

COMPARACIÓN DE DILUYENTES PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN PORCINO

J.A Benítez, J.A. Hernández-Ballesteros, C. Lemus, María Guadalupe Orozco y R. Navarrete

Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Nayarit. Compostela. Nayarit, México
email: joalbm_22@yahoo.com.mx

RESUMEN

Se compararon cuatro diluyentes para la criopreservación de semen porcino. Para el congelamiento del semen, se emplearon cuatro tratamientos: Westendorf modificado, Thilmant, trehalosa con glicerol y trehalosa sin glicerol. Se estudió la motilidad, espermatozoides vivos, normales e integridad acrosomal en el semen fresco y descongelado. Se utilizaron pajillas de 0.5 mL y se descongeló a una temperatura de 56°C durante 12 segundos. Se evaluaron 10 eyaculados del mismo semental, examinando 10 pajillas de cada eyaculado en cada tratamiento. Para las variables de calidad espermática se realizó análisis de varianza bajo un modelo de bloques anidados en cada tratamiento.

Al comparar los valores globales del semen fresco con los del semen descongelado, se halló diferencia significativa ($P < 0.05$) para la motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma íntegro. Para espermatozoides normales, no se encontró diferencia. ($P > 0.05$) entre tratamientos. Para las variables de motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con acrosoma íntegro en el semen descongelado, se encontró diferencia significativa ($P < 0.01$) entre los cuatro tratamientos, presentándose los valores más altos en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y trehalosa con glicerol, y el valor más bajo se obtuvo en el diluyente de trehalosa sin glicerol. En los espermatozoides normales no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos.

En conclusión, si se afectó la calidad espermática del semen porcino criopreservado en diluyentes que difieren en su composición.

Palabras claves: cerdos, diluyentes, calidad espermática, conservación

Título corto: Diluyentes en la crioconservación de semen porcino

COMPARISON OF EXTENDERS FOR CRIOPRESERVATION OF PIG SEMEN

SUMMARY

Four extenders for cryoconservation of pig semen were compared. Four treatments were used for freezing semen: Westendorf modified, Thilmant, and trehalose with or without glycerol. A study was made of live and normal spermatozooids, and accrosomal integrity of fresh and thawed semen. Straws of 0.5 mL were utilized and thawing was conducted at 56°C during 12 seconds. Ten ejaculates from the same sire were evaluated, examining 10 straws from every ejaculate per treatment. Semen quality variables were compared following an analysis of variance according to a nested block model in every treatment.

When overall values of fresh and thawed semen were compared, significant ($P < 0.05$) differences were encountered for motility, alive spermatozooids and spermatozooids with intact accrosoma. There were no significant ($P < 0.05$) differences among treatments for normal spermatozooids. There were significant differences ($P < 0.01$) among treatments in thawed semen for motility, alive spermatozooids and spermatozooids with intact accrosoma, showing higher values for Thilmant, Westendorf modified and trehalose with glycerol extenders, and the lowest values in trehalose with glycerol. There were not significant ($P > 0.05$) effect of treatment in normal spermatozooids.

In conclusion, pig semen quality was affected when cryopreserved with extenders varying in its composition.

Key words: pigs, extenders, semen quality, conservation

Short title: Extenders for pig semen cryoconservation

INTRODUCCIÓN

La conservación de material biológico mediante la congelación tiene una gran cantidad de aplicaciones en las distintas disciplinas de las ciencias biológicas, puesto que el material puede ser almacenado por mucho tiempo sin modificar sus características originales (Hafez 1997).

Se han desarrollado diversos protocolos para la congelación del semen, que han incluido el estudio de distintas combinaciones de diluyentes, crioprotectores, tasas de enfriado, condiciones del proceso de congelación y descongelación; además la concentración espermática. Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, no ha sido posible abatir la baja fertilidad característica del semen descongelado en la especie porcina, causada por una combinación de efectos en la fisiología y morfología de los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación (Medrano y Holt 1998). Estos estudios han sido realizados también en nuestro laboratorio (Benítez et al 2009; Navarrete et al 2010; Orozco et al 2011).

Aunque los estudios y modificaciones más recientes en las técnicas de congelación y aplicación de semen congelado han mejorado significativamente los resultados de fertilidad y prolificidad, las investigaciones deben continuar con el fin de minimizar los daños de la congelación sobre la célula espermática, así como encontrar nuevos métodos para valorar la viabilidad y capacidad fecundante del semen descongelado (Pallas y De Alba 2003). El objetivo de este trabajo fue comparar diferentes diluyentes para la criopreservación de semen porcino evaluando su calidad espermática.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Reproducción Animal, de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad.

Se evaluaron 10 eyaculados de un mismo semental, evaluándose 10 pajillas de cada eyaculado en cada tratamiento. Las variables a medir fueron la motilidad espermática, porcentaje de espermatozoides vivos/muertos, porcentaje de espermatozoides normales/anormales (morfoanomalías) y porcentaje de integridad acrosomal.

Para comparar la calidad espermática en la criopreservación de semen porcino se formaron cuatro tratamientos consistente en el uso de distintos diluyentes: dextrosa (Westendorf modificado por Roca et al 2003), fructosa (Thilmant 1997, trehalosa con glicerol y trehalosa sin glicerol.

La extracción del semen se realizó de un semental Pietrain x Yorkshire por medio de la técnica de mano enguantada. Sólo se colectó la porción rica en espermatozoides y se realizaron las evaluaciones macroscópicas (volumen, temperatura, color y pH) y microscópicas (motilidad, concentración, relación de espermatozoides vivos/muertos, normales/anormales e integridad acrosomal) del eyaculado. Se utilizó la tinción de eosina/nigrosina para valorar la vitalidad (vivos/muertos) y las morfoanomalías.

Para determinar la integridad acrosomal se empleó la técnica de Talbot y Chacón (1981). Para el proceso de congelamiento

de semen, se emplearon cuatro diluyentes que fueron diferentes en su composición, cada uno se subdividió en dos fracciones, que se identificaron como fracción A (diluyente de refrigeración) y B (diluyente de congelación).

El semen fue descongelado posterior a 15 días de su congelación. La descongelación se realizó en un baño de María a una temperatura de 56°C durante un tiempo de 12 segundos. De cada una de las pajillas descongeladas, se tomaron 100 µL para realizar la evaluación de integridad acrosomal, se tomó una gota para evaluar la motilidad y otra gota para hacer un frotis con eosina/nigrosina.

El experimento se condujo de acuerdo con un diseño en bloques al azar, considerando a cada eyaculado como bloque anidado en cada uno de los cuatro tratamientos. Los datos fueron manipulados mediante un paquete estadístico ad hoc (SAS 2009) para efectuar un análisis de varianza según una clasificación simple y se empleó la dócima de Duncan para establecer las diferencias entre medias (Steel y Torrie 1980).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se compararon los valores del semen fresco con los parámetros de calidad espermática para determinar si los eyaculados eran criopreservados. En la tabla 1, se muestran los valores medios globales obtenidos para las variables de calidad espermática evaluadas en el semen recién eyaculado.

Tabla 1. Valores globales para las variables evaluadas en el semen porcino fresco¹

Variables	Media	DE ±
Motilidad, %	87.5	2.6
Espermatozoides		
Vivos; %	82.8	2.8
Normales, %	89.0	1.8
Integridad acrosomal, %	77.0	3.7

¹ n = 10

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación del semen, se procedió a criopreservar los 10 eyaculados.

Poto et al (2000) y Rozeboom (2000) informaron que un eyaculado de buena calidad debe tener como mínimo 80% de espermatozoides con movimiento progresivo, 70-80% de células espermáticas vivas y un máximo de 20% de espermatozoides anormales para ser considerado apto para su congelación. Martín et al (1996) mencionan que para que una muestra de semen pueda ser considerada para la criopreservación, deberá mostrar al menos 70% de espermatozoides con acrosomas normales.

Los parámetros de calidad de semen evaluados después del proceso de congelación/descongelación se muestran en la tabla 2. Se puede observar que en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y con trehalosa con glicerol se obtuvieron los mayores porcentajes de motilidad, espermatozoides vivos y espermatozoides vivos con integridad acrosomal ($P < 0.01$). Los resultados demuestran que estos tres diluyentes que contenían glicerol tuvieron mejor capacidad

para proteger a los espermatozoides durante la criopreservación en comparación con el diluyente de trehalosa sin glicerol. La variable porcentaje de espermatozoides normales no fue afectada significativamente ($P > 0.01$) en los diferentes diluyentes. El tipo de azúcar en los diluyentes Thilmant, Westendorf modificado y trehalosa con glicerol, no influyó significativamente ($P > 0.05$) en los parámetros de calidad evaluados en este estudio (tabla 2)

Tabla 2. Parámetros de calidad de semen porcino evaluados después del proceso de congelación/descongelación con diferentes diluyentes

Variables	Diluyentes				DE ±
	Thilmant	Westendorf modificado	Trehalosa con glicerol	Trehalosa sin glicerol	
Motilidad, %	34.80 ^a	30.10 ^a	28.95 ^a	11.55 ^b	7.23**
Espermatozoides					
Vivos, %	40.06 ^a	36.52 ^a	38.95 ^a	20.12 ^b	7.12**
Normales, %	85.87 ^a	85.86 ^a	85.46 ^a	85.19 ^a	1.02**
Integridad acrosomal, %	26.55 ^a	25.85 ^a	25.16 ^a	13.54 ^b	3.65**

** $P < 0.01$

^{ab} Medias sin letras en común en la misma fila difieren significativamente ($P < 0.05$) entre sí

Los mejores valores de motilidad fueron similares a los hallados por Bathgate et al (2006), quienes analizaron la motilidad en espermatozoides criopreservados de porcinos, realizaron tres evaluaciones para la motilidad; a los 10 minutos, tres y seis horas de descongelado e incubado el semen a 37°C. Para sus mejores resultados, estos investigadores informaron un 33% para motilidad espermática a los 10 minutos de descongelado el semen, también observaron motilidades de 10 y 2% a las tres y seis horas de incubado, respectivamente.

Los resultados de la variable espermatozoides vivos obtenidos fueron ligeramente inferiores a los obtenidos por Guzmán (2003), quien halló porcentajes de espermatozoides vivos de 49.4, 46.0, 40.4 y 38.5, cuando las dosis fueron almacenadas por ocho, 15, 21 y 30 días, respectivamente, concluyendo en su investigación, que los valores de espermatozoides vivos fueron disminuyendo conforme fue transcurriendo el tiempo de conservación.

Los valores de espermatozoides vivos fueron similares a los de Waterhouse et al (2006), ya que al evaluar la tolerancia a la congelación de semen de cerdo de diferentes razas, observaron que después de la congelación-descongelación los porcentajes de espermatozoides vivos se redujeron muy significativamente, 48.9 y 45.6%, comparándolo con el semen fresco, para las razas Landrace y Duroc, respectivamente.

Poto et al (2000) encontraron valores medios de 59 y 33% para espermatozoides con acrosomas normales al comparar los métodos de congelación de semen propuestos por Thilmant contra el utilizado por Westendorf, respectivamente. En otra investigación realizada por Gosálvez et al (2003), al evaluar los acrosomas normales en muestras de semen descongelado a diferentes temperaturas y tiempos, informaron 36.2% para los mejores valores medios que obtuvieron al hacer dicha evaluación. Por otra parte, Thilmant (1997) evaluó el efecto de la adición del detergente Equex STM en el diluyente para la congelación de semen de cerdo y determinó el porcentaje de acrosomas intactos en espermatozoides descongelados, y así obtuvo valores medios de 56 y 30% para

el semen congelado en diluyentes con y sin Equex STM, respectivamente.

En conclusión, se sugiere que sí se afecta la calidad espermática del semen porcino criopreservado en diluyentes que difieren en su composición. Con respecto a los resultados obtenidos en esta investigación, se observó que los diluyentes que contienen glicerol (crioprotector permeable) presentan los mejores valores de calidad espermática, por lo que se recomienda el uso de estos diluyentes para la criopreservación de semen porcino.

REFERENCIAS

- Bathgate, R., Maxwell, W.M.C. y Evans G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro on post-thaw sperm quality. *Reproduction of Domestic Animals*, 41:68 - 73
- Benítez, J.A., Navarrete, R., Lemus, C., Rueda, M., Arias, T. y Hernández, J.A. 2009. Cambios de la motilidad en la prueba de termorresistencia empleando diferentes diluyentes para la criopreservación de semen porcino. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 16:31-34
- Gosálvez, L.F., Vidal, A., Valdelvira, J. y Babot, D. 2003. Influencia del tiempo de crioconservación y temperatura de descongelación de dosis seminales porcinas heterospermicas con baja calidad. *Archivos de Zootecnia*, 52:81-84
- Guzmán, A.L.E. 2003. Evaluación de una técnica para la crioconservación del semen porcino. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, pp 55
- Hafez, E.S.E. 1997. *Reproducción e Inseminación en Animales*. Editora Interamericana. Ciudad de México, p 632 - 644
- Martín, R.S., Pintado, B., De Alba, C., Sánchez, R., García, P., Corcuera, D., Artiga, C., Sagües, A., Díaz, C., Sáiz, F. y Pérez,

M.C. 1996. Effect of cooled and frozen boar semen on embryo development. *Reproduction of Domestic Animals*, 31: 309–310

Medrano, A. y Holt, W.V. 1998. Variación individual en la susceptibilidad del semen porcino al congelado-descongelado. *Archivos de Zootecnia*, 47:319–327

Navarrete, R., Benítez, J.A., Orozco, M.G. Lemus, C., Acosta, M.J., Hernández-Ballesteros, J.A. 2010. Evaluación de alteraciones acrosomales en espermatozoides congelados/descongelados de cerdos. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 17:285-289

Orozco, M.G., Lemus, C., Morleo, C., Navarrete, R., Acosta, M.J., Rueda, M. y Hernández, J.A. 2011. Daños en el acrosoma del espermatozoide en el proceso de criopreservación en cerdos de razas comerciales. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 18:38-41

Pallas, R. y De Alba, C. 2003. Impacto de Nuevas Tecnologías de Inseminación Artificial sobre la Administración de un Centro de IA. *Cerdos/Swine*, 64:18-22

Poto, A., Peinado, B., Barba, C. y Delgado, J.V. 2000. Congelación de semen porcino de razas autóctonas en peligro de extinción. Influencia de la metodología en bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. *Archivos de Zootecnia*, 49:493-496

Roca, J., Carvajal, G., Lucas, X., Vázquez, J.M., y Arsenio, E.M. 2003. Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoo. *Theriogenology*. 60:77- 87

Rozeboom, K. 2000. Boar screening. *National Hog Farmer*. 45:1-3

SAS. 1999. SAS/STAT User's Guide. Release 6.12. Statistical Analysis System (SAS) Institute In Company. Cary, versión electrónica disponible en disco compacto

Steel, R.G.D. y Torrie, J.A. 1980. Principles and Procedures of Statistics: a Biometrical Approach. MCGraw-Hill Book Company In Company. Toronto, pp481

Talbot, P. y Chacón, R. 1981. A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *Journal of Experimental Zoology*, 215:201-208

Thilmant, P. 1997. Congélation du sperme de vérrat en paillette de 0.5 mL. Resultats sur le terrain. *Annals de Médecine Vétérinaire*, 141:457-462

Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A. y Miller, R.R. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction and Fertility*, 131:887-894