

EVALUACIÓN DE DOS PROTOCOLOS DE REFRIGERACIÓN, PREVIOS A LA CONGELACIÓN DEL SEMEN DE PORCINO

EVALUATION OF TWO REFRIGERATION PROTOCOLS, BEFORE THE FREEZE OF PORCINE SEMEN

Olivo-Zepeda I.B.^{1*}, Conejo-Nava J.¹, Flores-Padilla J.P.², Núñez-Anita R.E.¹, García-Luna F.¹, Val-Arreola D.², Toscano-Torres I.A.¹

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal. México *ozib7@hotmail.com.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Keywords: Boar; Freezing of semen; Extender; Cryoprotectant.

Palabras clave: Cerdo; Congelación de semen; Extensor; Crioprotector.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate two refrigeration protocols, prior to the freezing of porcine semen. Seven boars were used with two replicates each at reproductive stage (1.81 ± 0.17 years). Semen samples were evaluated macro and microscopically. The sample was diluted 1:1 in the transport and centrifugation diluent (Androhep APX®) at 37 °C. The progressive motility and viability of the ejaculate were evaluated. The sample was centrifuged at 64.8 g for 5 min and then the supernatant was removed and the remaining batch was resuspended in the freezing diluent (Androhep Cryoguard®). Progressive motility and viability were evaluated. The samples were divided for use in two protocols. Protocol 1: the samples were exposed to a temperature of 5 °C for two hours after which time the progressive motility and viability were evaluated to submit them to the cryopreservation process. Protocol 2: the samples were submitted to 17°C and 5°C for three and two hours respectively, after this time was evaluated the progressive motility and viability, and were subsequently subjected to the cryopreservation process. Regarding post-freeze results, a progressive motility of 42.5 ± 7.5 and a viability of 49.2 ± 7.8 was obtained with protocol 1. In protocol 2 a progressive motility of 38.2 ± 7.0 and a viability of 40.1 ± 10.1 was obtained. The results of this work show that protocol 1 was superior ($P < 0.05$) in the viability parameter with respect to protocol 2. However, other experiments should be performed where the functional status of the plasma membrane, in vitro and in vivo fertilization capacity of the treated spermatozoa.

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar dos protocolos de refrigeración, previos a la congelación del semen porcino. Se utilizaron 7 verracos con dos repeticiones cada uno en etapa reproductiva (1.81 ± 0.17 años). Las muestras de semen fueron evaluadas macro y microscópicamente. La muestra fue diluida 1:1 en el diluyente de transporte y centrifugación (Androhep APX®) a 37°C. Se evaluó la motilidad progresiva y viabilidad del eyaculado. La muestra fue centrifugada a 64.8 g durante 5 min y después fue retirado el sobrenadante y el pellet restante se resuspendió en el diluyente de congelación (Androhep Cryoguard®). Se evaluó

motilidad progresiva y viabilidad. Las muestras fueron divididas para utilizarlas en dos protocolos. Protocolo 1: las muestras fueron expuestas a una temperatura de 5°C durante dos horas, pasado este tiempo se evaluó la motilidad progresiva y viabilidad para someterlas al proceso de criopreservación. Protocolo 2: las muestras fueron sometidas a 17°C y 5°C durante tres y dos horas respectivamente, transcurrido este tiempo fue evaluada la motilidad progresiva y viabilidad, y posteriormente fueron sometidas al proceso de criopreservación. En cuanto a los resultados postdescongelación, en el protocolo 1, se obtuvo una motilidad progresiva del 42.5 ± 7.5 y una viabilidad del 49.2 ± 7.8 . En el protocolo 2 se obtuvo una motilidad progresiva del 38.2 ± 7.0 y una viabilidad del 40.1 ± 10.1 . Los resultados de este trabajo muestran que el protocolo 1 fue superior ($P < 0.05$) en el parámetro de viabilidad con respecto al protocolo 2. Sin embargo, se deben realizar otros experimentos donde sea evaluado el estado funcional de la membrana plasmática, capacidad fertilizante *in vitro* e *in vivo* de los espermatozoides tratados.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la Inseminación Artificial (IA) con semen congelado en la producción porcina queda reducida a programas de conservación genética debido principalmente a que los resultados de fertilidad y prolificidad están en un 10-20 % y 1-2 lechones respectivamente. Estos resultados se encuentran por debajo de los obtenidos con semen refrigerado, difieren entre razas e incluso entre eyaculados de un mismo individuo (Roa *et al.*, 2005). Este hecho puede explicarse porque la membrana de espermatozoides de cerdo es diferente de otras especies debido a su menor cantidad de colesterol (Rocha *et al.*, 2015). Se publicaron dos métodos de congelación que han sido la base de los utilizados hasta el día de hoy: en Estados Unidos, Pursel y Johnson, (1975) congelaron semen en píldoras; en Alemania, Westendorf *et al.* (1975) congelaron semen en pajuelas de 5 ml. Ambos métodos utilizan diluyentes a base de yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente (Williams *et al.*, 2015). La calidad del semen congelado disminuye con respecto a la del semen fresco o refrigerado, ya que un 50 % de los espermatozoides no sobreviven al proceso de criopreservación y sufren daños tanto bioquímicos (ralentización metabólica) como estructurales (cambios en la estructura de las bicapas lipídicas de las membranas plasmáticas y de los orgánulos), que finalmente van a afectar la funcionalidad de los espermatozoides alterando su capacidad de fertilización (Tomás, 2007). El uso de semen criopreservado es altamente deseable para el mejoramiento genético, mantenimiento de la bioseguridad, permite el transporte a largas distancias y la conservación durante un tiempo muy prolongado (Williams *et al.*, 2015; Figueiredo *et al.*, 2013; Bailey *et al.*, 2008; Guachún, 2017). Algunas de las modificaciones de los diluyentes son la adición de detergentes (Didion *et al.*, 2015). Un ejemplo de este detergente es el compuesto activo del Orvus Es Paste (Equex Paste). Las funciones de este detergente son a través de la modificación de los componentes de la yema de huevo, esto incrementa la permeabilidad de la membrana y reduce el estrés osmótico del proceso de congelación y descongelación (Sterbenc *et al.*, 2014). Otro de los factores que afectan la calidad de los espermatozoides porcinos durante el proceso de criopreservación son las velocidades y temperaturas de enfriamiento, una proporción substancial de los cambios en la membrana plasmática podrían atribuirse al enfriamiento de las células a 5°C, pero si los espermatozoides se mantienen entre 15°C, 17°C o 18°C durante períodos que van de las 10 a las 20 horas incrementa el porcentaje de la integridad de la membrana plasmática postdescongelación pero con disminución de la motilidad (Eriksson *et al.*, 2000). Los espermatozoides porcinos eyaculados son muy sensibles al choque frío, perdiendo rápidamente su viabilidad al enfriamiento rápido a

0°C (Watson y Plummer, 1985), sin embargo, se ha demostrado que la resistencia al frío se ve incrementada al hacer una pausa de 2 a 4 horas antes de disminuir la temperatura a menos de 15°C (Eriksson *et al.*, 2000; Pursel y Park, 1985). Es por ello que el objetivo de este trabajo fue evaluar dos protocolos con diferentes temperaturas de refrigeración, 1) a 5°C durante 2 horas y 2) a 17°C 3 horas y 5°C 2 horas, previos a la congelación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras seminales se obtuvieron de una granja de cerdos comercial, ubicada en el Municipio de Álvaro Obregón, del Estado de Michoacán, México, altitud media (1839 msnm), clima templado con lluvias en verano, sin cambio térmico invernal bien definido. La temperatura media anual es de 26°C, con máxima de 32.2°C y mínima de 6°C. Las muestras fueron trasladadas a la Unidad de Servicios Integrales en Reproducción Animal (USIRA) ubicada en la Posta Zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Para este trabajo se utilizaron 7 verracos con dos repeticiones cada uno (Pietrain, Landrace y York) en etapa reproductiva (1.81 ± 0.17 años), vacunados, desparasitados y clínicamente sanos. Los sementales fueron seleccionados de acuerdo a su calidad seminal y congelabilidad. El semen se obtuvo mediante la técnica de la mano enguantada. Una vez obtenida la muestra fue evaluada macroscópicamente (volumen, color, pH) y microscópicamente motilidad masal (MM), motilidad progresiva (MP), viabilidad (V) y concentración espermática (CE), en un microscopio de campo claro (Leica®), de acuerdo a la metodología descrita por Conejo (1991). La viabilidad se determinó mediante un frotis con la tinción supravital eosina-nigronisa. La muestra fue diluida 1:1 en el diluyente de transporte y centrifugación (Androhep APX®) a 37°C para ser transportada al laboratorio (USIRA). Una vez en el laboratorio se evaluó nuevamente la MP y V del eyaculado post-dilución. Inmediatamente después la muestra fue centrifugada a 64.8 g durante 5 min y después fue retirado el sobrenadante y el pellet restante se resuspendió en el diluyente de congelación (Androhep Cryoguard®). Posteriormente se evaluó nuevamente la MP y V. El semen diluido fue envasado en criotubos de 1.5 ml (Minitube®) con una concentración final de 500×10^6 de espermatozoides. Las muestras fueron divididas para utilizarlas en dos protocolos distintos. Protocolo 1: las muestras fueron expuestas a una temperatura de refrigeración de 5°C durante dos horas, pasado este tiempo se evaluó la MP y V para inmediatamente someterlas al proceso de criopreservación. Proceso de criopreservación: las muestras se colocaron sobre una rejilla de acero inoxidable, se sometieron a vapores de nitrógeno (a -120°C, 4 cm por arriba del nitrógeno líquido) durante 20 min en una hielera de poliestireno expandido, después fueron sumergidas directamente al nitrógeno líquido a -196°C durante 2 min y finalmente las muestras fueron colocadas en las canastillas del termo criogénico para su almacenamiento. Protocolo 2: las muestras fueron refrigeradas a 17°C y 5°C durante tres y dos horas respectivamente, transcurrido este tiempo fue evaluada la MP y V, y posteriormente fueron sometidas al proceso de criopreservación antes descrito. El semen procesado fue descongelado en agua a 37°C durante 1 minuto para después ser evaluada la MP y V. Los promedios obtenidos en cada tratamiento de las tasas de motilidad y viabilidad tanto para semen refrigerado como para descongelado fueron evaluados con una prueba de t de student para muestras independientes, asumiendo una distribución normal considerando que el número de observaciones es menor a 50, para evaluar la homogeneidad de las varianzas se usó la prueba de Levene.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fracción rica en espermatozoides tuvo un volumen de 207.14 ± 9.69 ml. La evaluación del semen fresco con respecto a la MP fue del 80 ± 8 % y una V del 88.93 ± 7.86 %, con un promedio en la concentración espermática de $146,387.5 \times 10^6 \pm 12,339.97 \times 10^6$ por eyaculado. En el semen diluido en medio de transporte se observó una MP de 74.64 ± 7.71 % y una V del 81.21 ± 8.03 % y para el semen centrifugado y diluido en el medio de criopreservación, se obtuvo una MP del 73.93 ± 7.38 % y una V del 78.43 ± 7.51 . En el caso del protocolo 1 se observó una MP del 69.3 ± 6.5 y una V del 73.6 ± 6.4 y en el protocolo 2 se mostró una MP del 67.5 ± 6.7 y una V del 72.1 ± 6.6 después de la refrigeración (tabla I; figura 1).

Tabla I. Tasa de motilidad progresiva y viabilidad espermática del semen porcino refrigerado (*Progressive motility and sperm viability of refrigerated porcine semen*).

Protocolos	Nº	Motilidad Progresiva %	Viabilidad %
Protocolo 1: Refrigerado 5°C	14	69.3 ± 6.5^a	73.6 ± 6.4^a
Protocolo 2: Refrigerado 17°C (3 hrs) 5°C (2 hrs)	14	67.5 ± 6.7^a	72.1 ± 6.6^a
Promedios Generales	28	68.4 ± 6.5	72.9 ± 6.4

^{a,b} Literales diferentes dentro de la columna indican diferencias significativas ($P < 0.05$)

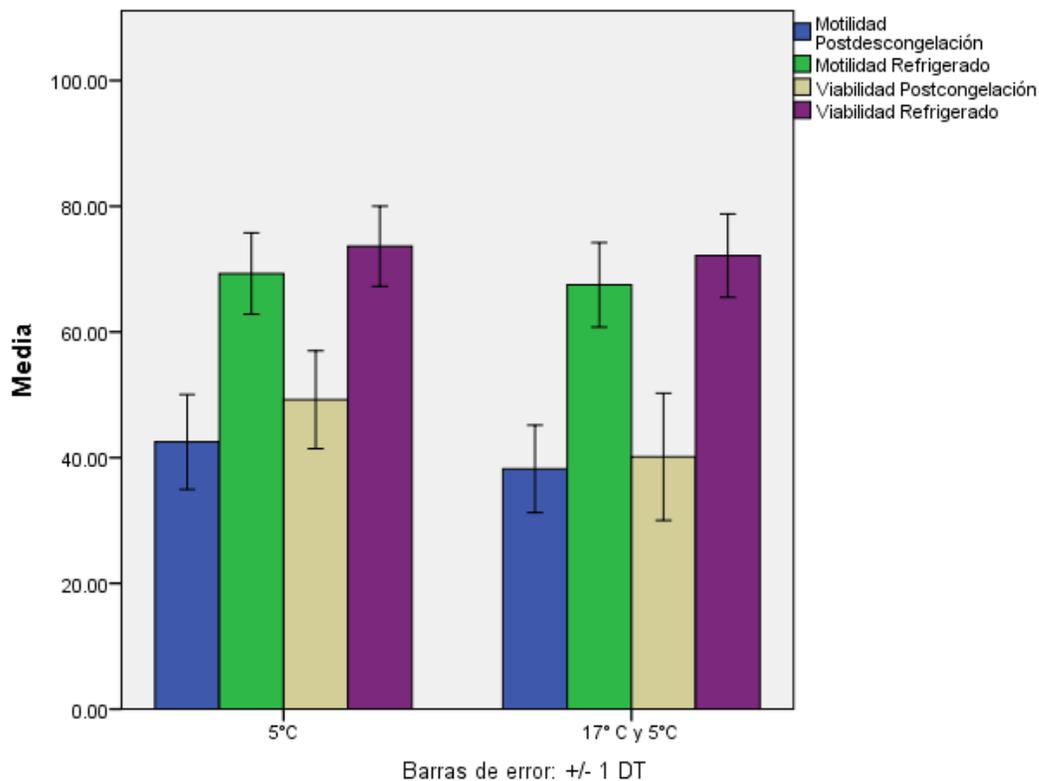


Figura 1. Resultados de la evaluación del semen porcino refrigerado a dos diferentes temperaturas y postdescongelado. (*Results of the evaluation of porcine semen refrigerated at two different temperatures and after freezing*).

En cuanto a los resultados postdescongelación, en el protocolo 1 se obtuvo una MP del 42.5 ± 7.5 y una V del 49.2 ± 7.8 y en el protocolo 2 una MP del 38.2 ± 7 y una V del 40.1 ± 10.1 (tabla II; figura 2). Vasco *et al.* (2007) y Williams *et al.* (2015), mencionan que para congelar semen de verraco es necesario seleccionar a los sementales con ciertas características entre ellas movilidad progresiva y viabilidad superior al 80 %, como lo indican los resultados del presente trabajo los sementales seleccionados presentaron indicadores superiores a lo reportado por los autores antes mencionados. Carpio *et al.* (2008), mencionan que la MP de los espermatozoides de verraco postdescongelación es menor al 50 %, esto concuerda con los resultados del presente trabajo. Suhevic *et al.* (2015) y Williams *et al.* (2015), indican que una de las razones que explican la dificultad para criopreservar espermatozoides porcinos es la sensibilidad al choque por frío, debido a la composición de la membrana plasmática, proporción de fosfolípidos, ácidos grasos saturados e insaturados y colesterol, observándose alteraciones en la funcionalidad, permeabilidad y fluidez de la misma. De acuerdo con Suhevic *et al.* (2015) en parte puede explicar que al descender la temperatura por debajo de los 5 °C o en el proceso de descongelación subiendo la temperatura hasta los 37°C, se daña una cantidad importante de espermatozoides o disminuye su calidad, es por lo anterior que se explica que el protocolo 1 muestre, que para MP, los resultados son iguales, solo varían para V. Sin embargo, Barrientos *et al.* (2009) mencionan que el enfriamiento lento a 5°C antes del congelamiento indujo cambios en la membrana, similares a los que se presentan durante la capacitación, los mismos autores indican que los espermatozoides sufren un proceso de continua desestabilización de la membrana durante la congelación y el descongelamiento, lo que ocasiona la muerte del espermatozoide. Por otra parte, Vasco *et al.* (2008) mencionan que los espermatozoides que conservan las características ideales después del proceso de congelación-descongelación son aquellos que presentan las mismas características que los que son conservados a temperatura ambiente en el laboratorio (21-23°C), y que además presentan características similares después de descongelar a las del semen fresco hasta por seis horas, tiempo suficiente para inseminar.

Tabla II. Tasa de motilidad progresiva y viabilidad espermática del semen porcino postdescongelación (*Progressive motility and sperm viability of porcine semen after thawing*).

Protocolos	Nº	Motilidad Progresiva %	Viabilidad %
Protocolo 1: Postdescongelación 5°C	14	42.5 ± 7.5^a	49.2 ± 7.8^a
Protocolo 2: Postdescongelación 17°C (3 hrs) 5°C (2 hrs)	14	38.2 ± 7.0^a	40.1 ± 10.1^b

^{a,b} Literales diferentes dentro de la columna indican diferencias significativas (P<0.05).

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que el protocolo 1 fue superior en el parámetro de V con respecto al protocolo 2. Sin embargo, se deben realizar otros experimentos donde sea evaluada la capacidad fertilizante *in vitro* de los espermatozoides tratados y posteriormente la prolificidad *in vivo*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH.

BIBLIOGRAFÍA

- Bailey J.L., Lessard C., Jacques J., Breque C., Dobrinski I., Zeng W., Galantino-Homer H.L. (2008). Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 70 (8): 1251-1259.
- Barrientos M.M., Juárez M.M.de L., Trujillo O.M.E., Montiel E.F. (2009) Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca peprinuclear en semen criopreservado de verraco. *Zootecnia Trop*. 27(1):17-24.
- Carpio C.M., Cadillo C.J., Mellisho S.E. (2008). Efecto de dos métodos de congelación sobre la viabilidad espermática de semen de verraco. *Rev. Inv. Perú*. 19(1):15-19.
- Conejo N.J. (1991). Manual de inseminación artificial del ganado porcino con semen diluido. Ed. UMSNH. Morelia, Michoacán, México.
- Didion B.A., Braun G.D., Duggan M.V. (2013). Field fertility of frozen boar semen: A retrospective report comprising over 2600 AI services spanning a four year period. *Animal Reproduction Science*. 137: 189-196.
- Eriksson B.M., Vázquez J.M., Martínez E.A., Roca J., Lucas X., Rodríguez-Martínez H. (2000). Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology* 55(8): 1593-605.
- Figueiredo C. T., Fernandes e Silva E. and Dahl C.C. (2013). Cryopreservation of boar semen: progress and perspectives. *Ces. Med. Vet. Zootec*. [online]. 8 (2):132-140.
- Guachún Y.M.H. (2017). Tesis de Maestría: Efecto del extracto del aloe vera (*Aloe barbadensis miller*) en la congelabilidad del semen porcino. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Ecuador. 16-19.
- Pursel V.G. and Johnson L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa., fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal Animal Science*. 40: 99-102.
- Pursel V.G. and Park C.S. (1985). Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In. *Proceedings of First International Conferences on Deep Freezing of Boar Semen*. Uppsala, 1985, Johnson, L.A. and Larsson, K. (eds):147-155.
- Roa N., Tamasaukas R., Silva A., Sánchez J. (2005). Criopreservación de semen suino en Venezuela. Una revisión. *REDVET*. 6(5): 1-12.
- Rocha L.G.P., Zangeronimo M.G., Murgas L.D.S., Oberlender G., Pereira L.J., Pereira B.A., Chaves B.R., Silva D.M. (2015). Evaluation of two different boar semen freezing protocols and their effects on semen quality after thawing. *Animal Reproduction*. 12 (4): 871-875.
- Sterbenc N., Kosec M., Bollwein H., Klinc P. (2014) The effect of Equex STM in freezing media on post thaw motility, viability and dna integrity of frozen - thawed ram spermatozoa. *Slov Vet Res*. 51 (1): 35-42.
- Suhevic J., Malcervilli D., González L., Aceberp M., Miguez M., García C., Torres P., Fischman M.L., Cisale H. 2015. Influencia de diferentes diluyentes de precongelado en el congelado/descongelado de semen porcino. *Asociación Peruana de Reproducción Animal*. 5(1):124-128.
- Tomás A. C. (2007). Tesis: Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. Universidad Politecnica de Valencia. 1-2.
- Vasco M.D., Hernández M.M., Vázquez J.M., Martínez E., Roca J. (2007). Sustancias oxígeno reactivas (ROS) en semen congelado/descongelado de porcino. *Ciencia y Tecnología*. 1:23-29.
- Watson P.F. and Plummer J.M. (1985). The response of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: *Proceedings of first International Conference of Boar Deep Freezing of Boar Semen*. Uppsala, 1985, Johnson, L.A. and Larsson, K. (eds): 113-127.
- Westendorf P., Richter L., Treu H. (1975). Zur Tiergefrierung Von Ebersperma: Labor und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberg Pailleten Verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wschr*. 82: 261-267.
- Williams S., Fernández V., Gavazza M., Marmunti M., Zeinsteger P., Prenna G. (2015). Congelación de semen porcino: resultados y avances de la técnica. *ANALECTA Vet*. 3 (1): 17-25.