Evaluación de un nuevo diluyente viscoso de larga duración, ND-5 3D®

para la conservación de semen de cerdo en estado líquido

● **María Cruz Gil Anaya[1], Francisco Javier Barón[2], Jesús Manuel Guerrero[1], Luis Jesús García-Marín[1] y Javier Gil Pascual[2].**

[1] Research Team of Intracellular Signaling and Technology of Reproduction (SINTREP), Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres (España).

[2] Department of Preventive Medicine and Public Health, Facultad de Medicina, Universidad de Málaga, España.

● **Trabajo publicado como:** *Increasing Extender Viscosity Improves the Quality of Cooled Boar Semen. Journal of Agricultural Science; Vol. 6, No. 3; 2014. ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760 Published by Canadian Center of Science and Education*

Introducción

Está ampliamente reconocido en la actualidad el papel que ha desempeñado la tecnología de la inseminación artificial (IA) porcina con semen refrigerado en la mejora de la producción porcina mundial. Entre otras ventajas, esta tecnología permite la máxima utilización del potencial genético de reproductores de alto valor. Un mayor conocimiento de la fisiología y manejo de la cerda, de la mejora del procesamiento y manejo del semen y mejores diluyentes han contribuido al gran desarrollo de esta tecnología.

Dado que el plasma seminal por sí solo no permite una conservación duradera del semen, la adición de un diluyente permite, además de aumentar el volumen del eyaculado, prolongar su vida media y mantener un adecuado nivel de fertilidad en las cerdas. Dada la especial susceptibilidad de los espermatozoides porcinos al shock por frío, estos necesitan ser almacenados a temperaturas de 15-20º C, lo que limita su capacidad de almacenamiento.

En los últimos 10 años ha habido un importante desarrollo y aplicación de nuevos diluyentes para semen porcino tanto para corta (1-3 días) como para larga duración (más de 4 días) (Riesenbeck, 2011). Dado los excelentes resultados de fertilidad que se obtienen con semen refrigerado todo parece indicar que en los próximos años seguirá siendo la tecnología de conservación espermática más ampliamente utilizada en los programas de cría porcina (Roca et al., 2006).

El uso de diluyentes de larga duración está indicado en situaciones en las que se prevea una sobrecarga de trabajo en el centro de IA, cuando se manejan grandes grupos de cerdas o cuando se elaboran dosis seminales a partir de machos poco demandados o de uso no habitual. También permiten el transporte de semen a lugares distantes a su lugar de producción. Durante el almacenamiento de las dosis seminales en las cámaras de conservación es inevitable la sedimentación de los espermatozoides en la parte inferior del envase, que será más acentuada conforme incrementa el tiempo de conservación. Esto significa que la interacción de los espermatozoides sedimentados con los diferentes componentes del medio y las condiciones en las que se encuentran no van a ser las mismas para estos espermatozoides sedimentados que para el resto, lo que afecta a su integridad y supervivencia. Es por ello que se recomienda resuspender los espermatozoides mediante agitación o rotado suave de la dosis seminal una o dos veces al día en el caso de que la cámara de conservación no disponga de soportes giratorios automáticos. En este sentido, Rodríguez-Gil y Rigau (1995) demostraron que la agitación suave de dosis seminales de cerdo mejoraba la calidad espermática después de 48 y 92 horas de conservación a 15-17ºC con respecto a dosis no agitadas, confirmando así el efecto negativo de la sedimentación. Sin embargo, este procedimiento, si no es automatizado, supone la extracción de las dosis de la cámara de conservación y su exposición a la luz y a variaciones de temperatura. En la práctica este procedimiento se realiza de forma ocasional.

El uso de un diluyente que mantenga un mayor número de espermatozoides en suspensión evitaría la realización de esta maniobra al mismo tiempo que produciría una distribución más uniforme de los espermatozoides en el diluyente, y por tanto una mejor interacción con los componentes del mismo. Esto es posible incrementando la viscosidad del medio. En este sentido, Corcini et al. (2011) observaron que la adición de gelatina al diluyente BTS para semen de cerdo, un diluyente de corta duración, producía un descenso menos pronunciado durante el tiempo de conservación del porcentaje de espermatozoides mótiles y morfológicamente normales con respecto a las muestras a las que no se añadió gelatina, si bien no observaron diferencias significativas en ambos parámetros

entre diluyentes. Coy et al. (2009) demostraron que la resuspensión de espermatozoides eyaculados de cerdo en un medio viscoso aumentaba la estabilidad de la membrana espermática, disminuía la producción de ROS y aumentaba la capacidad de los espermatozoides para penetrar ovocitos in vitro. No tenemos referencia en la literatura del empleo de diluyentes viscosos de larga duración para la conservación a largo plazo de semen porcino en estado líquido. Es por ello que la empresa Import-Vet, S. A. (Centelles, España) ha diseñado el diluyente viscoso ND-5 3D® para conservación a largo plazo. En este trabajo hemos evaluado por primera vez la eficacia de un nuevo diluyente viscoso de larga duración, ND5-3D® (Import-vet®, Centelles, España) en términos de su capacidad para preservar la calidad espermática de dosis seminales de cerdo tras 7 días de conservación a 17º C. Como diluyente control se utilizó el mismo diluyente al que no se le incrementó la viscosidad (ND-5®, Import-Vet). Nuestra hipótesis es que este diluyente mejorará la calidad espermática de las dosis seminales conservadas al disminuir la sedimentación de los espermatozoides durante la conservación.

Material y métodos

Experimento 1: Evaluación de los diluyentes *Zoosperm ND-5®* y *Zoosperm ND-5 3D®*

Se han analizado un total de 20 eyaculados procedentes de cinco cerdos Pietrain sanos, sexualmente maduros (2-3 años de edad) y fértiles, pertenecientes a un centro de inseminación artificial situado en Segovia (España). Los cerdos estaban sometidos a una recolección regular de semen a un ritmo de extracción de una vez por semana para su uso a nivel comercial. Todos los machos estaban alojados en cuadras individuales, en un ambiente controlado (15-26º C) y recibieron la misma dieta. La experiencia fue realizada durante los meses de febrero a abril de 2012.

El eyaculado fue recogido mediante la técnica de "la mano enguantada" tras lo cual fue homogenizado suavemente y dividido en dos partes iguales. Tras una evaluación inicial de la motilidad (evaluada subjetivamente mediante microscopio de luz), morfoanomalías y concentración (en cámara Bürker) una de las fracciones fue diluida hasta una concentración final de 33 x 10^6 espermatozoides/ml con el diluyente *Zoosperm ND-5®* (pH= 6,9 , osmolaridad= 295 mOsm/L, en adelante *ND-5*) y el resto, a la misma concentración, con el diluyente viscoso *Zoosperm ND-5 3D®* (pH= 6,9, osmolaridad= 295 mOsm/L, en adelante *3D*), de la empresa Import-Vet, S.A., Centelles, España).

La composición de los diluyentes sólo difiere en el compuesto hidrocoloide añadido al diluyente *3D* para incrementar la viscosidad. Ambos diluyentes fueron preparados siguiendo las instrucciones del fabricante. La dilución de ambas fracciones del eyaculado fue realizada dentro de los 15 minutos de su obtención. Sólo fueron seleccionados para la prueba aquellos eyaculados con al menos un 70% de espermatozoides mótiles y menos de un 20% de espermatozoides morfológicamente anormales. El semen diluido fue con posterioridad envasado en botellas de plástico de 90 ml. Tras el descenso de la temperatura de las dosis seminales a 20-22º C en aproximadamente dos horas a temperatura ambiente tres botellas de cada eyaculado diluido en *ND-5* o *3D* fueron almacenadas en una estufa de conservación a 16-17º C hasta su transporte al laboratorio de la Facultad de Veterinaria de Cáceres. Este transporte, de unas 12 horas de duración, fue realizado durante la noche en cajas isotermas a través de una empresa de mensajería sin ninguna indicación especial. A su llegada al laboratorio las dosis seminales fueron almacenadas en un incubador refrigerado (*FOC 225 I*, VELP Scientifica, Usmate, Italy) a 16-17º C durante 7 días (día de la recogida = día 0). En los días 1, 4 y 7 se extrajeron dos alícuotas de una de las botellas de cada diluyente. En cada una de las alícuotas se evaluaron los siguientes parámetros de calidad espermática: motilidad, viabilidad, estado del acrosoma, fluidez de la membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial e intensidad de la fluorescencia media. El análisis de la motilidad fue realizado mediante un sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) y el resto de los parámetros fue evaluado por citometría de flujo.

Análisis preliminar de datos de campo de resultados reproductivos

El centro de IA gestiona una base de datos que registra los resultados reproductivos de cerdas inseminadas con eyaculados de machos pertenecientes al centro. Hemos accedido al registro de una granja en donde simultáneamente se ensayaron ambos diluyentes en un número considerable de animales. Como la experiencia fue realizada siguiendo tanto el ritmo productivo del centro como de la propia granja, se utilizaron además de los machos utilizados para la experiencia 1, otros machos del centro. No nos ha sido posible diseñar una prueba en la

que los eyaculados ensayados en el laboratorio al mismo tiempo se utilizaran para inseminar cerdas en los distintos días de conservación. Ello es debido a que las pruebas de fertilidad in vivo requiere un gran número de animales para encontrar en los tests estadísticos diferencias significativas en fertilidad y prolificidad de las cerdas. En este sentido, tomando como referencia los datos reproductivos de la granja, la realización del cálculo del tamaño mínimo muestral necesario por diluyente para detectar una diferencia entre diluyentes de 0,3 lechones nacidos totales, con una potencia del estudio del 80% y un error alfa del 5%, resultó ser de unas 1.300 cerdas por diluyente. No fue posible acceder a granjas que permitieran la inseminación artificial de tal número de animales para ensayar ambos diluyentes.

En el centro de IA cada eyaculado de cada macho fue procesado de la forma descrita en el experimento 1. Una vez que las dosis seminales alcanzaron 20-22º C a temperatura ambiente se almacenaron a 16-17º C en el centro o bien fueron directamente transportadas en contenedores isotermos hasta la granja, donde fueron almacenadas a 16-17º C.

Se inseminaron cerdas de raza LDxLW, con número de parto de 2 a 8. Las cerdas asignadas a cada diluyente (261 cerdas *ND-5*; 264 cerdas *3D*) se distribuyeron aleatoriamente procurando en la medida de lo posible que las cerdas asignadas al eyaculado de un macho fueran del mismo número de parto. La inseminación artificial de las cerdas se realizó al tercer y cuarto día de la obtención del semen. Para cada intervalo fecha de recogida del semen-inseminación artificial se procuró que el número de cerdas inseminadas con cada diluyente fuese el mismo.

Después del destete, las cerdas que presentaron signos de celo fueron inseminadas vía post-cervical (volumen de semen: 45 mililitros, nº total de espermatozoides: 1.500 x 10^6, mediante el uso del conjunto catéter – cánula para inseminación post-cervical *Soft&Quick®* (Import-vet, Centelles, España) 0 y 24 horas después del diagnostico positivo del estro. La detección de celos fue realizada una vez al día, por la mañana, considerando signos de celo el reflejo de inmovilización ante la presencia de un macho sano y sexualmente activo así como enrojecimiento e inflamación de la vulva. Todas las inseminaciones fueron realizadas por el mismo técnico. Se registraron los datos de tasa de parto y tamaño de camada (número de lechones nacidos totales y vivos).

Resultados

Experimento 1: evaluación de los diluyentes *Zoosperm ND-5®* y *Zoosperm ND-5 3D®*

En la *Tabla 1* se muestran los resultados correspondientes a los análisis de motilidad. Excepto el valor del porcentaje de espermatozoides mótiles al día 7 de conservación, el resto fue significativamente diferente entre diluyentes para todos los días de conservación.

Tabla 1. Efecto de los diluyentes sobre los parámetros de motilidad a 1, 4 y 7 días después de la extracción/dilución.

Parámetros	ND-5	D-5 3D	ND-5	ND-5 3D	ND-5	ND-5 3D
	Day 1		Day 4		Day 7	
VCL (µm/s)	71.16 ± 0.21*	55.79 ± 0.21**	74.13 ± 0.21*	62.00 ± 0.21**	78.98 ± 0.22*	65.62 ± 0.27**
VSL (µm/s)	49.97 ± 0.18*	37.04 ± 0.18**	49.32 ± 0.18*	38.39 ± 0.17**	48.22 ± 0.18*	38.06 ± 0.19**
VAP (µm/s)	61.84 ± 0.18*	45.14 ± 0.18**	63.12 ± 0.18*	48.20 ± 0.18**	65.70 ± 0.18*	49.01 ± 0.20**
STR	0.79 ± 0.00*	0.81 ± 0.00**	0.76 ± 0.00*	0.79 ± 0.00**	0.72 ± 0.00*	0.77 ± 0.00**
WOB	0.86 ± 0.00*	0.82 ± 0.00**	0.84 ± 0.00*	0.78 ± 0.00**	0.82 ± 0.00*	0.74 ± 0.00**
ALH (µm)	2.14 ± 0.00*	1.99 ± 0.00**	2.29 ± 0.00*	2.25 ± 0.00**	2.55 ± 0.00*	2.41 ± 0.00**
BCF (µm)	8.09 ± 0.02*	8.22 ± 0.02**	7.87 ± 0.02*	8.90 ± 0.02**	7.76 ± 0.02*	9.36 ± 0.02**
TMS(%)	87.3 ± 0.00*	86.8 ± 0.00**	84.8 ± 0.00*	85.7 ± 0.00**	82.0 ± 0.00*	82.5 ± 0.00*
PMS (%)	56.1 ± 0.00*	59.1 ± 0.00**	47.7 ± 0.00*	53.1 ± 0.00**	40.3 ± 0.00*	47.8 ± 0.00**

TMS indicates percentage of total motile sperm; PMS, percentage of progressively motile sperm
Values are means ± standard error of the mean (SEM)
*,** For each parameter and within each storage day (rows) values with different superscripts are statistically different ($P < 0.05$)

En la se presentan las diferencias observadas entre diluyentes para cada parámetro. Estas diferencias nos muestran con más claridad en qué magnitud un diluyente es distinto al otro para cada parámetro. Se indica además si las diferencias observadas entre diluyentes fueron dependientes o no del día de conservación. Hay que destacar que tanto STR, indicador de la rectitud de la trayectoria del espermatozoide, como el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue superior en . Además, las diferencias entre diluyentes no se mantuvieron constantes durante el periodo de conservación, observándose una mayor diferencia al día 7, con respecto a los días 1 y 4. Al día 7, en el diluyente , STR incrementó de media un 5% con respecto al diluyente , mientras que los días 1 y 4 lo hizo en un 2%. En lo que respecta al porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva las diferencias medias fueron del 5%, 4% y 9% los días 1, 4 y 7 respectivamente (*Tabla 2*).

Tabla 2. Significaciones estadísticas para los parámetros de motilidad entre diluyentes en cada día de conservación.

Parámetro	Día 1	Día 4	Día 7	P
VCL (µm/s)	15.46 ± 1.40	11.86 ± 1.40	14.05 ± 1.50	n.s.
VSL (µm/s)	12.71 ± 1.19	10.78 ± 1.19	10.54 ± 1.28	n.s.
VAP (µm/s)	16.72 ± 1.28	14.74 ± 1.28	17.34 ± 1.37	n.s.
STR	-0.02 ± 0.00	-0.02 ± 0.00	-0.05 ± 0.00	0.01
WOB	0.04 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.03
ALH (µm)	0.16 ± 0.05	0.03 ± 0.05	0.16 ± 0.05	n.s.
BCF (µm)	-0.17 ± 0.16	-1.05 ± 0.16	-1.58 ± 0.17	0.00
TMS (%)	1.00 ± 1.20	1.00 ± 1.20	1.00 ± 1.30	n.s.
PMS (%)	-3.00 ± 1.70	-5.00 ± 1.70	-8.00 ± 1.80	n.s.

TMS indicates percentage of total motile sperm; PMS, percentage of progressively motile sperm
Values are means ± standard error of the mean (SEM)
P value tests whether mean difference (ND-5 - ND-5 3D) is constant through storage period
n. s. : not statistically significant (significance at $P < 0.05$)

Como puede observarse, los valores de los parámetros de velocidad VCL, VSL y VAP fueron superiores en el diluyente no viscoso *ND-5*; estas diferencias entre diluyentes se mantuvieron constantes a lo largo del periodo de conservación, por lo que podemos afirmar que en el diluyente *3D*, VCL disminuye en término medio casi en un 14%, VSL un 11,3% y VAP un 16,2%, con respecto al diluyente no viscoso *ND-5*.

La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) fue menor en el diluyente *3D* mientras que la frecuencia de batido del flagelo (BCF) fue, dada la mayor viscosidad del medio, superior en *3D*. Para BCF, además, esa diferencia entre diluyentes se fue incrementando a lo largo del periodo de conservación ($P < 0.01$).

En lo que respecta al porcentaje de espermatozoides mótiles, si bien se detectaron diferencias significativas ($P < 0.05$) los días 1 y 4 de conservación, probablemente debido al elevado tamaño muestral, esas diferencias fueron muy pequeñas, por lo que podemos decir que el incremento de la viscosidad no modificó este porcentaje.

En la *tabla 3* se presentan los resultados correspondientes a las variables de calidad espermática evaluadas por citometría de flujo en ambos diluyentes. En la *tabla 4* se muestran las diferencias observadas entre diluyentes.

Table 3. Efecto de los diluyentes sobre la integridad espermática valorada por citometría de flujo a 1, 4 y 7 días post dilución.

Parameter	ND-5	ND-5 3D	ND-5	ND-5 3D	ND-5	ND-5 3D
	Day 1		Day 4		Day 7	
VS	92.99 ± 0.383*	93.72 ± 0.38*	93.32 ± 0.36*	93.27 ± 0.36*	93.34 ± 0.36*	93.79 ± 0.36*
DAS	6.91 ± 0.56*	3.22 ± 0.56**	7.60 ± 0.55*	3.40 ± 0.55**	7.73 ± 0.55*	3.47 ± 0.55**
VUM	6.81 ± 0.38*	5.86 ± 0.38**	9.11 ± 0.37*	6.24 ± 0.37**	8.67 ± 0.37*	6.74 ± 0.40**
hMMP	76.95 ± 3.84*	81.88 ± 3.84*	73.36 ± 4.22*	79.77 ± 3.85*	79.94 ± 3.33*	80.32 ± 3.33*
MF	18.14 ± 1.79*	20.68 ± 1.79*	11.00 ± 1.95*	13.12 ± 1.79*	12.41 ± 1.55*	14.02 ± 1.55*

VS indicates viable spermatozoa with an intact plasma membrane (SYBR-14+/PI -); DAS, viable spermatozoa with a damaged acrosome (PNA+/PI-); VUM, viable spermatozoa with an unstable plasma membrane; hMMP, spermatozoa with high mitochondrial membrane potential; MF, mean fluorescence intensity (JC-1)
hMMP and MF were evaluated in centrifugated samples (n= 108 seminal samples)
Values are percentages ± standard error of the mean (SEM)
*,** For each parameter and within each storage day (rows) values with different superscripts are statistically different ($P < 0.05$)

Tabla 4. Significaciones estadísticas para los parámetros de integridad espermática valorados por citometría, entre diluyentes en cada día de conservación

Parámetro	Día 1	Día 4	Día 7	P
VS	- 0.73 ± 0.47	0.05 ± 0.46	- 0.45 ± 0.46	n.s.
DAS	3.70 ± 0.84	4.20 ± 0.84	4.27 ± 0.84	n.s.
VUM	0.98 ± 0.49	2.87 ± 0.49	2.31 ± 0.53	0.03
hMMP	4.93 ± 2.65	5.23 ± 2.91	0.38 ± 2.30	n.s.
MF	2.54 ± 1.95	2.23 ± 2.14	1.61 ± 1.69	n.s.

VS indicates viable spermatozoa with an intact plasma membrane (SYBR-14+/PI -); DAS, viable spermatozoa with a damaged acrosome (PNA+/PI-); VUM, viable spermatozoa with an unstable plasma membrane; hMMP, spermatozoa with high mitochondrial membrane potential; MF, mean fluorescence intensity (JC-1)
hMMP and MF were evaluated in centrifugated samples (n= 108 seminal samples)
Values are percentages ± standard error of the mean (SEM)
P value tests whether mean difference (ND-5® - ND-5 3D®) is constant through storage period (significance at $P < 0.05$); n. s. : not statistically significant (significance at $P < 0.05$)

No hubo diferencias entre diluyentes con respecto al porcentaje de espermatozoides viables con una membrana plasmática intacta (VS) y al porcentaje de espermatozoides con un alto potencial de membrana mitocondrial (MF). Por el contrario, con el diluyente ***3D***, considerando la población de espermatozoides vivos, se obtuvo una reducción de 4 puntos de media en el porcentaje de espermatozoides con acrosomas dañados (DAS), ($P < 0.001$), descenso que se mantuvo constante durante los 7 días de conservación. También con este diluyente se observó un descenso significativo ($P < 0.02$) del porcentaje de espermatozoides con membrana plasmática inestable (VUM), ($P < 0.02$) (M540 negative/ YoPro-1 ***negative spermatozoa***); este descenso fue dependiente del día de conservación.

Mientras que el potencial de membrana mitocondrial no fue diferente entre diluyentes sí lo fue la intensidad de la fluorescencia media, con valores significativamente superiores en ***3D*** al día 7 de conservación. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, en los días 1 y 4 los valores de este parámetro fueron también superiores en ***3D***.

Resultados reproductivos.

Los resultados de tasas de parto y tamaño de camada se reflejan en la ***Tabla 5***. En ella se puede ver un aumento de 1.74 % en la tasa de partos y de 0.17 lechones nacidos vivos en las cerdas inseminadas con el diluyente denso aunque estos incrementos no fueron significativos estadísticamente ($P > 0.05$).

Tabla 5. Tasa de partos y tamaño de camada de cerdas inseminadas con semen diluido en ND-5® o ND-5 3D® y conservado de 3 a 4 días

Diluyente	Tasa de partos (%)	LNV	LTN
ND-5 (n= 261)	80.84	12.19 ± 2.96	13.16 ± 3.23
ND-5 3D (n= 264)	82.58	12.36 ± 2.69	13.37 ± 2.89

LNV and LTN indicates total number of piglets and live piglets born (mean ± sd)
Means did not differ ($P > 0.05$)

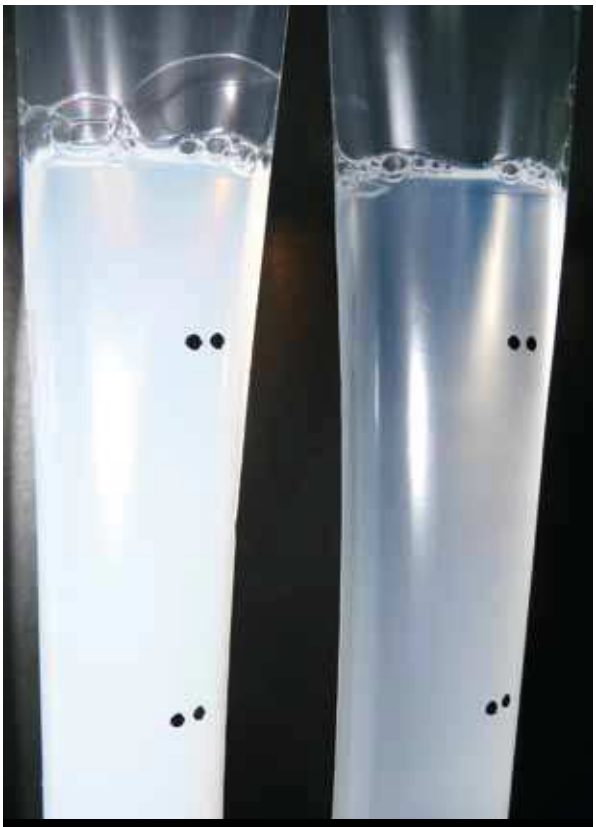

Figura 1.

Durante el almacenamiento de las dosis seminales de cerdo a temperaturas de 15-17º C ocurre una progresiva disminución de la calidad espermática debida al proceso normal de envejecimiento de los espermatozoides. Pero durante esta conservación también ocurre una sedimentación de los espermatozoides, que será mayor conforme incrementa el tiempo de almacenamiento. De no usar un sistema automatizado de agitación, la práctica indica que la agitación manual de las dosis de forma regular, para minimizar los efectos perjudiciales de la sedimentación, no siempre se lleva a cabo. Para algunos investigadores estos efectos derivan de las diferentes condiciones de pH y de distribución de nutrientes y otros compuestos, en las distintas capas de espermatozoides sedimentados, comprometiéndose la integridad de estos espermatozoides, que ya de por sí se ve mermada durante el tiempo de conservación (Rodríguez-Gil and Rigau, 1995; Nagy et al., 2002). Un incremento de la viscosidad del diluyente puede aumentar el número de espermatozoides que se mantienen en suspensión y por tanto, reducir la sedimentación, pero al mismo tiempo no debe disminuir la calidad espermática más que la debida al proceso de envejecimiento normal. Es por ello que en este trabajo se han analizado los efectos a largo plazo de un nuevo diluyente al que se le ha incrementado la viscosidad, ***ND-5 3D®***, el primer diluyente viscoso comercial de larga duración para semen porcino refrigerado. Se han

evaluado los efectos sobre diversos parámetros de integridad y funcionalidad espermática, y se han comparado con el diluyente no viscoso *ND-5*®. El diluyente *3D* disminuyó en gran medida la sedimentación durante los 7 días de conservación, por lo que una de las ventajas de su uso es la no necesidad por parte del técnico de la rotación manual de las dosis seminales, tarea muchas veces descuidada por el técnico, unido a la no exposición de las mismas a la luz y a las fluctuaciones de la temperatura

Los parámetros indicadores de la velocidad espermática fueron diferentes en ambos diluyentes. La razón más probable es porque ambos medios tienen distinta densidad. Está demostrado que la viscosidad del medio que rodea al espermatozoide influye en el patrón de su movimiento. Así, en espermatozoide de toro, la frecuencia de batido del flagelo disminuye casi exactamente con la raíz cuadrada de la viscosidad. Mientras que el movimiento hiperactivo de un espermatozoide de ratón es no lineal en un medio de baja viscosidad, éste se vuelve más lineal cuando el espermatozoide se encuentra en una solución altamente viscosa o viscoelástica (Suárez and Dai, 1990). Nuestros resultados son una aportación más al estudio de las importantes diferencias observadas en el patrón de motilidad de espermatozoides en medios de distinta viscosidad, y la cada vez mayor consideración que este hecho está teniendo en la evaluación de los parámetros de motilidad en condiciones *in vitro* con vistas a su posterior correlación con la motilidad *in vivo*. En nuestro estudio, el incremento de la viscosidad del diluyente produjo una reducción de los parámetros de velocidad VCL, VSL y VAP. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Suárez y Dai (1992) en espermatozoides de ratón.

La evaluación del porcentaje de espermatozoides mótiles y en particular aquéllos que presentan una motilidad progresiva, es uno de los parámetros más frecuentemente utilizados para medir la calidad de un eyaculado, dada su importancia en la migración a través del tracto genital femenino y en la penetración de las envolturas del ovocito. Así, es considerado uno de los parámetros que determinan las tasas de fertilización *in vitro* (Turner, 2006; Simon and Lewis, 2011). En nuestro estudio, el diluyente viscoso 3D produjo un incremento tanto del índice de la rectitud de la trayectoria del espermatozoide (STR) como del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva, y es de destacar que el incremento fue mayor al final del periodo de conservación. Coy et al. (2009), utilizando un extracto de planta para aumentar la viscosidad del medio para espermatozoides porcinos observaron también un incremento en el porcentaje de espermatozoide progresivamente mótiles y del índice STR, si bien obtuvieron mayores valores de VCL, VSL y VAP, en comparación con el medio control. Corcini et al. (2011) observaron un incremento en el porcentaje de espermatozoides mótiles tras la adición de gelatina al diluyente BTS para semen de cerdo conservado a corto plazo, tres días; en nuestro estudio este parámetro prácticamente no fue diferente entre diluyentes. Revisando la literatura observamos que los cambios en los parámetros de motilidad son dependientes del agente utilizado para aumentar la viscosidad (pues de ello dependerá su licuefacción o no a la temperatura a la que se evalúa la motilidad) así como del grado de viscosidad. Diferentes medios viscosos, por tanto, influencian las características de motilidad de los espermatozoides.

Varios autores han señalado la importancia de evaluar *in vitro* la motilidad espermática en medios viscosos. Durante el tránsito a través del tracto genital de la cerda el espermatozoide se rodea de fluidos no sólo de diferente composición química sino también de diferente viscosidad. La secreción del oviducto se caracteriza por ser una secreción glicoproteica viscosa. Por el contrario, en condiciones experimentales in vitro, la viscosidad es muy baja, cercana a la del agua y en todo caso muy inferior a la del oviducto. Según Coy et al. (2009) es deseable un cierto grado de viscosidad para que el espermatozoide interactúe con el ovocito in vitro (medio de cultivo) o in vivo (oviducto), una vez que aquél deja de estar en contacto con los componentes del plasma seminal. Por ello sugirieron que la viscosidad del medio es un parámetro a tener en cuenta cuando se plantean experimentos de fertilización in vitro o in vivo. La necesidad de evaluar la motilidad espermática en medios de viscosidad próxima a las condiciones fisiológicas uterinas también fue puesto de manifiesto por Smith et al. (2009). En su estudio observaron que la viscosidad significativamente modificó parámetros espermáticos como planaridad, tosión, forma de la onda, trayectoria y progresión por batido, modificaciones que también se han observado en nuestro trabajo (parámetros BCF, ALH y WOB), concluyendo que las observaciones realizadas en líquidos de baja viscosidad, como sucede en la mayor parte de los experimentos in vitro, puede aportar poca información con respecto a la motilidad in vivo. Además, ya que el medio viscoso reduce la *rolling rate* esto permite que la forma de la onda (*full waveform*) sea capturada de forma precisa por un periodo de varios o muchos batidos (*beats*), lo que es muy conveniente para aquéllas técnicas bidimensionales de evaluación del movimiento del flagelo. Para estos investigadores, dado los importantes avances que se están produciendo en el

procesamiento y captura digital de imágenes a alta velocidad, el empleo de un medio viscoso tiene la ventaja de permitir un análisis más detallado del desarrollo y propagación de la onda flagelar y establecer así una mejor correlación con la progresión celular en líquidos con viscosidades cercanas a las fisiológicas. Estas consideraciones seguramente serán tenidas en cuenta en el desarrollo de sistemas CASA de nueva generación.

Diversos estudios han tratado de correlacionar los parámetros CASA con resultados de fertilidad in vivo. Los resultados son contradictorios ( ). Ya que los espermatozoides expuestos a un medio viscoso tienen una mayor capacidad para moverse, unirse y penetrar el ovocito en condiciones *in vitro* (Coy et al., 2009) y su patrón de movimiento se asemeja más al que ocurre en el oviducto, quizá sería interesante para futuras investigaciones correlacionar estos parámetros de motilidad obtenidos en soluciones viscosas con los resultados de fertilidad.

El diluyente viscoso *ND5-3D®* produjo un descenso en el porcentaje de espermatozoides con acrosomas reaccionados y con una membrana plasmática inestable. Ambos son parámetros estándar en el análisis de la calidad seminal dada su correlación con la calidad del semen. Este efecto favorable para la calidad seminal también fue observado por Nagy et al. (2002) en espermatozoides de conejo suspendidos en un diluyente con gelatina. Coy et al. (2009) encontraron además una mayor viabilidad y menor generación de especies reactivas de oxígeno en espermatozoides de cerdo diluidos en *Androhep®* (Minitube, Germany) al cual se le añadió un extracto de plantas en polvo para aumentar la viscosidad, comparado con los diluidos sólo en *Androhep®*

Un descenso en el potencial de membrana mitocondrial de los espermatozoides ha sido asociado frecuentemente con aumento del porcentaje de anormalidades en el análisis del semen y reducción en la fertilidad. Para su evaluación hemos utilizado el fluorocromo catiónico y lipofílico *JC-1*, el cual atraviesa la membrana mitocondrial de forma selectiva en su forma monomérica; si el potencial de membrana es bajo se mantiene en forma de monómeros y emite fluorescencia verde, pero si es alto forma agregados (J_{agg}) que emiten fluorescencia roja (Garner y Thomas, 1999). La formación de J_{agg} y la fluorescencia emitida responde linealmente a un incremento en el potencial de membrana mitocondrial (Smiley et al., 1991). En nuestro estudio se observó una correlación lineal significativa entre ambos parámetros. Por esta razón hemos utilizado también el valor de la intensidad de la fluorescencia media de la muestra como indicador del potencial de membrana mitocondrial. Para algunos investigadores este parámetro permite una mejor estimación de los cambios en el potencial de membrana mitocondrial de la población celular que la determinación del porcentaje de espermatozoides con alto o bajo potencial.

Una mayor intensidad de fluorescencia implica mayor actividad mitocondrial. Los resultados de nuestro trabajo así lo confirman ya que mientras que el porcentaje de espermatozoides con alto potencial mitocondrial no fue diferente entre diluyentes, sí hubo una tendencia a una mayor intensidad de fluorescencia en las muestras diluidas en el diluyente viscoso, diferencias que fueron significativas al día 7 de conservación.

Los resultados de la prueba de fertilidad sugieren que el diluyente viscoso *3D* puede ser usado para la inseminación artificial de cerdas sin comprometer su eficiencia reproductiva. La diferencia de 0.17 lechones nacidos vivos a favor del diluyente *3D* no fue estadísticamente significativa probablemente debido al pequeño tamaño muestral, que sólo permitía detectar una diferencia, en el caso de que existiera, de 0.7 lechones vivos. El gran número de hembras necesarias es precisamente uno de los principales limitantes en este tipo de estudios de fertilidad de campo. No obstante, la no significancia estadística no implica siempre la no significancia biológica y económica. En este sentido el resultado de la prueba de campo en la que se aumentan la tasa de partos en 1.74 % y el tamaño de camada en 0.17 lechones nacidos vivos, supone que por cada 100 hembras inseminadas con el diluyente *3D* se produce un beneficio económico importante, que asciende, con los costes de producción actuales, a unos 1494 euros. La elección de un diluyente que incremente la fertilidad y la prolificidad sería económicamente más rentable frente a otro más barato, incluso aunque las diferencias en prolificidad no fueran estadísticamente significativas (Kuster and Althouse, 1999). A esto se añade el que el impacto de la compra del diluyente representa un pequeño porcentaje de los costes de producción de la granja (Gadea, 2003).

La manera por la que el diluyente viscoso *3D* mejora la integridad espermática puede obedecer a varias razones. Según

Nagy et al. (2002) aunque se añaden *buffers* a los diluyentes para minimizar las fluctuaciones en el pH, la sedimentación que inevitablemente ocurre durante la conservación es probable que produzca, por la acumulación de metabolitos tóxicos, una disminución del pH en la región de las células sedimentadas. Ya que el diluyente viscoso reduce en gran medida la sedimentación va a haber una distribución más homogénea de los espermatozoides en el diluyente, por lo que el buffer puede actuar más eficientemente. Los espermatozoides se benefician además de una distribución más homogénea de los distintos componentes en la suspensión. Por otro lado, López-Gatius et al. (2005) sugirieron que un medio viscoso, al limitar el movimiento espermático durante la conservación, es probable que produzca una reducción de la demanda metabólica del espermatozoide. No obstante, este aspecto necesita una mayor contrastación.

En conclusión, el empleo del diluyente viscoso *ND-5 3D*® para la conservación del semen de cerdo a largo plazo mejora la calidad espermática en términos de un menor porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática inestable y con acrosomas reaccionados. La escasa sedimentación de los espermatozoides en este medio evita la maniobra de rotación manual. Finalmente, resultados preliminares de una prueba de fertilidad de campo indican que cerdas inseminadas con este diluyente no ven disminuida su aptitud reproductiva e incluso se observa una tendencia a incrementar la tasa de parto y el tamaño de la camada con respecto a cerdas inseminadas con un diluyente no viscoso.

Queremos agradecer a la empresa Proporseg de Segovia, por la cesión de sus animales e instalaciones y a sus veterinarios, Alfonso Ageda y César del Prisco, por su inestimable colaboración.

Referencias

1. **Riesenbeck A**. Review on international trade with boar semen. *Reprod Domest Anim* 2011; 46:1-3.
2. **Roca J, Vazquez JM, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Martinez EA**. Challenges in pig artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 2006; 441:43-53.
3. **Nagy S, Sinkovics G, Kovacs A**. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. *Anim Reprod Sci* 2002; 70:283-6.
4. **Corcini CD, Moreira F, Pigozzo R, Varela Jr. AS, Torres NU, Lucia Jr. T**. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. *Livest Sci* 2011; 138:289-92.
5. **Rodríguez-Gil JE, Rigau T**. Effects of slight agitation on the quality of refrigerated boar sperm. *Anim Reprod Sci* 1995; 39:141-6.
6. **Coy P, Gadea J, Rath D, Hunter RH**. Differing sperm ability to penetrate the oocyte in vivo and in vitro as revealed using colloidal preparations. *Theriogenology* 2009; 72:1171-9.
7. **Saravia F, Wallgren M, Nagy S, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H**. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: Effects on sperm viability. *Theriogenology* 2005; 63:1320-33.
8. **Aparicio IM, Bragado MJ, Gil MC, Garcia-Herreros M, et al**. Phosphatidylinositol 3-kinase pathway regulates sperm viability but not capacitation on boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2007; 74:1035-42.
9. **Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO, Farstad W**. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* 2004; 62:1638-51.
10. **Harrison RA, Ashworth PJ, Miller NG**. Bicarbonate/CO2, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol Reprod Dev* 1996; 45:378-91.
11. **Amaral A, Ramalho-Santos J**. Assessment of mitochondrial potential: Implications for the correct monitoring of human sperm function. *Int J Androl* 2010; 33:180-6.
12. **Reers M, Smith TW, Chen LB**. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. Biochemistry 1991;30:4480-6.
13. **Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez CG, Betancourt M**. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C Arch Androl 2003; 49:287-95.
14. **Boe-Hansen GB, Ersboll AK, Greve T, Christensen P**. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology* 2005; 63:2006-19.
15. **De Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, Caballero I, Johannisson A, Wallgren M, 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; 29:543-52.
16. **Hirai M, Cerbito WA, Wijayagunawardane MP, Braun J, Leidl W, Ohosaki K, et al**. The effect of viscosity of semen diluents on motility of bull spermatozoa. *Theriogenology* 1997; 47:1463-78.
17. **Smith DJ, Gaffney EA, Gadelha H, Kapur N, Kirkman-Brown JC**. Bend propagation in the flagella of migrating human sperm, and its modulation by viscosity. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66:220-36.
18. **Hunter RH, Coy P, Gadea J, Rath D**. Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilisation. *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:191-7.
19. **Kirkman-Brown JC, Smith DJ**. Sperm motility: Is viscosity fundamental to progress? *Mol Hum Reprod* 2011; 17:539-44.
20. **Rikmenspoel R**. Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity. *J Exp Biol* 1984; 108:205-30.
21. **Suárez SS, Dai X**. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 1992; 46:686-91.
22. **Turner RM**. Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:25-38.
23. **Simon L, Lewis SE**. Sperm DNA damage or progressive motility: Which one is the better predictor of fertilization in vitro? *Syst Biol Reprod Med* 2011; 57:133-8.
24. **Jansen RP**. Fallopian tube isthmic mucus and ovum transport. *Science* 1978; 201:349-51.
25. **Jansen RP**. Cyclic changes in the human fallopian tube isthmus and their functional importance. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 136:292-308.
26. **Hunter RH**. Vital aspects of fallopian tube physiology in pigs. *Reprod Domest Anim* 2002;37: 186-90.
27. **Hunter RH**. The fallopian tubes in domestic mammals: How vital is their physiological activity? *Reprod Nutr Dev* 2005; 45:281-90.
28. **Liu DY, Clarke GN, Baker HW**. Relationship between sperm motility assessed with the hamilton-thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J Androl* 1991; 12:231-9.
29. **Budworth PR, Amann RP, Chapman PL**. Relationships between computerized measurements of motion of frozen-thawed bull spermatozoa and fertility. *J Androl* 1988; 9:41-54.
30. **Didion BA**. Computer-assisted semen analysis and its utility for profiling boar semen samples. *Theriogenology* 2008; 70:1374-6.
31. **Broekhuijse ML, Sostaric E, et al**. Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility. *J Anim Sci* 2012; 90:779-89.
32. **Espinoza JA, Schulz MA, Sanchez R, Villegas JV**. Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. *Andrologia* 2009; 41:51-4.
33. **Gallon F, Marchetti C, Jouy N, Marchetti P**. The functionality of mitochondria differentiates human spermatozoa with high and low fertilizing capability. *Fertil Steril* 2006; 86:1526-30.
34. **Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A**. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 2008; 31:325-30.
35. **Garner DL, Thomas CA**. Organelle-specific probe JC-1 identifies membrane potential differences in the mitochondrial function of bovine sperm. *Mol Reprod Dev* 1999; 53:222-9.
36. **Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, et al**. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1991; 88:3671-5.
37. **Troiano L, Granata AR, Cossarizza A, Kalashnikova G, Bianchi R, Pini G, et al**. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: A flow cytometry analysis with implications for male infertility. *Exp Cell Res* 1998; 241:384-93.
38. **Kuster CE, Althouse GC**. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in androhep and X-CELL extenders. *Theriogenology* 1999; 52:365-76.
39. **Gadea J**. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Span J Agric Res* 2003; 1:17-27.

López-Gatius F, Sances G, Sancho M, Yaniz J, Santolaria P, Gutiérrez R, et al. Effect of solid storage at 15 degrees C on the subsequent motility and fertility of rabbit semen. *Theriogenology* 2005; 64:252-60.