



# Fragmentación del ADN nuclear espermático como causa de sub-fertilidad indetectable en un verraco de un centro de inseminación

● Alfonso Bolarín Guillén

*Director de Calidad y Desarrollo AIM Ibérica.*

La capacidad fecundante de una dosis de inseminación artificial (IA) de porcino viene determinada por multitud de parámetros (Flowers, 2009), algunos de los cuales conocemos en profundidad, pero otros no. Los parámetros clásicos de calidad espermática —motilidad, calidad de movimiento, formas anormales, conservación (Gadea, 2005) y contaminación (Kuster y Althouse, 2016)— pueden detectar individuos infértiles (Flowers, 1997), pero no tanto subfértiles (Ruiz-Sanchez y cols., 2006).

Muchos de los defectos que causan infertilidad y sub-fertilidad pueden verse enmascarados añadiendo más espermatozoides en la dosis seminal (Foxcroft y cols., 2008), o mediante el uso de heterospermia (Pedersen, 2013).

La industria de porcino se esfuerza para difundir lo más posible los genes de los verracos genéticamente mejorantes. Una estrategia para alcanzar este objetivo es ajustar la cantidad de espermatozoides por cubrición, sin hacer peligrar la capacidad fecundante de la dosis de IA en la granja de destino. Técnicas como la inseminación post-cervical (Watson y Behan, 2002), la inseminación intrauterina profunda (Vazquez y cols., 2005), o la sincronización hormonal ayudan a alcanzar esta meta (Roca y cols., 2016). De esta manera, al usar menor cantidad de espermatozoides en la dosis, no sólo los instrumentos de medida deben ganar precisión y exactitud, sino que además los controles de calidad deben ir orientados a asegurar el máximo de capacidad fecundante, obligando a los centros de inseminación a monitorizar parámetros de sub-fertilidad que antes no eran relevantes en la producción (Roca y cols., 2015).

No hay un solo test que pueda predecir de forma absoluta la capacidad fecundante de una dosis espermática (Rodríguez-Martínez, 2003; Jung y cols., 2015). La complicación añadida a la hora de identificar atributos de sub-fertilidad viene dada por la gran cantidad de ellos que existe, con una frecuencia de aparición relativamente baja en las poblaciones de individuos y en las poblaciones espermáticas, de forma que es casi imposible diseñar un estudio apropiado que evalúe to-

das ellas a la vez, resultando evidentemente sesgado todo estudio parcial al respecto.

Los atributos de calidad espermática pueden ser divididos en dos tipos: atributos compensables y atributos no compensables (Braundmeier y Miller, 2001). Los defectos compensables pueden ser neutralizados introduciendo grandes cantidades de espermatozoides por IA. Por ejemplo, espermatozoides con muy baja motilidad, espermatozoides no viables, o espermatozoides sin acrosoma. Sin embargo, los defectos no compensables no son mitigados introduciendo más espermatozoides por IA. Estos defectos no impiden que el espermatozoide entre en contacto con el ovocito y provoque el bloqueo espermático (el cual es una programación del ovocito para evitar la poliespermia, que daría lugar a un embrión no viable), de manera que añadir más espermatozoides no impediría la pérdida de embriones, prolificidad y en último aspecto, fertilidad. Algunos test de calidad complementarios realizados sobre los eyaculados van encaminados a la identificación de estos defectos no compensables, tal y como el test de viabilidad espermática (Juonala y cols., 1999), el test de fragmentación del DNA nuclear espermático (Lopez-Fernandez y cols., 2008), el test de adhesión espermática a la zona pelúcida tras una fecundación in vitro (Fazeli y cols., 1997), o el test de fecundación in vitro (Xu y cols., 1998)

En el presente trabajo expondremos el caso práctico de la disminución de fertilidad y prolificidad originada en una granja tras la introducción en el programa de cubriciones de verracos nuevos, uno de los cuales resultó sub-fértil debido a un problema indetectable a través de los controles clásicos de calidad.

## REDUCCIÓN DE FERTILIDAD Y PROLIFICIDAD: TIPIFICACIÓN DEL PROBLEMA Y SU POSIBLE CAUSA

El incidente sucedió en una granja de unas 1300 reproductoras Landrace x Large White localizada en Andalucía, que recibe dosis comerciales de Pietrain para inseminación artificial post-cervical de un centro de inseminación privado situado en Murcia. El centro de inseminación viene dando servicio a esa granja por varios años, con un resultado promedio pre-

vio del 92,2% de fertilidad y 11,43 nacidos vivos (datos de 2012).

El día 11 de diciembre de 2012 entraron en el centro de inseminación 8 verracos de una línea Pietrain diferente a la que venía usándose en la granja. Los primeros eyaculados obtenidos de esos verracos son descartados protocolariamente, y su calidad seminal contrastada. De los 8 verracos, uno (el 02) no es productivo por presentar grave cojera que impide su monta, y otro (el 07) no es productivo por presentar un absceso que aconseja su tratamiento y reposo. Así pues, 6 verracos entran en producción y comienzan su servicio a la granja el día lunes 24 de diciembre de 2012. El 2 de febrero de 2013 el veterinario encargado de la explotación contacta con el centro de inseminación alarmado por el descenso brusco de fertilidad, y el miércoles 12 de febrero de 2013 se retoma la línea de Pietrain usada anteriormente. La fertilidad y prolificidad se recuperan a partir de esa misma fecha.

**Tabla 1:** Aportación de cada verraco al total de cubriciones realizadas en la granja durante el período problema..

Verraco	Dosis vendidas (%) a granja
01	26%
02	8%
03	12%
04	13%
05	13%
06	11%
07	5%
08	15%

En la *Tabla 1* se observa la influencia de cada verraco sobre el total de dosis vendidas (y estimativamente, cubriciones realizadas) en la granja en el período del problema. Las dosis fueron preparadas mayoritariamente en heterospermia y puntualmente (cuando no había otro eyaculado con el que mezclar), algún verraco fue enviado en monospermia.

Tras recopilar los datos reproductivos de la explotación, se comunica un descenso de fertilidad del 15,80% y un descenso de prolificidad de 1,84 lechones (lo que supone un descenso del 16,09% en prolificidad).



Los datos de motilidad, conservación, formas anormales y contaminación recogidos durante el período problema no da lugar a sospechar de una causa originada en las dosis de IA. Sin embargo, los esclarecedores resultados durante exactamente el período en que se estuvieron usando estos verracos obliga a revisar otras variables en el centro. En concreto, se revisó:

- Temperaturas de producción, distribución y almacenamiento en granja.
- Motilidad y motilidad progresiva mediante sistema CASA.
- Chequeo de enfermedades infectocontagiosas en los verracos y en la granja.
- Protocolos de entrada y adaptación de verracos.

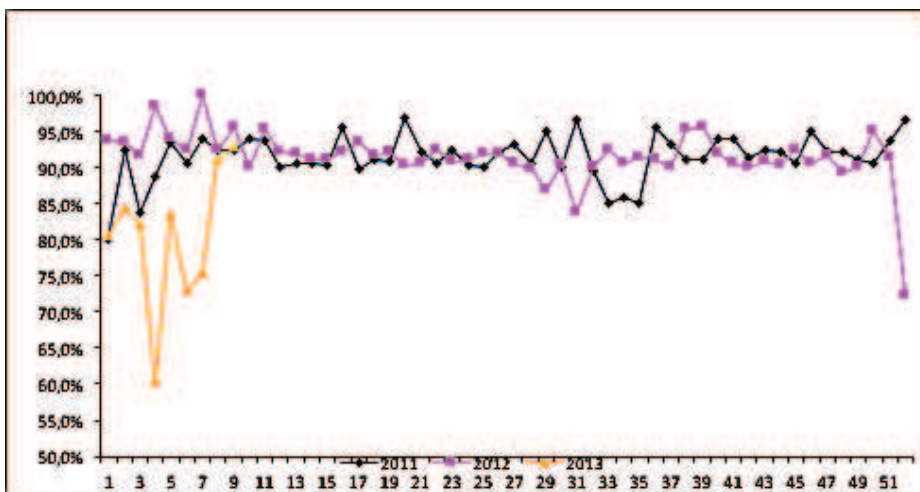
Todos los resultados de esta revisión resultaron normales, con lo cual se pasó a tomar muestras de algunos marcadores de infertilidad o sub-fertilidad no compensables que podrían haber sido origen del problema. Se analizaron los siguientes parámetros:

- Capacidad fecundante mediante prueba de fecundación *in vitro* (FIV).
- Fragmentación del DNA nuclear espermático (DFI).
- Traslocaciones recíprocas.

Los resultados de traslocación recíproca, analizados mediante cariotipador, resultaron todos negativos. Sin embargo, algunos verracos presentaron una baja capacidad fecundante, y un verraco en concreto (el verraco 05) presentó muy alto DFI y muy baja capacidad fecundante en el test de FIV (*Tabla 2*). ➔

**Tabla 2:** Resultado de algunos de los controles realizados en los ocho verracos problema durante el período problema, donde se observa una desviación importante del verraco 05 respecto de la fragmentación del DNA nuclear espermático, y el % de ovocitos penetrados.

Verraco	Ritmo de recogida	Motilidad día 0 (CASA,%)	Mot. Subjetiva	Mot. Progresiva (%)	Morfoanomalias (CASA,%)	Morfoanomalias (Subjetiva,%)	Fragmentación DNA	Viabilidad (%)	% ovocitos penetrados	Nºespr/ ovocito	Conclusión
06	0,9	90,80%	76,00%	69,80%	12%	24,0%	0%	90,90%	84,10%	5,69	Alta capacidad fecundante
01	0,8	65,70%	81,10%	25%	32%	15,3%	5%	87%	50,60%	2,77	Baja capacidad fecundante
02	0,4	73,20%	78,00%	34,30%	28%	21,3%	1,70%	90,60%	92,80%	5,62	Alta capacidad fecundante
03	0,7	84,50%	82,50%	45,70%	4%	10,7%	1,60%	86,20%	89,30%	6,00	Alta capacidad fecundante
04	0,6	80,60%	82,90%	47,80%	7%	13,5%	1,90%	85,80%	100%	6,04	Alta capacidad fecundante
05	0,7	72,20%	81,40%	26,80%	32%	16,0%	51,30%	78,40%	45,90%	2,89	Baja capacidad fecundante
07	0,3	87,80%	80,00%	43,60%	3%	25,0%	3,70%	89,30%	94%	6,02	Alta capacidad fecundante
08	0,7	87,30%	80,00%	44,40%	27%	22,3%	4,10%	88,70%	50%	2,80	Alta capacidad fecundante



**Gráfico 1:** Fertilidad en la granja problema en los años y meses anteriores y durante las inseminaciones con el grupo de verracos problema.

## CONCLUSIONES

➤ Es interesante resaltar que la participación del verraco 05 en las cubriciones de la granja es del 11% (referido a dosis vendidas a la granja, no específicamente a dosis *usadas* en la granja), y que sólo 6 verracos fueron usados entre el 24 de diciembre y el 28 de enero (fecha en la que entraron en producción los dos verracos con problemas), siendo  $1/6 = 16,7\%$ . Se observó una reducción de fertilidad en la granja

del 15,80% y una reducción en la prolificidad del 16,09%.

El verraco 05 fue eliminado del centro de inseminación, y el resto de animales continuó su vida productiva sin mayores incidencias hasta su amortización meses más tarde.

La reclamación económica de la granja ascendió a 5.292 € por el descenso de fertilidad y 21.417,9 € por el descenso de prolificidad. Es necesario resaltar que el análisis del DFI en un verraco costaba alrededor de 20€ por muestra. En el centro





de inseminación de 138 verracos que proveía de dosis de inseminación a la granja, con una renovación del 60% anual, el análisis anual del DFI en cada verraco costaría 4.416 €, con lo cual, en el supuesto de que el DFI en un verraco permaneciera estable a lo largo de un año, el importe total de la reclamación justificaría el análisis en este centro durante 6 años siempre y cuando encontráramos al menos un positivo tan evidente como en el caso que hemos expuesto.

Como consecuencia de este episodio, AIM Ibérica analiza la fragmentación del DNA nuclear espermático de sus reproductores, realiza un seguimiento de fertilidad de su producto, y ha llevado a cabo un proyecto de investigación con más de 3.000 inseminaciones con eyaculados cuyo ADN nuclear espermático ha sido analizado. 🐷

## BIBLIOGRAFÍA

- Braundmeier AG, Miller DJ. 2001. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci* 84;1915-25.
- Gadea J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*, 63:431-44.
- Kuster CE, Althouse GC. 2016. The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance. *Theriogenology*. Jan 1;85(1):21-6. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.049. Epub 2015 Oct 3.
- Fazeli A, Hage WJ, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, et al. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod* 56;430-8.
- Flowers WL. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J Reprod Fertil Suppl* 52;67-78.
- Flowers WL, 2009: Selection for boar fertility and semen quality—the way ahead. *Soc Reprod Fertil Suppl* 66, 67 –78.
- Flowers WL, 2013: Triennial Reproduction Symposium: sperm characteristics that limit success of fertilization. *J Anim Sci* 91, 3022–3029.
- Foxcroft GR, Dyck MK, Ruiz-Sanchez A, Novak S, Dixon WT. 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology* 70:1324-1336.
- Jung M, Rüdiger K, Schulze M. 2015. In vitro measures for assessing boar semen fertility. *Reprod Domest Anim*. Jul;50 Suppl 2:20-4. doi: 10.1111/rda.12533.
- Juonala T, Salonen E, Nurttila T, Anderson M. 1999. Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. *Reprod Domest Anim*, 34;83-7.
- López-Fernández C, Pérez-Llano B, García-Casado P, Sala R, Gosálbez A, Arroyo F, Fernández JL, Gosálvez J. 2008. Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Anim Reprod Sci*. Jan 15;103(1-2):87-98.
- Pederser ML. 2013. Fertility higher with pooled Duroc semen than with semen from one boar. *Pig Research Center, Trial Report* No. 969. June 2013. [http://www.pigresearchcentre.dk/~media/Files/PDF%20-%20UK/Meddelelse%20969\\_UK.ashx](http://www.pigresearchcentre.dk/~media/Files/PDF%20-%20UK/Meddelelse%20969_UK.ashx)
- Roca J, Broekhuijse ML, Parrilla I, Rodríguez-Martínez H, Martínez EA, Bolarin, A. 2015. Boar differences in artificial insemination outcomes: Can they be minimized? *Reprod Domest Anim*. Jul;50 Suppl 2:48-55. Doi: 10.1111/rda.12530.
- Roca J, Parrilla I, Bolarin A, Martínez EA, Rodríguez-Martínez H. 2016. Will AI in pigs become more efficient? *Theriogenology*, (86), 1, 187-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.026>
- Ruiz-Sánchez AL, O'Donoghue R, Novak S, Dyck MK, Cosgrove JR, Dixon WT. 2006. The predictive value of routine semen evaluation and IVF technology for determining relative boar fertility. *Theriogenology*; 66:736-48.
- Vazquez JM, Martínez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C. 2005. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*, 63;536-47.
- Watson PF, Behan JR. 2002. Intrauterine insemination of sow with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial. *Theriogenology*, 57;1683-93.
- Xu X, Pommier S, Arbov T, Hutchings B, Sotto W, Foxcroft GR. 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and boar fertility. *J Anim Sci*, 76:3079-89.