



# El espermatozoide porcino... ¿el tamaño importa?

● Iván Hernández Caravaca<sup>a,b</sup>, M. José Izquierdo Rico<sup>c,d</sup>, Francisco A. García Vázquez<sup>a,d\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, España; <sup>b</sup>Boehringer-Ingelheim, España; <sup>c</sup>Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, España; <sup>d</sup>Campus Mare Nostrum, Murcia, España.

## Introducción

La industria porcina se encuentra en un continuo crecimiento ya sea desde un ámbito sanitario, pasando por el económico y productivo y terminando con los aspectos reproductivos. Si nos paramos en éste último punto, la inseminación artificial es una técnica ampliamente aplicada en granja, donde más del 90% de las inseminaciones en Europa y Norte América son artificiales (Soriano-Úbeda *et al.* 2013), mientras que solo en un reducido porcentaje se sigue realizando la inseminación natural (zonas rurales y poco industrializadas).

Por otro lado, es sabido que de los millones de espermatozoides que se depositan en el tracto genital de la hembra (ya sea mediante inseminación natural o artificial), únicamente unos miles son capaces de llegar al lugar de fecundación, lo que supone una gran pérdida a lo largo del trayecto que el espermatozoide tiene que recorrer en el interior del tracto genital de la hembra (Holt *et al.*, 2009). Se han descrito algunos mecanismos por los cuales se produce esta reducción en la población espermática pero se desconoce si se trata de un proceso aleatorio o selectivo dependiendo de las características del eyaculado, o más concretamente, de las características intrínsecas que cada espermatozoide posee. De manera general, para la evaluación de la calidad seminal de un verraco se tienen en cuenta parámetros de concentración de espermatozoides en el eyaculado, motilidad espermática o presencia de morfoanomalías entre otros, pero poco es sabido sobre la función que podría tener la morfometría espermática, es decir el tamaño y forma del espermatozoide, sobre la calidad de un eyaculado y sobre su selección en el interior del útero de la hembra. Por tanto, ¿es importante tener en cuenta el tamaño y forma del espermatozoide en un eyaculado? ¿Importa el tamaño del espermatozoide en su habilidad de llegar a zonas cercanas a la fecundación?

## Objetivos

En el siguiente artículo, se compararon diferentes parámetros de morfometría entre los espermatozoides recolectados en el reflujos y los que se encontraron en la unión útero-tubárica con aquellos que conformaban la dosis seminal de inseminación. El propósito del estudio fue analizar si aquellos espermatozoides que eran eliminados en el reflujos o que alcanzaban el lugar

próximo a la fecundación en el útero de la cerda, presentaban unas características morfométricas determinadas.

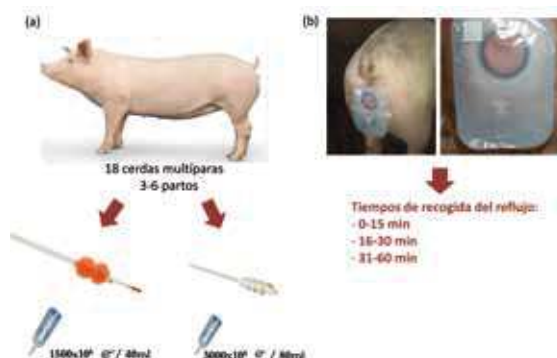
Con este propósito, este estudio se dividió en dos experimentos: En el experimento 1, se analizaron diferentes parámetros relacionados con la dimensión de la cabeza espermática y de la forma así como la longitud del flagelo, comparando aquellos espermatozoides en la dosis de inseminación con los que fueron recolectados en el reflujos.

En el experimento 2, se comparó la longitud del flagelo entre los espermatozoides recolectados en el reflujos, los que llegaron a la unión útero-tubárica (UUT) y los de la dosis seminal.

## EXPERIMENTO 1:

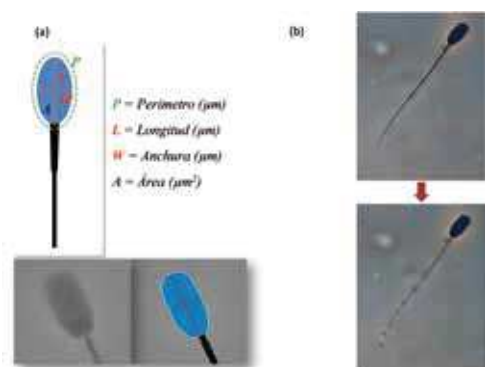
### Material y métodos

Para este experimento se utilizaron los eyaculados de 5 verracos adultos Duroc inseminándose 18 cerdas multiparas con paridades comprendidas entre los 3-6 ciclos de manera cervical (CAI) y poscervical (PCAI) (Figura 1a). Tras las inseminaciones se limpio cuidadosamente la zona perineal fijándose en la zona vulvar una bolsa de colostomía humana para la recogida del reflujos en diferentes tiempos (0-15, 16-30 y 31-60 min) (Figura 1b).



**Figura 1:** Diseño experimento 1. (a) Métodos de inseminación (inseminación cervical-CAI e inseminación post-cervical-PCAI) y dosis espermáticas utilizadas en el experimento. (b) Sistema de recogida de reflujos mediante bolsas de colostomía y esquema de los tiempos de recogida del mismo.

Posteriormente, las muestras de semen recogidas se fijaron y tiñeron con hematoxilina-eosina. Tras la tinción se evaluaron diferentes parámetros de dimensión de la cabeza [longitud-L ( $\mu\text{m}$ ), anchura-W ( $\mu\text{m}$ ), área-A ( $\mu\text{m}^2$ ) y perímetro-P ( $\mu\text{m}$ )] y parámetros de forma [factor de forma [ $4\pi \times A/P^2$ ] que representa como la cabeza del espermatozoide se aproxima a un círculo cuando su valor es cercano a 1, elipticidad (L/W), elongación [(L-W)/(L+W)] y regularidad [ $\pi \times L \times W/4 \times A$ ]] y comparados con los espermatozoides de las dosis originales. Para ello se utilizó un microscopio con cámara integrada conectada a un ordenador donde el módulo de morfometría del programa ISAS nos permitió tomar las dimensiones y forma de la cabeza del espermatozoide (Figura 2a). Por otro lado, para medir la longitud del flagelo del espermatozoide nos servimos del programa Image J (Figura 2b).



**Figura 2:** (a) Medición de la morfometría de la cabeza del espermatozoide a través del programa ISAS. En la imagen de abajo a la izquierda observamos la cabeza de un espermatozoide antes de su medición y a la derecha el espermatozoide marcado a través del programa informático para su evaluación morfométrica. (b) Medición de la longitud del flagelo del espermatozoide mediante el programa ImageJ.

## Resultados experimento 1:

Los resultados de dimensión y forma de la cabeza cuando comparamos los espermatozoides recogidos tras CAI con los espermatozoides de la dosis original se encuentran en la tabla 1 y 2. De manera general las dimensiones de las cabezas de los reflujos comparadas con las de las cabezas en la dosis original son más cortas, más estrechas, menor área y perímetro, es decir con unas dimensiones de la cabeza inferiores (Tabla 1). En relación a los parámetros de forma (Tabla 2), y siguiendo la misma tendencia que en el tamaño de la cabeza, observamos diferencias tanto en el factor de forma, la elipticidad, elongación así como en la regularidad, al comparar los espermatozoides del reflujos con los de la dosis de inseminación.

	Nº espermatozoides	Longitud (L)	Anchura (W)	Área (A)	Perímetro (P)
Dosis inseminación	600	9.08±0.36 <sup>a</sup>	4.41±0.22 <sup>a</sup>	34.08±2.13 <sup>a</sup>	24.48±0.76 <sup>a</sup>
Reflujo 0-15 min	600	8.89±0.49 <sup>b</sup>	4.34±0.32 <sup>b</sup>	32.85±3.45 <sup>b</sup>	24.01±1.19 <sup>b</sup>
Reflujo 16-30 min	600	8.82±0.47 <sup>b,c</sup>	4.25±0.29 <sup>c</sup>	32.17±3.07 <sup>c</sup>	23.82±1.06 <sup>c</sup>
Reflujo 31-60 min	600	8.79±0.41 <sup>c</sup>	4.18±0.29 <sup>d</sup>	31.58±2.90 <sup>d</sup>	23.67±1.05 <sup>c</sup>

**Tabla 1:** Parámetros morfométricos de la cabeza espermática (Media ± DE) en la dosis de inseminación y en los espermatozoides de reflujos recogidos a diferentes tiempos tras CAI (0-15, 16-30 y 31-60 min). Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).

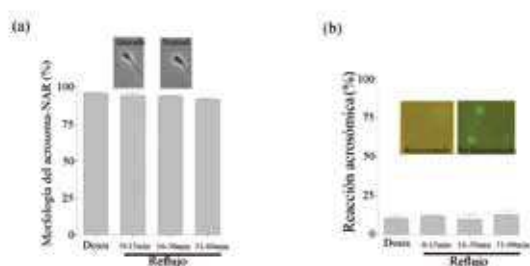
	Nº espermatozoides	Factor de forma	Elipticidad	Elongación	Regularidad
Dosis inseminación	600	0.714±0.02 <sup>a</sup>	2.062±0.11 <sup>a</sup>	0.346±0.02 <sup>a</sup>	0.923±0.02 <sup>a</sup>
Reflujo 0-15 min	600	0.714±0.02 <sup>a</sup>	2.055±0.12 <sup>a</sup>	0.344±0.02 <sup>a</sup>	0.924±0.02 <sup>a</sup>
Reflujo 16-30 min	600	0.711±0.02 <sup>ab</sup>	2.082±0.13 <sup>ab</sup>	0.349±0.02 <sup>ab</sup>	0.916±0.02 <sup>b</sup>
Reflujo 31-60 min	600	0.706±0.02 <sup>b</sup>	2.109±0.13 <sup>b</sup>	0.355±0.02 <sup>b</sup>	0.914±0.02 <sup>b</sup>

**Tabla 2:** Parámetros relacionados con la forma de la cabeza espermática (Media ± DE) en la dosis de inseminación y en los espermatozoides de reflujos recogidos a diferentes tiempos tras CAI (0-15, 16-30 y 31-60 min). Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ).

Los espermatozoides encontrados en el reflujos por tanto tienen una morfometría menor, estas diferencias pueden deberse a un proceso selectivo u a otros factores que modifiquen el espermatozoide dentro del útero. Para confirmar o desmentir esta última hipótesis valoramos diferentes causas que podrían modificar las dimensiones y forma de la cabeza de los espermatozoides una vez depositados en el interior del útero.

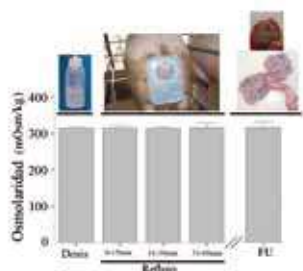


En primer lugar evaluamos si una modificación del estado del acrosoma era la causante de esta diferente morfometría. Estudiamos la morfología del acrosoma dividiéndolos en acrosomas normales y alterados en los diferentes tratamientos (acrosomas en dosis original y en reflujos a diferentes tiempos) (Figura 3a). Además se estudio si la reacción acrosómica podría ser también la causa de estas diferencias morfométricas (Figura 3b). Los resultados no mostraron diferencias entre los diferentes grupos, con lo que el acrosoma no podría explicar las diferencias encontradas entre las cabezas de espermatozoides en el reflujo y en la dosis original.



**Figura 3:** (a) Morfología normal del acrosoma (NAR) (%) y (b) reacción acrosómica (%) en espermatozoides de la dosis espermática y aquellos recogidos en el reflujo a diferentes tiempos tras la inseminación. Las barras quedan representadas por la media  $\pm$  EEM.

Otra de las hipótesis de trabajo es que la diferente osmolaridad en la dosis y en ambiente uterino podría modificar el espermatozoide por su capacidad de osmoreguladora. Así estudiamos la osmolaridad en la dosis original en los reflujos y en el fluido uterino-FU (recogidos de úteros en fase folicular tardía). Los resultados tampoco muestran diferencias significativas, con lo que la osmolaridad no estaría influyendo en las diferencias encontradas (Figura 4).



**Figura 4:** Osmolaridad en la dosis de inseminación, reflujo a diferentes tiempos tras la inseminación y fluido uterino-FU. Las barras quedan representadas por la media  $\pm$  DE.

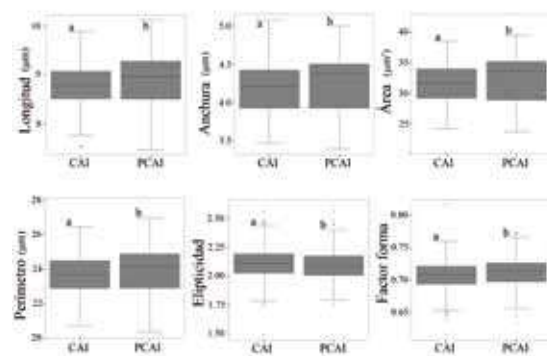
Para determinar si el fluido uterino-FU per se podía modificar la forma de la cabeza espermática se incubaron espermatozoides eyaculados con FU (20%) durante una hora que era el tiempo máximo que los espermatozoides reflujados pasaban en el útero de la cerda. Los resultados nos mostraron diferen-

cias entre los espermatozoides incubados con fluido uterino y los no incubados (Tabla 3), con lo que esta hipótesis también quedo descartada.

	Nº espermatozoides	Longitud (L)	Anchura (W)	Área (A)	Perímetro (P)
Espermatozoides	300	9.00 $\pm$ 0.32	4.39 $\pm$ 0.16	34.04 $\pm$ 1.53	24.29 $\pm$ 0.64
Espermatozoides + FU	300	9.02 $\pm$ 0.39	4.38 $\pm$ 0.16	33.87 $\pm$ 1.82	24.26 $\pm$ 0.81
p-valor	300	0.548	0.425	0.224	0.615

**Tabla 3:** Morfometría de la cabeza (Media  $\pm$  DE) en espermatozoides incubados o no con fluido uterino (FU)..

Por otro lado, se evaluó si el lugar de deposición influía en la morfometría de aquellos espermatozoides que se encontraban en el reflujo. Se compararon así las poblaciones reflujadas en cerdas inseminadas con inseminación cervical (CAI) vs. inseminación poscervical (PCAI) valorando así si el cérvix podría actuar como una barrera selectiva de espermatozoides basada en la morfometría de los mismos. Los resultados mostraron que los valores de dimensión de la cabeza de espermatozoides recogidos en el reflujo fueron superiores cuando se llevó a cabo la inseminación PCAI, así como los parámetros de forma evaluados también diferían según el lugar de deposición (Figura 5).

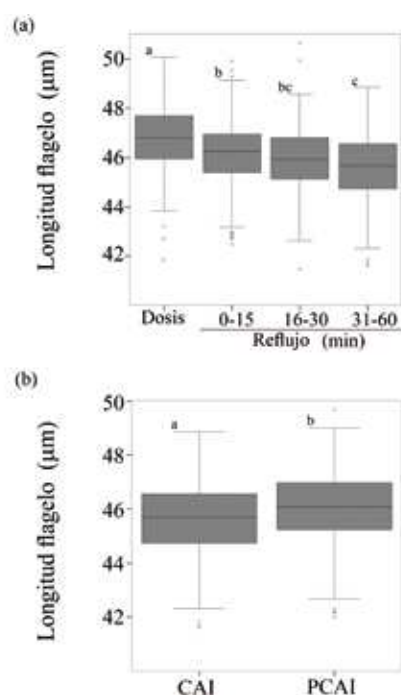


**Figura 5:** Efecto del lugar de deposición (cervical-CAI vs. postcervical-PCAI) sobre las dimensiones y forma de la cabeza del espermatozoide (longitud, anchura, área, perímetro, elipticidad y factor de forma) recogidos en el reflujo (31-60 min tras la inseminación). Diferentes letras en cada gráfico indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Los círculos representan valores atípicos. Los asteriscos representan valores atípicos extremos.

Finalmente, y correspondiente al experimento 1, se evaluó la longitud del flagelo. En primer lugar, se analizó la longitud



del flagelo en los espermatozoides del reflujo (depositados previamente en el cérvix, CAI) comparándolos con aquellos de la dosis seminal inicial. Los resultados (Figura 6a) mostraron que la longitud de la cola de espermatozoide en el reflujo eran de un tamaño inferior a los espermatozoides de la dosis (haciéndose más evidente según avanzamos en el tiempo de recogida de reflujo). En segundo lugar, se comparó si el lugar de deposición durante la inseminación (CAI vs. PCAI) influye en la longitud de cola de los espermatozoides encontrados en el reflujo, mostrando los resultados (Figura 6b) que tras una inseminación PCAI los espermatozoides del reflujo presentaban un tamaño de cola mayor que aquellos encontrados tras una inseminación CAI.

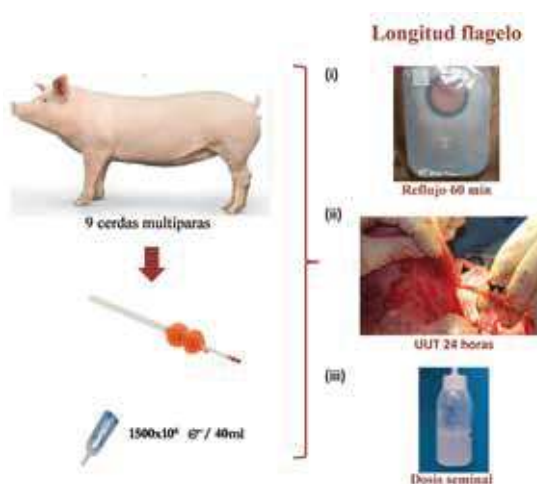


**Figura 6:** (a) Longitud de la cola en espermatozoides antes de la inseminación (dosis) y en el reflujo a diferentes tiempos tras CAI. (b) Comparación de la longitud de la cola en espermatozoides recogidos en el reflujo (31-60 min tras la inseminación) tras una inseminación CAI y post-CAI. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Los círculos representan valores atípicos. Asteriscos representan valores atípicos extremos.

## EXPERIMENTO 2

### Material y métodos

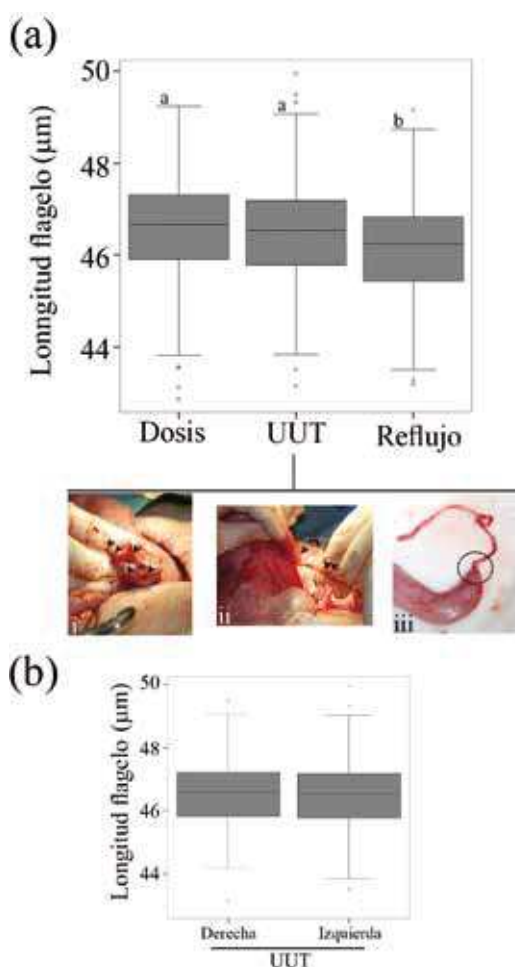
En este segundo experimento comparamos la longitud del flagelo entre los espermatozoides recolectados en el reflujo, los que llegaron a la UUT y los de la dosis seminal. A tal efecto se inseminaron de manera post-cervical 9 cerdas a las que se le realizó una cirugía 24 horas tras la inseminación para poder diseccionar la UUT y mediante lavados recuperar los espermatozoides de esta zona (Figura 7). Las longitudes de las colas de los espermatozoides de la dosis original, de reflujos y espermatozoides recuperados en la UUT se analizaron para ver si la longitud del flagelo influía en su selección a través del transporte espermático en el útero.



**Figura 7:** Diseño experimento 2. Las cerdas se inseminaron (PCAI) y posteriormente se recogieron los espermatozoides presentes en el reflujo (i) (durante 60 min) y aquellos que se encontraban en la UUT (ii) (a las 24 h tras la inseminación) para su posterior evaluación de la longitud del flagelo en comparación con la dosis seminal inicial (iii).

### Resultados experimento 2

Las longitudes de las colas en la UUT y en la dosis original no mostraron diferencias mientras que las longitudes de las colas de los espermatozoides encontrados en el reflujos resultaron ser más cortas (Figura 8a). Por otro lado, de los espermatozoides analizados en la UUT presentaban el mismo tamaño de cola aquellos que se encontraban en la UUT derecha que la izquierda (Figura 8b).



**Figura 8:** Longitud del flagelo en el útero. (a) Comparación de la longitud del flagelo en la dosis de inseminación, reflujo (60 min de recolección) y en el interior del útero UUT tras la inseminación. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Los círculos representan valores atípicos. i) Las flechas representan puntos de ovulación en el ovario de la cerda 24 h tras la inseminación; ii) Las flechas indican el oviducto y la UUT durante la cirugía; iii) El círculo representa el lugar de la UUT donde se realizó el lavado para la recolección de los espermatozoides. (b) Comparación de la longitud del flagelo en espermatozoides recolectados de la UUT derecha e izquierda. ( $p > 0.05$ ). Los círculos representan valores atípicos

## Discusión

Tras la deposición del gameto masculino en el tracto genital de la hembra una serie de interacciones comienzan a tener lugar entre el ambiente uterino y los espermatozoides. Cómo los espermatozoides son seleccionados en el interior del útero o si se modifican en su viaje al encuentro del ovocito son aspectos aún desconocidos.

De los resultados obtenidos en nuestro estudio podemos pensar en dos posibles explicaciones no exclusivas entre sí. En

primer lugar, que los espermatozoides con un menor tamaño son seleccionados en el interior del útero para ser eliminados a través del reflujo, ya sea por la selección propia del útero o por una competencia espermática dentro de un mismo eyaculado; en segundo lugar, que la dimensión del espermatozoide cambie a lo largo del útero debido a factores uterinos (por ejemplo, el ambiente uterino o interacciones celulares) o factores espermáticos que reduzcan dicha dimensión y modifiquen su forma, diferentes de aquellos factores que hemos comprobado en el presente trabajo (acrosomas, osmolaridad o fluido uterino).

Es conocido que el eyaculado está compuesto por diferentes subpoblaciones espermáticas con diferentes características (Holt y Van Look, 2004) y que esta heterogeneidad podría estar relacionada con la fertilidad. Otros autores (Vicente-Fiel et al., 2013) han observado diferentes subpoblaciones espermáticas basadas en la morfometría, y más concretamente en el caso del cerdo estas subpoblaciones fueron clasificadas como espermatozoides largos, pequeños y elongados y pequeños y redondos, sugiriendo algún tipo de implicación funcional. De hecho, Hirai et al. (2001) observaron que cuando el tamaño de la camada era superior a 10 lechones los espermatozoides utilizados en la inseminación tenían una mayor área y longitud de la cabeza y menos anchura que los espermatozoides que producían camadas de menos de 10 lechones. Aunque no existe una clara evidencia de las características especiales que tiene el espermatozoide capaz de fecundar, lo que sí parece es que la morfometría espermática podría tener un papel funcional relevante en este proceso.

Por otro lado, podría ser posible que la competición espermática en el interior del útero no solo dependa de las características intrínsecas del espermatozoide, sino que la hembra juegue un papel importante pudiendo seleccionar determinados espermatozoides (Calhim et al., 2007). De todos modos, el papel que la hembra tiene en la migración y selección espermática dentro del útero tras la eyaculación es poco conocido, y únicamente el influjo de leucocitos en la luz uterina y el reflujo son dos de los mecanismos conocidos en la pérdida de poblaciones de espermatozoides tras la inseminación (Hernández-Caravaca et al. 2012; Taylor et al. 2008, 2009). En este sentido las hembras pueden haber desarrollado otros mecanismos en contra de los espermatozoides no aptos para fecundar, incluyendo una selección espermática basada en la morfometría, como se ha visto que puede ocurrir con otros parámetros espermáticos como la morfología (García-Vázquez et al., 2015). De hecho, Holt et al. sugieren que el paso de espermatozoides hacia el lugar de fecundación no es un hecho tan simple como el de una carrera donde gana el espermatozoide más rápido (mayor motilidad), sino que deben



existir otros factores (por ejemplo: proteínas o modulación de genes) que podrían estar involucrados en este proceso.

## Conclusiones

La importancia y el papel que juega la variedad morfométrica de los espermatozoides en un eyaculado esta todavía sin resolver, por lo que todavía son necesarias futuras investigaciones que puedan clarificar la relación entre el trinomio morfometría-espermática, selección y fertilidad. En nuestro

estudio hemos demostrado la variación de subpoblaciones morfométricas presentes en un mismo eyaculado y como éstas pueden ser seleccionadas o modificadas tras la interacción con el ambiente uterino de la hembra. Quizás en un futuro no muy lejano la morfometría espermática sea un parámetro de evaluación rutinaria en los centros de inseminación para predecir la fertilidad de un eyaculado o incluso la selección de los verracos más fértiles basada en las características morfométricas de su eyaculado. 🐷



## BIBLIOGRAFÍA

Calhim S, Immler S, Birkhead TR. Postcopulatory sexual selection is associated with reduced variation in sperm morphology. *PLoS One* 2007; 2:e413.

García-Vázquez FA, Hernández-Caravaca I, Matás C, Soriano-Úbeda C, Abril-Sánchez S, Izquierdo-Rico MJ. Morphological study of boar sperm during their passage through the female genital tract. *J Reprod Dev.* 2015 Jun 26

Hernández-Caravaca I, Izquierdo-Rico MJ, Matás C, Carvajal JA, Vieira L, Abril D, Soriano-Úbeda C, García-Vázquez FA. Reproductive performance and backflow study in cervical and post-cervical artificial insemination in sows. *Anim Reprod Sci* 2012; 136:14-22.

Hirai M, Boersma A, Hoeflich A, Wolf E, Foll J, Aumüller TR, Braun J. Objectively measured sperm motility and sperm head morphometry in boars (*Sus scrofa*): relation to fertility and seminal plasma growth factors. *J Androl* 2001; 22:104-10.

Holt WV. Is semen analysis useful to predict the odds that the sperm will meet the egg? *Reprod Domest Anim* 2009; 44(Suppl 3): 31-8.

Holt WV, Van Look KJ. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 2004; 127:527-35.

Soriano-Úbeda C, Matás C, García-Vázquez FA. An overview of swine artificial insemination: retrospective, current and prospective aspects. *Journal of Experimental and Applied Animal Science* 2013 p. 67-97.

Taylor U, Rath D, Zerbe H, Schuberth HJ. Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage. *Reprod Domest Anim* 2008; 43:166-75.

Taylor U, Zerbe H, Seyfert HM, Rath D, Baulain U, Langner KF, Schuberth HJ. Porcine spermatozoa inhibit post-breeding cytokine induction in uterine epithelial cells in vivo. *Anim Reprod Sci* 2009; 115:279-89.

Vicente-Fiel S, Palacín I, Santolaria P, Yáñez JL. A comparative study of sperm morphometric subpopulations in cattle, goat, sheep and pigs using a computer-assisted fluorescence method (CASMA-F). *Anim Reprod Sci* 2013; 139:182-89.

\*Los resultados de este trabajo han sido previamente publicados:

**García Vázquez FA, Hernández Caravaca I, Yáñez Quintana W, Matás C, Soriano Úbeda C, Izquierdo Rico MJ.** Morphometry of boar sperm head and flagellum in semen backflow after insemination. *Theriogenology.* 2015 Sep 1;84(4):566-74. doi: 10.1016/j.theriogenology.