



Efecto de la temperatura de dilución en la calidad del semen fresco de verraco

● Alfonso López, DVM, PhD

Adaptado de: Lopez Rodriguez A, Rijsselaer T, Vyt P, Van Soom A, Maes D, 2012. Effect of dilution temperature on boar semen quality. *Reprod Domest Anim* 47(5):e63-6

LOS CAMBIOS DE TEMPERATURA durante el procesamiento del semen verraco pueden afectar negativamente la calidad del esperma. Los protocolos de dilución del eyaculado difieren de un centro a otro, usándose distintas temperaturas. En este estudio, se investigó el efecto sobre la calidad espermática de la temperatura de dilución final en un protocolo de dilución de 2 pasos. Se incluyeron quince verracos de diferentes razas y edades de un mismo centro de inseminación artificial. Se recogió un eyaculado por verraco y se diluyó en diluyente BTS. Cada eyaculado se diluyó (1:1) a 30° C y posteriormente, una parte se procesó con diluyente precalentado [29.3° C ± 0.2° C, grupo A (GA)] y otra a temperatura ambiente [22.7° C ± 0.6° C, grupo B (GB)]. Las muestras fueron guardadas a 17° C y la calidad del esperma se investigó durante 3 días consecutivos (D0 a D2). El D0, D1 y D2, se evaluaron parámetros de motilidad CASA y el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta (% IM) mediante tinción eosina-nigrosina. El D0 y D2, el por-

centaje de espermatozoides con acrosoma intacto (% IA) se estudió mediante tinción PSA. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos para ninguno de los parámetros investigados. En conclusión, cuando se realiza una dilución de 2 pasos, el precalentamiento del diluyente para la segunda dilución no resultó en una mejor calidad del semen en comparación con una dilución a una temperatura ambiente moderada.

1. Introducción

Durante las últimas décadas, la inseminación artificial (IA) por medio de semen fresco diluido ha aumentado considerablemente (Maes et al, 2011; Riesenbeck, 2011). En comparación con la monta natural, la inseminación artificial reduce el riesgo de transmisión de enfermedades (Maes et al., 2008) y permite al ganadero elegir la genética que más se ajusta a sus necesidades. En Europa occidental, más del 90% de las cerdas reciben IA (Vyt et al, 2007a; Riesenbeck, 2011).

Durante el procesado del eyaculado hay que tener en cuenta que el esperma de verraco es muy sensible a las temperaturas bajas, debido a la composición lipídica de su membrana (De Leeuw et al. 1990). El frío puede originar cambios en la estructura de la membrana espermática que pueden ser fatales para la capacidad del esperma de fecundar el óvulo (Robertson et al. 1988, De Leeuw et al. 1990). Para disminuir el efecto negativo del frío en la calidad del esperma, en los centros de IA se utilizan distintos protocolos para disminuir gradualmente la temperatura del eyaculado. Dos protocolos son comúnmente usados:

1. Dilución de un paso con diluyente precalentado (~33° C) o a temperatura ambiente
2. Dilución de dos pasos en la que a una primera dilución 1:1 con diluyente precalentado (~33° C), le sigue una dilución final con diluyente precalentado o a temperatura ambiente (Waberski, 2009).

La mayoría de los centros de IA usan el protocolo de dos pasos,

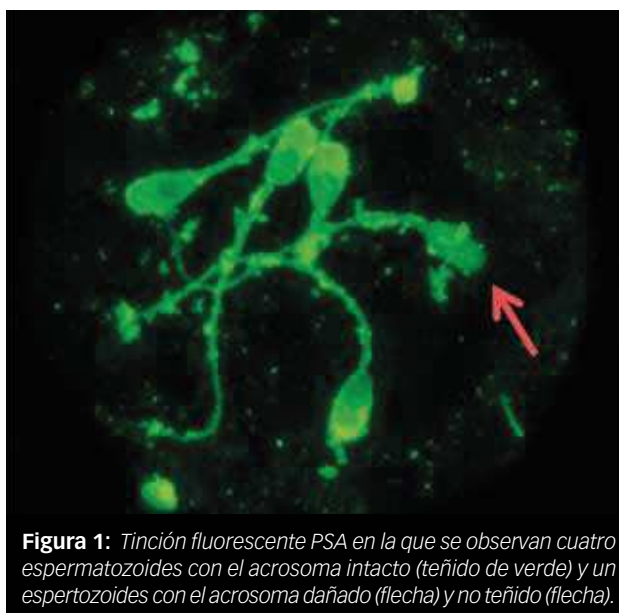


Figura 1: Tinción fluorescente PSA en la que se observan cuatro espermatozoides con el acrosoma intacto (teñido de verde) y un espermatozoides con el acrosoma dañado (flecha) y no teñido (flecha).



aunque la T_a usada para la dilución final varía de un centro a otro (Vyt et al. 2007). Althouse et al. (1998) establecieron que la calidad del semen fresco sólo se ve afectada negativamente cuando se baja de 12° C. Esta es una temperatura que no se suele alcanzar durante el procesado del semen fresco, donde raramente se baja de los 15-17° C. Por lo tanto, el precalentamiento del diluyente podría no estar justificado, pues aumenta los costes y el trabajo en los centros de IA y no está claro todavía si esta práctica tiene un efecto beneficioso sobre la calidad del esperma (Petrunkina et al 2005; Waberski 2009). Aunque la T_a de dilución parece crítica para la calidad del semen del verraco, hay pues distintas opiniones al respecto. Sin embargo, la mayoría de los estudios en este campo se centran en el efecto de las bajas temperaturas durante la congelación del semen y poco se sabe del efecto de la T_a de dilución en el semen fresco.

2. Objetivos

En el presente estudio, por lo tanto, se investigó el efecto de 2 temperaturas diferentes de dilución final (30° C y temperatura ambiente), en la calidad del esperma de verraco procesado en una dilución de dos pasos.

3. Materiales y métodos

3.1. Verracos

Quince verracos (12 *Pietrain*, 2 *Largewhite*, 1 *Landrace*) de un centro comercial de IA se incluyeron en este estudio. La edad (media \pm DE) de los machos fue de 27.1 \pm 13.2 meses (rango: 9-54). Los verracos estaban alojados en corrales individuales dentro del mismo edificio y eran manejados en las mismas condiciones. La frecuencia de recogida de semen era 2 veces por semana con un intervalo de 3 a 4 días entre dos colecciones.

Los verracos cumplían las calidades mínimas para para la IA esto es, un mínimo de 80% de morfología normal y la motilidad de al menos 70% (Martín Rillo et al. 1996).¹

3.2. Diseño experimental

Los eyaculados fueron procesados durante 3 semanas consecutivas (eyaculados de 5 verracos cada semana). Sólo se procesó la fracción rica en espermatozoides. Una primera dilución (1:1) con diluyente a 30° C fue seguida por una dilución final, bien con diluyente a 30° C [Grupo A (GA)] o diluyente mantenido a temperatura ambiente [Grupo B (GB)]. Antes de proceder a la dilución final, se midió la temperatura de la dilución 1:1. Para la dilución final, primero se diluyó 1 mL de la dilución 1:1 en 2 mL del diluyente a la temperatura correspondiente. Seguidamente se añadió diluyente a la temperatura correspondiente para obtener la concentración fina de de 30 x 10⁶ espermatozoides/mL y se anotó el ratio de dilución. Para cada grupo, se midió la temperatura del diluyente en el momento de cada dilución. Para todas las diluciones, se utilizó un diluyente comercial (BTS, Minitüb, Tiefenbach, Alemania) y las concentraciones de semen se determinaron mediante fotómetro (*AccuCell*®). Poco después de la dilución, las muestras de semen se colocaron en 2 cajas isotermas diferentes pero idénticas (una por grupo) y posteriormente, fueron transportados (aproximadamente 40 min.) al laboratorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Gante, Bélgica. La temperatura media en el interior del coche y dentro de cada caja isoterma se registró a su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 1 hora. Se tomó entonces una submuestra para un primer análisis de la calidad del esperma. El resto se refrigeró a 17°C para ser anali-

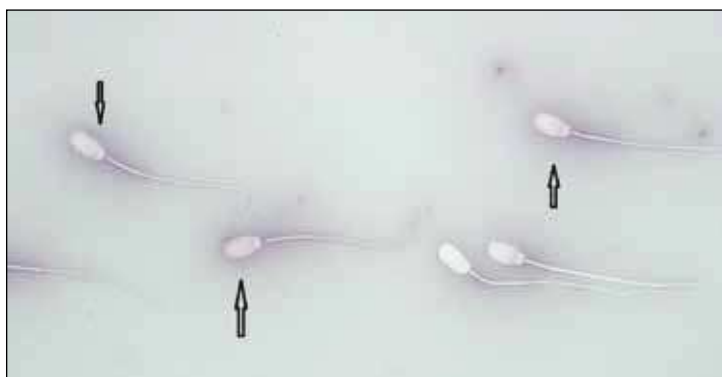


Figura 2: Tinción eosina-negrosina que nos permite ver tres espermatozoides con la membrana dañada y que mostrarán una coloración rosácea (flechas) y dos espermatozoides con la membrana intacta.

zados más adelante el D1 y el D2. El D2, se midió la temperatura de las diluciones almacenadas.

3.3. Análisis de la calidad espermática

La motilidad del espermatozoa se estudió con un sistema computarizado CASA Hamilton Thorne (HTR Ceros 12,3 analizador de semen, Hamilton-Thorne Research, Beverly, EE.UU.) el D0, D1 y D2 como se describió previamente (López et al. 2010).

El porcentaje de espermatozoides con membrana dañada se estudió con la tinción de eosina nigrosina el D0, D1 y D2 (Organización Mundial de la Salud 2010).

El D0 y el D2, se investigó el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto por medio de tinción fluorescente aglutinina de *pisum sativum* (PSA) (Filliers et al. 2008).

3.4. Análisis estadístico

Los datos presentaban distribución normal según la prue-

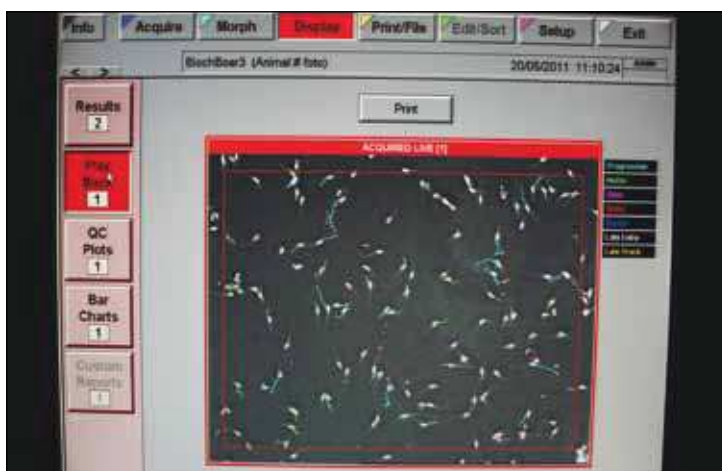


Figura 3: Pantalla de visualización de lectura de un sistema CASA en la que se pueden ver los distintos patrones de movimiento de los espermatozoides (líneas de colores).

ba de Kolmogorov-Smirnov. Para todos los parámetros de comparación, se realizó un análisis de varianza de medidas repetidas para identificar las posibles diferencias entre los grupos durante el almacenamiento. El Grupo se incluyó como factor de fijo y el tiempo como el factor entre sujetos y su interacción también fue investigado. Se calculó el rango *Spearman* de correlación entre el ratio de dilución y los parámetros de calidad del espermatozoa. Las diferencias se consideraron como significativas si los valores *p* eran inferiores a 0.05 (prueba de 2 caras). Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 18.00. Los datos se expresan como media \pm SD, a menos que se indique lo contrario.

4. Resultados

La temperatura media de la dilución 1:1 fue de $29.4 \pm 1.1^\circ \text{C}$, variando desde 27.7°C a 31.6°C . El tiempo de transporte medio del centro de la AI al laboratorio durante las 3 semanas fue de 43 minutos. La temperatura dentro del coche durante el transporte fue 26.3°C , 22.8°C y 24.2°C para la semana 1, 2 y 3, respectivamente. La temperatura en la caja isoterma durante el transporte fue: 27.5°C (GA) y 26.0°C (GB) en la semana 1; 26.0°C (GA) y 24.7°C (GB) en la semana 2 y 27.2°C (GA) y 24.0°C (GB) en la semana 3. La temperatura media del semen después de 3 días de almacenamiento fue de $16.5 \pm 0.3^\circ \text{C}$ (GA) y $16.6 \pm 0.4^\circ \text{C}$ (GB) ($p > 0.05$). Los parámetros de CASA y el porcentaje de espermatozoides con membrana intacta y acrosoma se resumen en la *Tabla 1*. Todos los parámetros de calidad estudiados variaron entre verracos y entre las distintas semanas de estudio ($p < 0.05$). No se observó ninguna interacción del grupo con el verraco, semana o día de almacenamiento ($p > 0.05$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros de CASA. La motilidad total y progresiva disminuyó numéricamente en ambos grupos durante el almacenamiento, pero esta disminución fue significativa sólo del D0 al D1 (*Tabla 1*). Otros parámetros CASA también variaron en ambos grupos durante el almacenamiento pero la variación fue significativa sólo del D0 al D1 (*Tabla 1*).

El porcentaje de espermatozoides con membrana intacta no difirió entre grupos ni entre días de almacenamiento ($p > 0.05$). El porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto no fue diferente entre los grupos ($p > 0.05$) y no pareció ser afectado por los días de almacenamiento ($p > 0.05$).

El ratio de dilución final varió de 1:4 a 1:8.4 y este ratio no tuvo efecto en ninguno de los parámetros de calidad del semen estudiado ($p > 0.05$).

5. Discusión

Aunque la temperatura se controló cuidadosamente, se observaron fluctuaciones en la dilución 1:1. El diferente ratio de

	DÍA 0		DÍA 1		DÍA 3		GRUPO
	GA	GB	GA	GB	GA	GB	Valor p
Concentración (x10 ⁶ /mL)	29.6 ± 6.6 ^a	27.3 ± 4.5 ^a	32.8 ± 10.3 ^b	33.5 ± 10.9 ^b	31.6 ± 7.0 ^b	31.9 ± 6.5 ^b	0.844
Motilidad (%)	79.3 ± 9.0 ^a	81.1 ± 9.2 ^a	68.0 ± 19.7 ^b	69.2 ± 15.1 ^b	67.2 ± 18.0 ^b	71.3 ± 16.9 ^b	0.372
Progresiva (%)	56.5 ± 13.3 ^a	58.4 ± 13.3 ^a	43.5 ± 19.3 ^b	43.4 ± 17.4 ^b	44.6 ± 19.3 ^b	46.1 ± 20.4 ^b	0.737
VAP (μ m/seg)	67.5 ± 8.8 ^a	71.6 ± 11.7 ^a	65.0 ± 7.5 ^b	64.6 ± 10.6 ^b	66.2 ± 7.3 ^b	67.1 ± 9.8 ^b	0.476
VSL (μ m/seg)	50.1 ± 8.3 ^a	52.8 ± 11.5 ^a	43. ± 8.6 ^b	43.9 ± 9.9 ^b	45.1 ± 8.8 ^b	44.8 ± 10.2 ^b	0.679
VCL (μ m/seg)	128.7 ± 16.0 ^a	133.7 ± 17.0 ^a	134.7 ± 10.6 ^b	133.2 ± 15.7 ^b	136.6 ± 7.0 ^b	139.6 ± 13.6 ^b	0.579
ALH (μ m)	5.9 ± 0.8 ^a	5.9 ± 0.8 ^a	6.8 ± 1.0 ^b	6.6 ± 0.9 ^b	6.6 ± 0.7 ^b	6.8 ± 0.9 ^b	0.961
LIN (%)	40.6 ± 8.3 ^a	41.0 ± 7.8 ^a	33.5 ± 7.1 ^b	33.9 ± 6.5 ^b	33.8 ± 6.1 ^b	32.8 ± 6.9 ^b	0.970
Rapid (%)	62.3 ± 13.3 ^a	65.1 ± 12.9 ^a	50.8 ± 19.1 ^b	50.7 ± 17.6 ^b	51.7 ± 19.4 ^b	54.4 ± 19.8 ^b	0.579
Static (%)	10.4 ± 6.1 ^a	8.8 ± 6.1 ^a	18.6 ± 19.9 ^b	15.6 ± 10.5 ^b	17.0 ± 15.0 ^b	17.3 ± 15.2 ^b	0.552
Membrana intacta (%)	85.1 ± 10.7 ^a	84.4 ± 3.8 ^a	85.8 ± 8.0 ^a	85.8 ± 6.2 ^a	86.9 ± 8.1 ^a	85.6 ± 6.6 ^a	0.761
Acrosoma intacto (%)	72.2 ± 9.5 ^a	68.3 ± 16.6 ^a	-	-	69.1 ± 18.0 ^a	70.7 ± 12.8 ^a	0.792
	Motilidad % (porcentaje de espermatozoides móviles); Progresiva % (porcentaje de espermatozoides moviéndose progresivamente); VAP (velocidad de ruta media); VSL (velocidad recta); VCL (velocidad curvilínea); LIN (linealidad). ^{a,b} Diferentes superíndices en la misma fila indican una diferencia significativa (p < 0.05).						

Tabla 1: Parámetros de la calidad de dosis de semen de verraco (n = 15). El semen se diluyó primero (1:1) con diluyente a 30° C. Posteriormente, el semen se diluyó con diluyente precalentado (29.3° C ± 0.2° C; GA) o a temperatura ambiente (22.7° C ± 0.6° C; GB). Del día (D) 0 al D2, las muestras se almacenaron en un refrigerador 17° C. Adaptado de Lopez et al. (Reprod Domest Anim 2012).

dilución podría explicar estas fluctuaciones. Esta pre-dilución no se lleva a cabo constantemente en una relación 1:1 sino que se ajusta dependiendo del volumen del ayaculado. Es probable que una relación de dilución inferior se aplicara a los eyaculados con un volumen más alto, lo que daría lugar a una temperatura más alta de la dilución 1:1 de estos eyaculados. Aunque esta primera dilución 1:1 parece ser muy importante para la aclimatación a la dilución final posterior (Pursel et al., 1972, Johnson et al., 2000, Waberski 2009), en el presente estudio no se pudo trabajar con esta dilución por motivos de bioseguridad, pues sólo el personal de I centro de IA tuvo acceso a esta dilución.

Al igual que en otros estudios, no se observaron efectos negativos sobre la calidad de espermatozoides del almacenamiento refrigerado durante 3 días, tiempo de almacenamiento del semen convencional en la mayoría de las granjas (De Ambrogi et al 2006; Althouse et al. 1998). Probablemente debido al efecto protector del diluyente BTS, capaz de mantener el espermatozoides viable por un período de hasta 3 ó 4 días (Vyt et al. 2004).

Aunque el frío puede reducir la motilidad y la vitalidad de los espermatozoides (Pursel et al 1972; Althouse et al 1998), la temperatura crítica establecida a 12° C por Althouse et al.

(1998) no se alcanzó durante el estudio. Por tanto, es probable que trabajar a una temperatura por encima de 12° C no afecte ni a la motilidad del espermatozoides ni a la integridad de la membrana o del acrosoma. Sin embargo, estos parámetros podrían no ser suficientes para detectar cambios más sutiles en la calidad del semen y pruebas más sensibles son necesarias (Waberski et al. 2009). Por ejemplo, Petrunkina et al. (2005) no encontraron ningún efecto de la temperatura de dilución cuando miraron a los parámetros convencionales de calidad de semen, pero observaron un efecto en la respuesta del espermatozoides a la capacitación inducida in vitro. Basándose en estas pruebas in vitro, observaron que el espermatozoides diluido a 32° C respondió de una manera distinta a la capacitación inducida que el espermatozoides diluido a 20° C. Sin embargo, este efecto de la temperatura de dilución, sólo se observó cuando el semen diluido se almacenó a 10° C, pero no cuando se almacenó a 16° C. Similarmente en nuestro estudio, aunque no se investigaron diferentes temperaturas de almacenamiento, no se encontró ningún efecto de la temperatura de dilución en la calidad del semen en base a parámetros CASA, en semen almacenado en torno a 16° C. Por lo tanto, parece que si el semen diluido se almacena a las temperaturas usadas nor-



malmente (15° C-17° C), la dilución a una temperatura de hasta 20° C no tendría efectos marcados en la calidad del esperma. La mejor manera de monitorizar los daños que sufre el esperma durante el procesado también está sometida a debate. Aunque evaluar la reacción del esperma a la capacitación inducida in vitro, podría ser una herramienta sensible para detectar pequeños cambios en la calidad del semen (Petrunkina et al. 2005), esta técnica aún no está totalmente estandarizada y los resultados son difíciles de interpretar. Por otra parte, se requiere personal capacitado y equipo caro para citometría de flujo que, a día de hoy, no permiten un uso rutinario de este tipo de técnicas. Por otro lado, CASA podría ser un método más fácil para evaluar los daños durante el procesamiento de semen, incluido los cambios de capacitación inducidos por el frío. Podría ser posible identificar estos cambios mediante la evaluación de patrones específicos de movimiento de CASA. Por ejemplo, se ha demostrado que el esperma sometido a capacitación in vitro, muestra altas velocidades de ruta (VAP) y baja linealidad (García-Herreros et al. 2005). No está tan claro cuál de los parámetros de CASA están relacionados con la fertilidad in vivo. Se ha demostrado que el porcentaje de motilidad total determinado por CASA, tiene un efecto positivo sobre el tamaño de la camada y el número de lechones nacidos vivos. (Vyt et al. 2008). También Holt et al. 1997 encontraron una asociación positiva entre los parámetros de velocidad

de CASA como VAP y la velocidad en línea recta (VSL) y la fertilidad. Ninguno de estos parámetros CASA se vio afectado por la temperatura de dilución y por lo tanto, no hay razones para pensar que la dilución a temperatura ambiente causó cambios de capacitación o afectó la fertilidad. Sin embargo, todos los estudios in vitro de semen de verraco deben ser confirmados por ensayos in vivo. Aunque no se realizó una prueba de campo inseminando cerdas con semen diluido a distintas temperaturas, la experiencia de campo sugiere que no hay un efecto negativo de la dilución a temperatura ambiente en la fertilidad de la cerda (conversación personal con directores de diferentes centros de IA). A este respecto, cabe añadir que hay muy pocos estudios in vivo que investiguen los efectos del procesado de semen fresco en la fertilidad posterior de la cerda y estos estudios son necesarios. En conclusión, no se encontraron diferencias significativas en la calidad del semen entre semen de verraco diluido a 30° C y semen diluido a una temperatura ambiente de 22 a 23° C después de un pre-dilución 1:1 (30° C). Desde un punto de vista práctico esto implica que, cuando se realiza una dilución de 2 pasos, no se requiere precalentar el diluyente para la dilución final para una buena calidad del semen. El estudio mostró que, incluso cuando las muestras de semen diluido se procesan de una manera controlada, las fluctuaciones en la temperatura son comúnmente observadas. 📷

REFERENCES

1. Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 1998; 50: 535-543.
2. De Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, Caballero I et al. Effect of storage in short and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.* 2006; 29, 543-552.
3. De Leeuw F, Colenbrander B, Verkleij A. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Dom. Anim. Supplement.* 1990; 1: 95-104.
4. Filliers M, Rijsselaere T, Bossaert P, De Causmaecker V et al. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4 degrees C) on sperm quality. *Theriogenology.* 2008; 70: 1550-1559.
5. García-Herreros M, Aparicio IM, Núñez I, García-Marín LJ, et al. Boar sperm velocity and motility patterns under capacitating and non-capacitating incubation conditions. *Theriogenology.* 2005; 63: 795-805.
6. Holt WV, Moore HD, Reed HC, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.* 1997; 18: 312-323.
7. Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 62: 143-172
8. López A, Rijsselaere T, Van Soom A, Leroy JL et al. Effect of organic selenium in the diet on sperm quality of boars. *Reprod. Dom. Anim.* 2010; 45: 297-305.
9. Maes D, Nauwynck H, Rijsselaere T, Mateusen B et al. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: an overview. *Theriogenology.* 2008; 70: 1337-1345.
10. Martin-Rillo S, Martinez E, Garcia C, Artiga C et al. Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.* 1996; 31: 519-526.
11. Petrunkina AM, Volker G, Weitze KF, Beyerbach M et al. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology.* 2005; 63: 2278-2299.
12. Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 1972; 34: 278-283.
13. Robertson L, Watson PF, Plummer JM. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. *Cryo Letters* 1988; 9: 286-293
14. Riesenbeck A. Review on international trade with boar semen. *Reprod. Domest. Anim.* 2011; 46: 1-3.
15. Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F et al. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 2004; 39: 8-12
16. Vyt P, Maes D, Rijsselaere T, Dewulf J et al. Semen handling in porcine artificial insemination centres: the Belgian situation. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2007; 76: 195-200.
17. Vyt P, Maes D, Quinten C, Rijsselaere T et al. Detailed motility evaluation of boar semen and its predictive value for reproductive performance in sows. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2008; 77: 291-299.
18. Waberski D, Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E. Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology* 2008; 70: 1346-1351
19. Waberski D. Critical steps from semen collection to insemination. Proceedings of the Annual Meeting of the EU-AI-Vets, Ghent, Belgium. 2009: 66-69.
20. World Health Organization (WHO) 2010. Laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction, 5th edition. Geneva, Switzerland, WHO Press.