

INFLUENCIA DE DIFERENTES DILUYENTES DE PRECONGELADO EN EL CONGELADO/DESCONGELADO DE SEMEN PORCINO

Influence of different extenders in the freezing/thawing of boar semen

Jorge Suhevic^{3,5}, Daniela Malcervelli^{1,5}, Liliana González^{3,5}, Marcelo Acerbo^{2,6}, Marcelo Miguez^{2,6}, Claudio García⁵, Pablo Torres^{1,5}, María Laura Fischman^{4,5}, Humberto Cisale^{4,5}

<http://dx.doi.org/10.18548/aspe/0002.28>

¹ Veterinario

² Especialista,

³ Magister,

⁴ Doctor,

⁵ Cátedra Física Biológica, INITRA,

⁶ Cátedra de Producción Porcina,
Facultad de Ciencias Veterinarias,
Universidad de Buenos Aires,
Proyecto UBACyT
20020130100648BA.
Buenos Aires, Argentina.

E-mail: jsuhevic@fvet.uba.ar

RESUMEN

La utilización de la inseminación artificial en la especie porcina se ha incrementado enormemente en los últimos años. Cuando se utiliza semen congelado se obtienen bajos porcentajes de concepción en comparación con los obtenidos con semen fresco o refrigerado. El objetivo de este trabajo fue comparar el efecto de diferentes diluyentes comerciales para semen refrigerado en el proceso de congelado y descongelado. Se utilizaron tres diluyentes de larga duración (Mr-A[®], Androstar[®] y Porci-Star[®]) y uno de mediana duración (M III[®]). Se evaluaron: movilidad, integridad y funcionalidad de membrana plasmática e integridad acrosómica, en cuatro etapas diferentes del proceso. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros de calidad evaluados por lo que los diferentes prediluyentes no afectarían el proceso de congelado

Palabras clave: *diluyentes, semen, porcino, congelado-descongelado*

ABSTRACT

Artificial insemination in pigs has increased enormously in the last years. When performed using frozen/thawed semen low conception rates are obtained, compared with those of fresh or cooled semen. The aim of this study was to compare the effect of different commercial extenders for cooled semen in the freezing/thawing process. Three long term extenders (MR-A[®], Androstar[®] and Porci-Star[®]) and one medium term (M III[®]) were used. We evaluated: motility, integrity and functionality of the plasmatic membrane and acrosomal integrity in

four different stages of the process. No significant differences in the quality parameters were found, so the different extenders do not affect the freezing process.

Keywords: *extenders, semen, pig, frozen-thawed.*

INTRODUCCIÓN.

El uso de la inseminación artificial (IA) en la producción porcina se ha incrementado enormemente durante los

últimos años. En la actualidad se estima que más de un tercio de las cerdas madres en el mundo son inseminadas artificialmente. En la mayor parte de los casos la IA se realiza con semen refrigerado a 16-17°C. Esto es debido a que con semen congelado-descongelado se obtienen una menor tasa de preñez, o de camada, que al utilizar semen refrigerado (Zeng *et al.*, 2014).

El plasma seminal por sí solo no permite la conservación del eyaculado (Vilagran *et al.*, 2015). Se le debe añadir un diluyente adecuado con el fin de prolongar la sobrevivencia espermática y mantener su capacidad fecundante. Los diluyentes se clasifican en: corta duración (conservan la calidad del semen hasta 48 horas), media duración (hasta 4 días) y larga duración (hasta 7 días). Los espermatozoides porcinos son sensibles al choque por frío, debido a la composición de su membrana plasmática (proporción de fosfolípidos, ácidos grasos saturados e insaturados y colesterol), observándose alteraciones en la funcionalidad, permeabilidad y fluidez de la misma (Buranaamnuay *et al.*, 2009). Ésta es una de las razones que explica la dificultad para la criopreservación de dichos espermatozoides, y la menor fertilidad y prolificidad obtenidas al inseminar cerdas con semen congelado con respecto al semen refrigerado (Rath *et al.*, 2009). Si bien se han intentado optimizar los sistemas de congelación, todavía hay diversos aspectos que deben mejorarse sensiblemente para que esta técnica tenga impacto comercial.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la posible influencia de los prediluyentes sobre la calidad seminal porcina a lo largo de la curva de enfriamiento y luego del congelado-descongelado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la muestra y evaluaciones de la calidad seminal

Se obtuvieron 18 eyaculados de 4 verracos cruce Austral (1/3 Large White, 1/3 Pietrain y 1/3 Hampshire), estabulados en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires, alimentados con una dieta balanceada a base de maíz y expeler de soja. El semen fue obtenido por la técnica de la mano enguantada (Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio CICUAL), utilizándose solamente la fracción rica del eyaculado. La calidad seminal fue evaluada teniendo en cuenta las características físicas del semen, la movilidad espermática (microscopio de contraste de fase y

platina térmica a 200X), la integridad de la membrana plasmática (coloración vital con Eosina/Nigrosina, 1000X), la integridad acrosómica (muestras fijadas con solución salina formolada y observada con microscopio de contraste de fase a 1000X) y la funcionalidad de la membrana plasmática (prueba de endósmosis, microscopio de contraste de fase a 400X). La concentración espermática se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer®, dilución 1:200 en solución salina formolada.

Diseño experimental

La curva de enfriamiento se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Westerndorf *et al.* (1975) modificado según Almid y Johnson (1988). El semen fresco se separó en 4 fracciones y cada una fue diluida en partes iguales con un diluyente comercial diferente para conservar semen porcino refrigerado. Se seleccionaron para esto tres diluyentes de larga duración: Mr-A® (tratamiento A), Androstar® (tratamiento B) y Porci-Star® (tratamiento D); y uno de duración media, M III® (tratamiento C). De los diluyentes escogidos, sólo el diluyente D contiene trehalosa en su composición. Las muestras fueron estabilizadas durante 2 horas a 17°C (etapa 1). Luego fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 15 minutos y resuspendidas (1:1) en un diluyente de congelamiento estandarizado en nuestro laboratorio a base de lactosa 11%, yema de huevo 10% y Equex® 1,13%. Se efectuó una segunda estabilización a 17°C durante 2 horas (etapa 2).

Las dosis fueron enfriadas hasta 5°C siguiendo una curva de enfriamiento rápida (0,2°C/min), estabilizándose nuevamente durante 2 horas. Luego se agregó el diluyente de congelación (lactosa 11%, yema de huevo 10% y glicerol 3%), dilución 1:1, a 5°C (etapa 3). Las muestras fueron envasadas en pajuelas de 0,5 ml a una concentración final de 1,5 x 10⁹ espermatozoides/pajuela. Las dosis se estabilizaron durante 10 minutos y se llevaron a un freezer a -70°C, 20 min. Finalmente, las pajuelas se introdujeron en nitrógeno líquido (-196°C). Las muestras fueron descongeladas a los 30 días en baño térmico a 37°C/30seg (etapa 4). Se evaluó movilidad progresiva, integridad y funcionalidad de membrana plasmática e integridad acrosómica en cada una de las etapas.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con la prueba de Kruskal Wallis. Se aplicó la comparación de varianzas, por etapa, y para la misma variable. Los tratamientos se evaluaron de a pares entre sí. Finalmente se

compararon las varianzas del semen fresco y de todas las etapas para los diferentes tratamientos. Se utilizó el programa estadístico Statistix 7.0.

RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras tratadas con los diferentes diluyentes (A, B, C y D); para cada una de las etapas.

La mayor caída en la movilidad se produjo en la etapa 1 del proceso de congelado (Figura 1), para todos los tratamientos.

Con respecto a la funcionalidad de la membrana plasmática, no hubo diferencias significativas entre

tratamientos en ninguna de las etapas ($p > 0,05$). En todos los casos, la mayor caída de la funcionalidad se produjo en la etapa 4 del proceso, ver Figura 2.

El porcentaje de espermatozoides con su membrana plasmática íntegra disminuyó abruptamente en la etapa 4 en todos los tratamientos por igual ($p < 0,05$) (Figura 3).

No se encontraron diferencias significativas en la integridad de la membrana acrosomal para los distintos tratamientos en las diferentes etapas ($p > 0,05$). La mayor caída se produjo en la etapa 4 para todos los tratamientos (Figura 4).

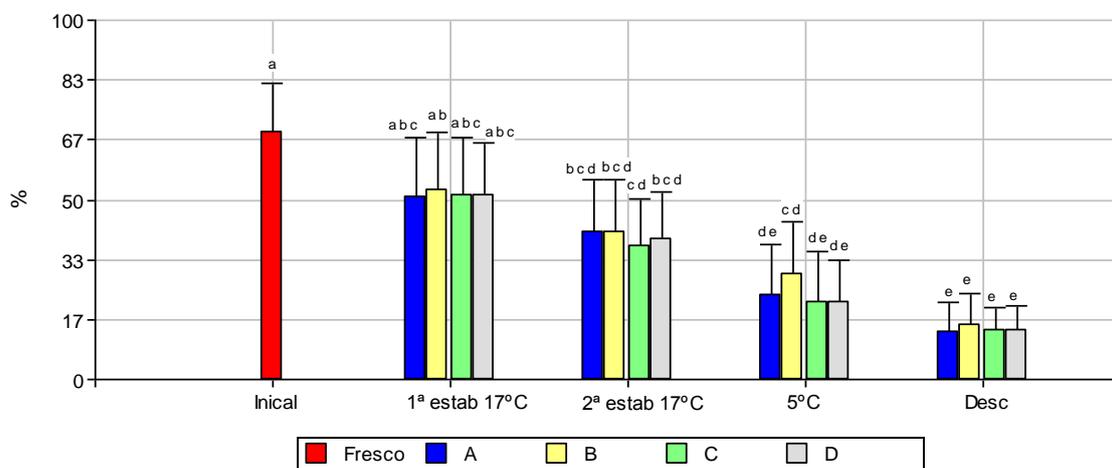


Figura 1: Movilidad espermática (%). Valores promedio con sus desvíos estándar en semen fresco (0) y para los distintos tratamientos (A, B, C y D) en las cuatro etapas del proceso de congelado-descongelado. Letras iguales significan que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$)

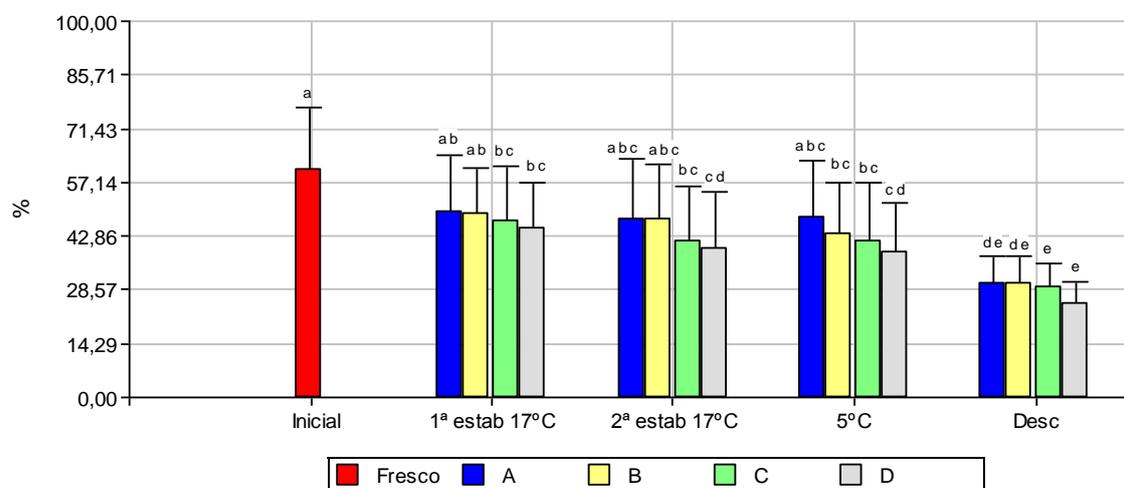


Figura 2: Funcionalidad de membrana plasmática (% HOS+). Valores promedio con sus desvíos estándar en semen fresco (0) y para los distintos tratamientos (A, B, C y D) en las cuatro etapas del proceso de congelado-descongelado. Letras iguales significan que no hay diferencias significativas ($p>0,05$).

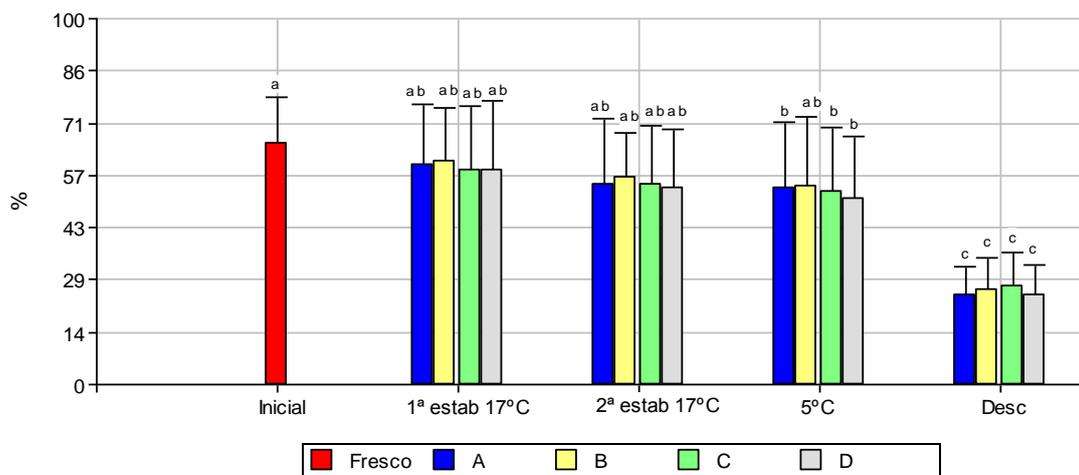


Figura 3: Integridad de la membrana plasmática (%). Valores promedio con sus desvíos estándar en semen fresco (0) y para los distintos tratamientos (A, B, C y D) en las cuatro etapas del proceso de congelado-descongelado. Letras iguales significan que no hay diferencias significativas ($p>0,05$).

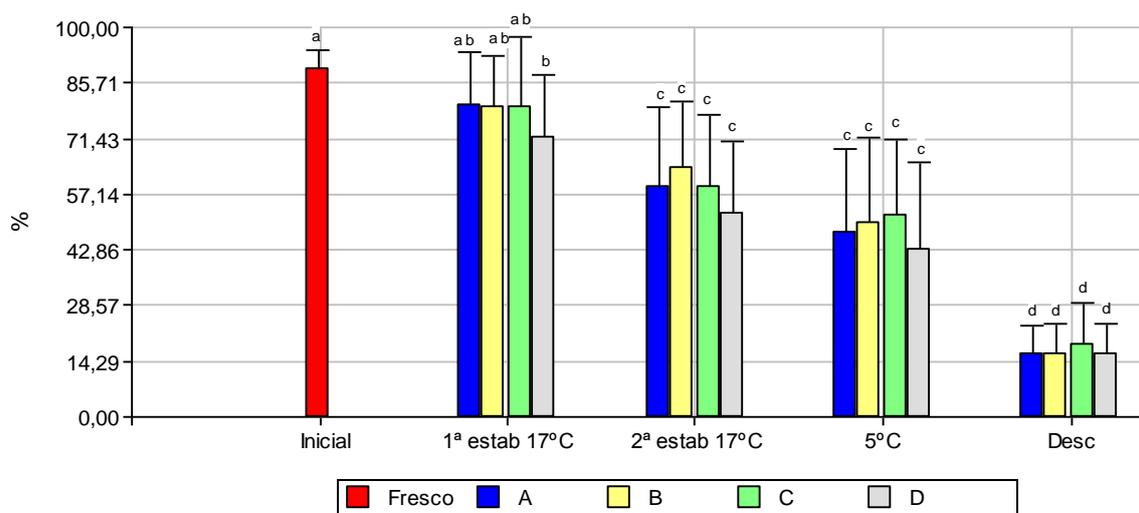


Figura 4: Integridad de la membrana acrosomal (% intactos). Valores promedio con sus desvíos estándar en semen fresco (0) y para los distintos tratamientos (A, B, C y D) en las cuatro etapas del proceso de congelado-descongelado. Letras iguales significan que no hay diferencias significativas ($p>0,05$).

DISCUSIÓN

Una buena valoración de la calidad seminal requiere la consideración de varios parámetros diferentes. A lo largo de la curva de enfriamiento los espermatozoides sufrieron diferentes alteraciones, que podrían deberse tanto a daños traumáticos por la centrifugación (entre etapas 1 y 2) como a la disminución de la temperatura

por debajo del punto crítico, 14°C (entre etapas 2 y 3). Los mayores daños sobre las membranas se evidenciaron al evaluar el semen al descongelado (etapa 4). Esto puede significar que el daño se produjo al descender la temperatura por debajo de los 5°C o en el proceso de descongelado hasta los 37°C. No se observó una mejora en la integridad de la membrana acrosomal de los espermatozoides tratados con el

diluyente D, a pesar de presentar trehalosa en su composición, un azúcar que en algunos estudios demostró proteger mejor las membranas durante la congelación (Jian-Hong Hu *et al.*, 2009).

CONCLUSION

El presente trabajo permitió determinar que ninguno de los cuatro prediluyentes utilizados presentó diferencias significativas, cuando se evaluó la calidad seminal porcina, en las distintas etapas de la curva de enfriamiento y luego del congelado-descongelado, para el protocolo utilizado en nuestro laboratorio.

REFERENCIAS

- Almlid T, Johnson LA. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on posthaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Journal of Animal Science* 1988; 66, 2899-2905.
- Buranaamnuay K, Tummaruk P, Singlor J, Rodriguez-Martinez H, Techakumphu M. Effect of straw volume and Equex-STM on boar sperm quality after cryopreservation. *Reprod Domest Anim* 2009; 44, 69-73.
- Jian-Hong H, Qing-Wang L, Gang L, Zhong-Liang J, Shu-Hai B, Hai, Y and Li-Qiang W. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Animal Reproduction Science* 2009; 112 (1-2): 107-118.
- Rath D, Moench-Tegeder G, Taylor U, Johnson LA. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology* 2009; 71, 22-29.
- Vilagran I, Yeste M, Sancho S, Castillo J, Oliva R, Bone S. Comparative analysis of boar seminal plasma proteome from different freezability ejaculates and identification of Fibronectin 1 as sperm freezability marker. *Andrology* 2015; 3(2):345-56.
- Westendorf P, Richter L, Treu H. Zur tiefgefrierung von ebersperma: labor und besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger pailletten verfahren. *Dtsch Tierarztl Wschr* 1975; 82, 261-267.
- Zeng C, Keyi T, Wenpei Peng L, Ding L, Fang D, Zhang Y. Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation *Cryobiology* 2014; 68(3):395-404.