new method allows a clear discrimination of sperm subpopulations based on membrane and acrosomal integrity, motility and morphology. It was also possible to observe live spermatozoa showing signs of capacitation such as hyperactivated motility, changes in acrosomal structure and increased enzymatic activity in acrosome and flagellum. Sperm subpopulation with intact plasma membrane and acrosome showed a higher proportion of motile sperm than those with damaged acrosome or increased fluorescence intensity. Spermatozoa with intact plasmalemma and damaged acrosome were static or exhibit weak movement. We concluded that the ISAS@3Fun is an integrated method that represents an advance in sperm quality analysis with the potential to improve fertility predictions.

**Keywords:** bull, semen, sperm quality, sperm subpopulations, multi-parametric