

CONGELABILITAT DE LES EJACULACIONS DE PORCÍ: ESTUDI COMPARATIU DE LA QUALITAT ESPERMÀTICA I LA TAXA DE FERTILITAT *IN VIVO*

Isabel Casas,¹ Sílvia Sancho,¹ M. Dolors Briz,¹ Elisabeth Pinart,¹ Eva Bussalleu,¹
Marc Yeste,¹ Anna Fàbrega,¹ Estela Garcia,¹ Marta Puigmulé,¹ Josep Reixach,² Marta Diaz,²
Xavier Barrera³ i Sergi Bonet¹

¹ Biotecnologia de la Reproducció Animal i Humana, Departament de Biologia-INTEA, Facultat de Ciències, Universitat de Girona.

Campus Montilivi, s/n. 17071 Girona. isabel.casas@udg.edu.

² Grup Batallé.

³ Semen Cardona SL.

Resum

L'objectiu d'aquest treball ha estat valorar la predicció de la congelabilitat de les ejaculacions de porcí mitjançant l'estudi de la qualitat espermàtica i la comparació amb la taxa de fertilitat *in vivo*. Es van obtenir 26 ejaculacions, cadascuna de les quals es va dividir en una porció refrigerada (FS, control) i una porció destinada a ser congelada (FTS), les quals posteriorment van ser utilitzades per practicar les respectives inseminacions *in vivo*. L'anàlisi espermàtica de les ejaculacions es va realitzar en tres estadis del procés de criopreservació: 17 °C, 5 °C i 240 min postdescongelació. Segons els valors obtinguts en la motilitat progressiva i en la vitalitat espermàtica als 240 min postdescongelació, cada ejaculació es va classificar en dues possibles categories: ejaculació amb bona congelabilitat (GFE) o ejaculació amb mala congelabilitat (PFE). Els resultats mostren una major hiperactivitat espermàtica en el grup PFE quan s'assoleixen els 5 °C durant el procés de criopreservació. Aquest fet indica una sensibilitat més alta al xoc per fred respecte al grup GFE, que repercuteix en la disminució fins a la meitat de la seva taxa fecundant. No s'observen diferències entre els paràmetres de qualitat espermàtica o en la taxa de fertilitat obtinguts a 17 °C en cap dels dos grups d'ejaculacions. Per tant, la predicció de la congelabilitat d'una ejaculació a partir de paràmetres rutinaris de qualitat espermàtica és vàlida en assolir els 5 °C durant el procés de criopreservació. Aquest resultat contribueix al coneixement de possibles predictors de la congelabilitat espermàtica en porcí. No obstant això, són necessaris més estudis per aprofundir en la determinació de marcadors específics que puguin minimitzar costos en utilitzar esperma criopreservat per a inseminació artificial.

Paraules clau: criopreservació, esperma porcí, fertilitat, congelabilitat.

Abstract

The objective of this work is to value the prediction of the freezability of boar ejaculates through a study of the spermatic quality and its comparison with the *in vivo* fertility. Twenty-six ejaculates were collected and each one was divided into a refrigerated portion (FS, control) and a frozen-thawed portion (FTS) that were used in the field fertility trial. The analysis of the sperm quality was performed at three steps of the cryopreservation procedure: 17 °C, 5 °C and 240 min post-thawing. Depending on the values obtained in the sperm progressive motility and viability at 240 min post-thawing, each ejaculate was classified in two possible categories: good freezability ejaculate (GFE) or poor freezability ejaculate (PFE). Our results show a higher sperm hyperactivity in the PFE group at the 5 °C during the cryopreservation process. This fact points to a higher sensitivity of this group to cold shock with respect to the GFE, which causes the decrease of its fecundity to the half. No differences are observed in the sperm quality parameters or in the fertility rate at 17 °C between both categories of ejaculates. For that reason, the prediction of the freezability of a given ejaculate is possible when reaching the 5 °C during the cryopreservation process. This result contributes to the knowledge of possible sperm freezability predictors in the boar. Even so, more studies are necessary to penetrate in the determination of specific freezability markers that could minimize costs when using cryopreserved sperm for artificial insemination.

Key words: cryopreservation, boar sperm, fertility, freezability.

INTRODUCCIÓ

L'ús de semen congelat (FTS) en tecnologies d'inseminació artificial porcina representa sols l'1 % del total d'inseminacions en comparació de l'ús del semen refrigerat (FS) (Roca *et al.*, 2006). Aquest fet es pot explicar pel baix percentatge d'èxit obtingut en la congelació dels espermatozoides d'aquesta espècie, principalment a causa de la particular composició de la seva membrana (Watson, 2000). La tolerància de les ejaculacions al procés de congelació té una clara base genètica (Thurston, 2002*a, b*) i varia entre individus (Roca *et al.*, 2006), però també dins d'un mateix individu per factors no sempre determinats (Gil *et al.*, 2005). En estudis previs hem observat una freqüència de motilitat espermàtica progressiva postdescongelació inferior al 40 % en més del 50 % dels casos; és, doncs, prioritari, trobar marcadors que permetin una identificació prèvia d'aquestes ejaculacions menys aptes per criopreservar. L'existència d'una base genètica evident en la congelabilitat espermàtica ens suggereix la possibilitat de predir la qualitat postdescongelació de qualsevol ejaculació a partir d'uns valors qualitius estàndard en semen refrigerat, que podrien ser inclosos en les anàlisis de qualitat espermàtica dels centres d'inseminació artificial (IA). D'altra banda, i malgrat les evidències, encara no hi ha dades publicades sobre els percentatges de fertilitat *in vivo* que presenten les ejaculacions segons la seva congelabilitat.

MATERIAL I MÈTODES

Obtenció de mostres i disseny experimental

Vint-i-sis ejaculacions de porcí provinents de quinze mascles Piétrain madurs van ser obtingudes per masturbació manual. La fracció espermàtica de cada ejaculació va ser dividida en dues porcions, que es van etiquetar com la porció refrigerada (FS, control) i la porció destinada a ser congelada (FTS). La porció FS es va diluir fins a 3×10^9 spz/ml en diluent de llarga durada (Vitasem LD, Magapor SL, Saragossa) i es va envasar en tres dosis comercials de 90 ml, que es van preservar a 17 °C fins al moment de la IA. La resta de l'ejaculació (porció FTS) va ser diluïda 1:5, v/v en el mateix diluent que la porció FS, i va ser preservada a 17 °C abans de ser criopreservada.

Vint-i-quatre hores després de l'extracció es va realitzar l'anàlisi de la qualitat espermàtica a 17 °C a partir de la porció FTS i es va comprovar que les 26

ejaculacions complissin uns mínims qualitius: 60 % de motilitat espermàtica progressiva, 70 % d'espermatozoides morfològicament normals i 80 % de viabilitat i resistència osmòtica espermàtiques. Un cop verificats els paràmetres anteriors es va procedir a la congelació de la porció FTS fent servir un protocol estàndard en porcí (Westendorf *et al.*, 1975; Carvajal *et al.*, 2004). L'anàlisi a 5 °C es va realitzar a partir d'una alíquota d'esperma diluït en medi de criopreservació, i es va rediluir a proporció 1:3, v/v en diluent de Beltsville (BTS; Pursel i Johnson, 1975). L'anàlisi de la qualitat seminal es va fer després de 30 min a 5 °C. La resta de la porció FTS es va envasar en palletes de 0,5 ml amb 1×10^9 spz/ml i va ser emmagatzemada durant 12 h en nitrogen líquid abans de les inseminacions. Tant per a la IA com per a l'anàlisi de la qualitat espermàtica postdescongelació les palletes van ser submergides durant 20 segons en un bany a 37 °C i el seu contingut va ser diluït en BTS a 37 °C (1:3, v/v). L'esperma es va mantenir al bany fins passats 240 min.

Cada ejaculació va ser classificada com a ejaculació amb bona congelabilitat (GFE) o ejaculació amb mala congelabilitat (PFE), segons una anàlisi de conglomerats no jerarquitzada mitjançant les dissimilituds entre les mitjanes de viabilitat i motilitat progressiva obtingudes en l'esperma 240 min postdescongelació. Vuitanta-sis truges múltiples van ser inseminades aleatòriament amb un dels quatre tractaments següents: porció refrigerada d'ejaculació amb bona congelabilitat (FS-GFE), porció refrigerada d'ejaculació amb mala congelabilitat (FS-PFE), porció descongelada d'ejaculació amb bona congelabilitat (FTS-GFE) i porció descongelada d'ejaculació amb mala congelabilitat (FTS-PFE).

Anàlisi de la qualitat espermàtica

La morfologia es va analitzar únicament a 17 °C com a control de la qualitat inicial de l'ejaculació, ja que s'ha comprovat que les úniques alteracions morfològiques que provoca la congelació són canvis de volum en l'espermatozoide per efectes osmòtics (García-Herreros *et al.*, 2008; Petrunkina *et al.*, 2005). En el recompte d'espermatozoides anòmals es van incloure aquells que presentaven gota citoplasmàtica proximal, cua doblegada, cua enrotllada, cua trencada o alguna malformació del cap. La motilitat es va examinar sobre placa calefactada a 37 °C mitjançant un programa informàtic d'anàlisi computada (CASA, SCA Production 2002, Microptic SL, Barcelona). Es van analitzar onze paràmetres cinètics: motilitat total, recorreguts circulars, velocitat

curvilínia (VCL), velocitat lineal (VSL), velocitat mitjana (VAP), linealitat (LIN = VSL/VCL), rectitud (STR = VSL/VAP), oscil·lació (WOB = VAP/VCL), amplitud del desplaçament lateral del cap (ALH), freqüència de batuda (BCF) i motilitat progressiva (espermatozoides amb STR superior al 45 %). La viabilitat espermàtica es va mesurar a través de la integritat de la membrana mitjançant l'ús de les sondes fluorescents SYBR-14/PI (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) i la resistència osmòtica dels espermatozoides es va valorar segons el test ORT (Schilling *et al.*, 1984; Pérez-Llano *et al.*, 1998), calculant el percentatge com la mitjana d'espermatozoides amb acrosomes no reaccionats en solucions isotònica i hipotònica.

Inseminació artificial (IA)

Totes les truges va ser tractades amb PMSG/hcCG (Gestavet, Hipra, Girona) per induir i sincronitzar l'ovulació. Després de 48 hores de la inducció hormonal, les truges van ser inseminades aleatòriament amb un dels quatre tractaments descrits. Cada setmana es van extreure entre dues i tres ejaculacions i es van inseminar un mínim de dues truges per cada ejaculació, una amb la porció FS i l'altra amb la porció FTS. Es van realitzar dues inseminacions de 30 ml per truja i tractament en un interval de quatre hores (Waberski *et al.*, 1994), corresponents a una concentració de 1×10^9 spz/inseminació per a la porció FS (Gil, 2006; Watson i Behan, 2002) i $7,5 \times 10^9$ spz/inseminació per a la porció FTS. Les inseminacions es van dur a terme amb la sonda postcervical Soft-Quick (Import-vet SA, Barcelona). El nombre de truges prenyades es va detectar 28 dies més tard per ecografia (Echoscan T-100, Import-vet SA, Barcelona) i també es va determinar el nombre de garrins nascuts.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Tretze ejaculacions van ser classificades estadísticament com a GFE i 13 com a PFE. Els resultats de l'anàlisi espermàtica es mostren a la taula 1. L'estimació de la congelabilitat de les ejaculacions d'acord amb els paràmetres cinètics no va ser possible als 17 °C perquè no es van observar diferències entre GFE i PFE en cap dels paràmetres analitzats però sí als 5 °C, moment en el qual es van observar diferències en resistència osmòtica, motilitat progressiva, LIN i STR (*t*-student, $P \leq 0,05$). Són d'especial rellevància els baixos valors de LIN i STR a 5 °C, que

coincideixen amb l'existència d'espermatozoides amb un moviment hiperactivat, tal com s'ha observat en espermatozoides capacitats (Schmidt i Kamp, 2004). S'ha demostrat que el semen congelat pateix modificacions semblants a la capacitació, anomenades *criocapacitació*, que es manifesten en aquest tipus de moviment a causa de canvis en la fluïdesa de la membrana de l'espermatozoide durant el xoc per fred, especialment entre els 17 i els 5 °C (Watson, 2000; Andrabi, 2007), i el qual desapareix en descongelar (Guthrie i Welch, 2005; Saravia *et al.*, 2007) coincidint amb l'increment de LIN i STR. Aquest procés disminueix la supervivència de l'espermatozoide i, per tant, les oportunitats d'arribar a fecundar l'òocit (Green i Watson, 2001), i es proposa que la mortalitat provocada per la criocapacitació podria ser la causa de l'absència d'hiperactivació observada en descongelar (Cremades *et al.*, 2005). En PFE els valors de LIN i STR són inferiors que en GFE i, per tant, es pot concloure que els PFE tenen un major índex de criocapacitació, i això suggereix una alta inestabilitat de la membrana dels seus espermatozoides.

Els resultats de la IA (vegeu la taula 2) demostren, tal com s'esperava, una disminució de la fertilitat en PFE. El nombre de truges prenyades no va variar entre el tractament FTS-GFE i els tractaments control (FS-GFE/PFE) però sí entre el tractament FTS-PFE i els tractaments control i entre el tractament FTS-PFE i el tractament FTS-GFE. En ambdós casos el nombre de truges prenyades va ser inferior en FT-PFE (model lineal general, post-hoc Bonferroni, $P < 0,05$). No es van observar diferències en el nombre de garrins nascuts entre els quatre tractaments assajats. Els resultats demostren que les ejaculacions amb baixa motilitat progressiva i viabilitat espermàtica postdescongelació tenen una fecunditat fins a dues vegades inferior que la de les ejaculacions amb bona congelabilitat, fet que molt probablement està lligat a la selecció que es produeix *in vivo* en favor dels espermatozoides mòbils i viables (Taylor *et al.*, 2008).

AGRAÏMENTS

A tot el personal de BioGirona SL, pel suport en la recollida i processament de les ejaculacions. La recerca ha estat finançada amb els projectes AGL2004-04756-002-01/GAN i CDTI TAM4321 del Pla Nacional d'I+D+I i amb ajuts del Departament d'Innovació, Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu.

Taula 1. Anàlisi de qualitat espermàtica en tres etapes de la criopreservació (17 °C, 5 °C i 240 min postdescongelació)

Anàlisi de la qualitat espermàtica		17 °C	5 °C	240 min postdescongelació
Resistència osmòtica (%)	GFE	91,33 ± 1,13	**94,47 ± 0,57	*83,03 ± 1,19
	PFE	89,19 ± 1,61	96,31 ± 0,34	78,24 ± 1,78
Viabilitat (%)	GFE	90,15 ± 0,78	86,95 ± 1,24	**50,99 ± 2,25
	PFE	89,63 ± 0,68	86,22 ± 2,14	25,67 ± 2,66
Motilitat				
Motilitat total (%)	GFE	96,95 ± 0,43	99,47 ± 0,07	**87,73 ± 2,16
	PFE	97,05 ± 0,46	93,46 ± 5,08	40,84 ± 8,05
Motilitat progressiva (%)	GFE	90,15 ± 0,78	*72,18 ± 0,76	**55,46 ± 3,02
	PFE	89,63 ± 0,68	61,30 ± 4,85	21,65 ± 5,33
Recorreguts circulars (%)	GFE	96,95 ± 0,43	66,11 ± 2,26	**39,69 ± 2,08
	PFE	97,05 ± 0,46	70,90 ± 4,73	19,71 ± 3,80
VCL (µm/s)	GFE	67,90 ± 1,51	89,73 ± 3,29	**47,54 ± 2,46
	PFE	65,00 ± 1,65	85,51 ± 7,00	33,26 ± 3,24
VSL (µm/s)	GFE	53,19 ± 2,80	37,42 ± 1,13	**28,25 ± 1,33
	PFE	56,03 ± 3,21	32,09 ± 2,94	18,67 ± 2,51
VAP (µm/s)	GFE	55,57 ± 2,54	60,12 ± 1,89	**37,85 ± 1,88
	PFE	57,88 ± 4,12	55,16 ± 4,59	24,98 ± 2,95
LIN (%)	GFE	26,56 ± 0,97	**42,58 ± 1,12	59,76 ± 1,21
	PFE	26,54 ± 1,28	37,39 ± 1,51	53,09 ± 3,46
STR (%)	GFE	40,77 ± 1,58	**62,60 ± 0,87	74,82 ± 0,91
	PFE	42,06 ± 2,38	57,69 ± 1,19	71,91 ± 2,36
WOB (%)	GFE	48,52 ± 1,35	67,70 ± 0,86	*79,74 ± 0,69
	PFE	47,11 ± 1,67	64,67 ± 2,16	72,62 ± 2,736
ALH (µm)	GFE	2,49 ± 0,10	3,74 ± 0,13	2,16 ± 0,06
	PFE	2,69 ± 0,21	3,77 ± 0,23	1,79 ± 0,19
BCF (Hz)	GFE	6,56 ± 0,11	6,49 ± 0,09	*6,38 ± 0,06
	PFE	6,59 ± 0,12	5,91 ± 0,27	4,65 ± 0,67

Es mostren les mitjanes i l'error estàndard. Els 13 paràmetres qualitius es van assajar sobre 13 ejaculacions amb bona congelabilitat (GFE) i 13 ejaculacions amb mala congelabilitat (PFE). Els valors dels paràmetres amb asterisc són estadísticament diferents entre GFE i PFE per a l'etapa a la qual es refereixen (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$).

Taula 2. Resultats de la inseminació artificial postcervical

	Porció FS (control)		Porció FTS	
	GFE	PFE	GFE	PFE
Mascles porcins ($n=15$)	9	9	9	9
Ejaculacions ($n=26$)	13	13	13	13
Truges inseminades (n)	21	20	26	19
Volum inseminat per truja (ml)	30 (×2)	30 (×2)	30 (×2)	30 (×2)
Concentració (×10 ⁹ spz/inseminació)	1	1	7,5	7,5
Truges en les quals es va observar reflux (n)	4	2	8	4
Truges prenyades als 28 dies (n)	17 ¹	17 ¹	16 ^a	5 ^{b,2}
Taxa de fecundació (%)	80,95	85	61,54	26,32
Garrins nascuts vius (n)	10,06 ± 0,89	11,27 ± 0,61	8,64 ± 0,94	9,40 ± 0,93
Garrins totals (n)	10,65 ± 0,74	12,13 ± 0,57	9,36 ± 1,15	10,60 ± 1,21

Per al nombre de garrins es mostren les mitjanes i l'error estàndard. FS-GFE: semen refrigerat d'ejaculació amb bona congelabilitat; FS-PFE: semen refrigerat d'ejaculació amb mala congelabilitat; FTS-GFE: semen descongelat d'ejaculació amb bona congelabilitat; FTS-PFE: semen descongelat d'ejaculació amb mala congelabilitat. Els valors a la mateixa fila amb diferent superíndex són significativament diferents (^{a,b} $P < 0,05$; ^{1,2} $P < 0,01$).

BIBLIOGRAFIA

- ANDRABI, S. M. H. (2007). «Fundamental principles of cryopreservation of *Bos taurus* and *Bos indicus* bull spermatozoa (mini review)». *Int. J. Agri. Biol.*, 9(2): 367-369.
- CARVAJAL, G.; CUELLO, C.; RUÍZ, M.; VÁZQUEZ, J.

- M.; MARTÍNEZ, E. A.; ROCA, J. (2004). «Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival». *J. Androl.*, 25(3): 389-396.
- CREMADES, T.; ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; ABAIGAR, T.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. (2005). «Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa». *J. Androl.*, 26(5): 610-608.
- GARCÍA-HERREROS, M.; BARÓN, F. J.; APARICIO, I. M.; SANTOS, A. J.; GARCÍA-MARÍN, L. J.; GIL, M. C. (2008). «Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation». *Int. J. Androl.*, 31(5): 490-408.
- GIL, J. (2006). «Inseminación post-cervical. Utilización en rutina de trabajo». *Avances en Tecnología Porcina*, 3(3): 66-76.
- GIL, M. A.; ROCA, J.; CREMADES, T.; HERNÁNDEZ, M.; VÁZQUEZ, J. M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; MARTÍNEZ, E. A. (2005). «Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?». *Theriogenology*, 64(2): 305-316.
- GREEN, C. E.; WATSON, P. F. (2001). «Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation». *Reproduction*, 122(6): 889-898.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. (2005). «Effects of hypothermic liquid storage and cryopreservation on basal and induced plasma membrane phospholipid disorder and acrosome exocytosis in boar spermatozoa». *Reprod. Fertil. Dev.*, 17(4): 467-477.
- PÉREZ-LLANO, B.; SANCHEZ-SANCHEZ, J. L.; LORENZO-GONZÁLEZ, P.; GARCÍA-CASADO, P. (1998). «A short version of the osmotic resistance test for boar semen». *Proceedings of the XVth International Pigs Veterinary Society Congress (IPVS), Birmingham*, 61.
- PETRUNKINA, A. M.; JEBE, E.; TÖPFER-PETERSEN, E. (2005). «Regulatory and necrotic volume increase in boar spermatozoa». *J. Cell Physiol.*, 204(2): 508-521.
- PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. (1975). «Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure». *J. Anim. Sci.*, 40(1): 99-102.
- ROCA, J.; HERNÁNDEZ, M.; CARVAJAL, G.; VÁZQUEZ, J. M.; MARTÍNEZ, E. A. (2006). «Factors influencing boar sperm cryosurvival». *J. Anim. Sci.*, 84(10): 2692-2699.
- SARAVIA, F.; HERNÁNDEZ, M.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (2007). «Controlled cooling during semen cryopreservation does not induce capacitation of spermatozoa from two portions of the boar ejaculate». *Int. J. Androl.*, 30(6): 485-499.
- SCHILLING, E.; VENGUST, M.; SMIDT, D. (1984) «ORT - A new test to predict the freezability and storage of boar spermatozoa». *Proceedings of the VIIIth International Pigs Veterinary Society Congress (IPVS) Ghent*, 296.
- SCHMIDT, H.; KAMP, G. (2004). «Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis». *Reproduction*, 128(2): 171-179.
- TAYLOR, U.; RATH, D.; ZERBE, H.; SCHUBERTH, H.-J. (2008). «Interaction of intact porcine spermatozoa with epithelial cells and neutrophilic granulocytes during uterine passage». *Reprod. Domest. Anim.*, 43(2): 166-175.
- THURSTON, L. M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A. J.; WATSON, P. F.; HOLT, W. V. (2002a) «Semen cryopreservation: a genetic explanation for species and individual variation?». *Cryo. Letters*, 23(4): 255-262.
- (2002b). «Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability cryopreservation». *Biol. Reprod.*, 66(3): 545-554.
- WABERSKI, D.; WEITZE, K. F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. (1994). «Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen». *Theriogenology*, 42(5): 831-840.
- WATSON, P. F. (2000). «The causes of reduced fertility with cryopreserved semen». *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 481-492.
- WATSON, P. F.; BEHAN, J. R. (2002). «Intrauterine insemination of sows with reduced sperm numbers: results of a commercially based field trial». *Theriogenology*, 57(6): 1683-1893.
- WESTENDORF, P.; RICHTER, L.; TREU, H. (1975). «Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren». *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 82: 261-267.