

ASPECTOS DE LA PRESERVACION DE SEMEN DE RUMIANTES Y SUINOS

H. Rodríguez Martínez¹

RESUMEN

La determinación del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva es el método más comúnmente usado para evaluar el semen preservado de rumiantes y suinos. La motilidad espermática sin embargo, no es un parámetro altamente confiable y representativo de la viabilidad del espermatozoide luego de su dilución o congelamiento, y no está positivamente correlacionada con la fertilidad del donante, si se consideran grupos homogéneos de reproductores de alta fertilidad. El número de espermatozoides/dosis de inseminación y el porcentaje de espermatozoides con membranas intactas son considerados relevantes para la fertilidad potencial del semen preservado. El pH extracelular juega un papel importante en el mantenimiento de las estructuras espermáticas post-dilución, refrigeración y congelación del eyaculado.

La capacidad fecundante del semen de animales domésticos, preservado en pequeñas dosis, luego de diluido, enfriado o congelado/descongelado, es una entidad compleja que implica en primera instancia la necesidad de un cierto número de espermatozoides viables que, con ciertas estructuras espermáticas intactas, deben llegar, en el momento preciso, al lugar donde se llevará a cabo la fertilización del gameto femenino.

¹Profesor Agregado, Facultad de Veterinaria, Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, Box 7011, S-750 07 Uppsala, Suecia.

LA PREDICCIÓN DE LA CAPACIDAD FECUNDANTE DEL SEMEN BOVINO MEDIANTE TESTS DE LABORATORIO

Por razones obvias, la motilidad del espermatozoide ha sido clásicamente usada como parámetro indicador, *in vitro*, de su calidad y viabilidad. En bovinos, donde la práctica de inseminación artificial con semen congelado está más desarrollada, la estimación de motilidad al descongelado mediante métodos subjetivos u objetivos, es usada en el mundo entero tanto en la práctica comercial como en investigación. A pesar de ello, numerosos procedimientos para evaluar la calidad y viabilidad del semen de toro *in vitro* han sido desarrollados (Saacke & White, 1972; Stewart et al., 1972; Linford et al., 1976; Graham et al., 1978; 1980; Pace et al., 1981). No obstante, debido a su sencillez, la determinación del porcentaje de células con motilidad progresiva es el método más comúnmente usado para evaluar el semen preservado de toro, *in vitro*.

Sin embargo, la motilidad espermática no es un parámetro altamente confiable y representativo de la viabilidad del espermatozoide, luego de su dilución o congelamiento. La medida de la concentración del trifosfato de adenosina (ATP) ha sido por tanto utilizada como un método adicional y objetivo para determinar el potencial fertilizante de una muestra de semen (Prinzer, 1977; Jonlkes & Mac Donald, 1979; Berger, 1983; Wood et al., 1986), estimada con métodos relativamente sencillos (Soderquist & Larson, 1985).

Ta que el metabolismo espermático que lleva a la generación y a la utilización de ATP y finalmente a la motilidad de la célula, está basado en reacciones enzimáticas, la cuantificación histoquímica de enzimas como la citocromo-c oxidasa localizada en las mitocondrias espermáticas se ha sumado a los métodos diagnósticos (Hrudka, 1987; Söderquist et al., 1990).

Mientras que es posible, y sencillo, diferenciar los toros infértiles -o con baja fertilidad- de aquellos con alta fertilidad; el problema se plantea al intentar predecir la fertilidad de los animales por su semen procesado, antes de la inseminación, de modo de seleccionar los toros superiores de los considerados mejores, lo que constituye el objetivo final. En la literatura, la correlación estadística entre la motilidad espermática y la fertilidad del eyaculado varía enormemente entre casi cero a más de 60% (Graham et al., 1980).

Nuestro grupo en Uppsala, ha estudiado la correlación entre la motilidad del semen (de toros pertenecientes al programa de inseminación artificial sueco) luego de descongelado y sometido a test de termo-resistencia, su concentración de ATP y los niveles de actividad de la enzima citocromo-c oxidasa con la fertilidad de dichos animales. Correlaciones significativas fueron encontradas entre la motilidad post-descongelado y el contenido de ATP, así como la motilidad y la actividad enzimática respiratoria. Correlaciones significativas también fueron demostradas entre el contenido de ATP y la actividad de citocromo-c oxidasa. Sin embargo, sólo se encontró una correlación -significativa entre el contenido de ATP y la fertilidad de los animales. Estos resultados mostraron claramente la falta de correlación entre motilidad y fertilidad (la que estuvo entre el 60 y el 77% de NRR). La razón de este resultado es probablemente producto de la utilización de un material animal muy bien definido y homogéneo. En Suecia, la motilidad espermática *per se* se usa para seleccionar eyaculados y hasta toros usados para inseminación artificial. Eyaculados con una motilidad al descongelado menor del 50% se descartan y toros que consecuentemente producen eyaculados que están por debajo del 50% de motilidad post-descongelado, se eliminan. La inclusión de otros animales, aumentaría la heterogeneidad del material respecto a su fertilidad, acarrearía la obtención de coeficientes de correlación más alto, tal cual ha sido reportado previamente (Wood et al., 1986).

Los parámetros examinados se complementan, no sólo por su carácter de subjetivo vs. objetivo, sino también porque representan la producción de energía, los niveles de la misma y su utilización. Si bien es posible determinar correlaciones entre estos parámetros, no hay que olvidar que la relación entre calidad

seminal y fertilidad es directamente influenciada por el número de células/dosis de inseminación (Pace, 1980; Umland, 1984). Cuanto más alta es la concentración de espermatozoides/dosis, hasta un cierto umbral, mayor es la fertilidad obtenida (Salisbury et al., 1978).

ALGUNOS FACTORES QUE CONTROLAN LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA

Los espermatozoides diferenciados en el testículo son transportados a través del epidídimo, siendo almacenados en la porción terminal del mismo, por períodos variables. Estos espermatozoides son inmóviles mientras permanecen en esa área genital. Varios factores han sido propuestos para explicar esta inhibición de la motilidad tales como la inmovilización mecánica por la alta visco-elasticidad del fluido (Acott & Carr, 1984; Carr et al., 1985), la baja tasa de Na^+ y las altas concentraciones de K^+ (McGrady & Nelson, 1972), la baja tensión de O_2 y la falta de sustratos (Mann & Lutwak-Mann, 1982) y por último, la disminución progresiva del pH intracelular, causado por un pH extracelular ácido (Carr et al., 1985) junto con los bajos niveles de bicarbonato encontrados (Okamura et al., 1988). En el cerdo, el pH del fluido epididimario, mensurado *in vivo* disminuye a valores ácidos a nivel de la cola (Rodríguez Martínez et al., 1990).

ROL DEL PH EXTRACELULAR

El pH extracelular juega un papel importante en las actividades metabólicas del espermatozoide de rumiantes y suinos. A pH ácido (5.8-6.5) el espermatozoide de toro incrementa su estabilidad (Anderson, 1942) y mantiene su quiescencia debido a la inactividad de muchas de sus enzimas, las que tienen un pH óptimo alrededor de 7.2-7.4.

Sin embargo, luego del almacenamiento en la cola del epidídimo los espermatozoides de estas especies son diluidos (1:20-1:50) con las secreciones de las glándulas sexuales accesorias en el momento de la eyaculación. En este momento, el espermatozoide en la muestra seminal posee una alta motilidad, la cual aparentemente ha sido activada por la dilución del fluido proteico epididimario, el incremento de las tasas de O_2 , bicarbonato y de pH. El bicarbonato seminal incrementa los niveles de AMP cíclico intracelular a través de la activación directa y específica de la enzima espermática adenilatociclasa (cuyo pH óptimo es 7.4) y controla mediante esta vía el metabolismo, la motilidad y la capacidad fecundante del espermatozoide (Okamura et al., 1985).

El movimiento de los espermatozoides es un proceso que demanda una enorme energía, con la defosforilación del ATP como fuente primaria de la misma (Salisbury et al., 1978). El ATP es producido en las mitocondrias localizadas en la parte media de la célula y es transportado por los microtúbulos del flagelo, donde la dineína usa la energía liberada por el ATP para la propulsión mediante la contracción flagelar.

ROL DE LOS DILUYENTES

Teniendo en cuenta las premisas anteriormente citadas, se han venido diseñando distintos diluyentes a los efectos de preservar, en forma líquida y/o congelada, los espermatozoides de las especies domésticas, con éxito variable.

En general, los espermatozoides sufren la dilución, ya que los diluyentes habituales son neutro/alcalinos y, si bien contienen sustratos energéticos apropiados y proteínas, el rol protector del plasma seminal (como factor anti- o de -capacitante) disminuye o se elimina con el tiempo. Los espermatozoides son metabólicamente activos y mediante su movimiento en estos diluyentes, se desprenden de las proteínas que cubren y estabilizan la membrana plasmática, y con esto se aceleran, al cabo de un cierto tiempo, la capacitación y la

reacción acrosomal. La mayoría de las enzimas presentes en el espermatozoide tienen pH óptimo que oscilan entre 7.2 y 7.4, y aunque la muestra se refrigere, su activación no se detiene. Si esto ocurre, a pesar de su buena motilidad, la muestra diluida contiene al cabo de un cierto tiempo, un porcentaje (creciente) de espermatozoides cuyo acrosoma está abierto y su capacidad fecundante -por ende- anulada. Este inconveniente se minimiza mediante el procesado adecuado y rápido del eyaculado, tal como es habitual en la industria del semen, pero luego del congelado y descongelado, la muestra seminal vuelve a condiciones pre-congelado y su capacidad fecundante está disminuida.

INFLUENCIA DEL PH DEL DILUYENTE EN LA VIABILIDAD DEL ESPERMATOZOIDE

Recientemente, hemos testado la hipótesis de que el pH extracelular juega un papel importante en la preservación del espermatozoide de rumiantes y suinos. Este aspecto beneficioso se reflejaría en el mantenimiento de las estructuras espermáticas luego de ensayada la dilución y mantenimiento de semen fresco, la refrigeración y la congelación del mismo. En estos trabajos se usaron diluyentes habituales en la práctica, con dos rangos de pH, uno a nivel 7.2-7.4 (habitual) y un pH ácido, titulado entre 6.3 y 6.5, que fue el que se encontró a nivel de la cola epididimaria. El semen testado hasta el momento fue procesado ya sea para su preservación en forma líquida (cerdos y ovinos, a temperatura ambiente o a 4°C) o congelado en forma rutinaria (pajuelas de distintas dimensiones, cerdos y bovinos). Varios parámetros fueron examinados. Estos oscilaron entre la determinación subjetiva (contraste de fase) u objetiva (análisis de imágenes computado) de la motilidad espermática, el examen de la estabilidad de la membrana espermática (a nivel óptico y de microscopía electrónica) y en el caso de bovinos, se incluyó la determinación de los niveles de ATP por bioluminiscencia.

Aunque los ensayos están en su mayoría siendo realizados en Uppsala, es de destacar la participación de los Dres. Lafluf, Chiossoni y Cresci, Young, a cuyo cargo estuvo una parte muy importante del trabajo con semen ovino, el cual incluyó ensayos de fertilidad (Lafluf et al., 1990).

A modo de resumen puede decirse que la motilidad espermática fue un parámetro que no varió en forma significativa durante los distintos estadios de la preservación seminal. No se registró una disminución estadísticamente significativa de la motilidad espermática cuando el semen de ovinos (Lafluf et al., 1990), bovinos (Rodríguez et al., 1989) o suinos (De Braganca et al., 1989; Bwanga et al., 1990) se diluyó, se almacenó -refrigerado o a temperatura ambiente- se congeló y descongeló. Aparentemente, el bajo pH extracelular en sí no es capaz de inhibir la motilidad espermática, en condiciones habituales de procesamiento. Sin embargo, la integridad de las membranas espermáticas, de todas las especies testadas, fue mantenida dentro de límites aceptables luego de la dilución en medios ácidos; particularmente cuando el semen se diluyó y se mantuvo por 12-24 horas refrigerado (ovinos) o por 24-48 horas a temperatura ambiente (suinos). Incluso en los casos en que el semen fue congelado (bovinos y suinos), el bajo pH usado en los diluyentes no resultó deletéreo para las membranas.

Se podría entonces especular que si la motilidad no disminuye y, particularmente, si la integridad de membranas se mantiene luego de la dilución en pH ligeramente ácido, la capacidad fecundante de estos espermatozoides podría ser igual o, por lo menos, no inferior a la del eyaculado propiamente dicho. Los pocos resultados obtenidos hasta el presente sugieren que esto es así. En ovinos, las tasas de no retorno de las borregas inseminadas con semen diluido (1 millón de espermatozoides/mm³, 0.02-0.05 ml/dosis) a pH 6.3 y mantenido a 4°C por 6-12 horas fue similar (60-75%) a los obtenidos usando semen fresco (0.02 ml/dosis, 3.5 millones de espermatozoides/mm³) inmediatamente de colectado, mientras que el semen diluido a pH 7.2 y refrigerado sólo dio un 44% de NRR (Lafluf et al., 1990; Rodríguez, datos no publicados). Resultados similares de gestación han sido obtenidos en cerdos comparando semen fresco, no diluido

o diluido a pH 6.3 y mantenido a temperatura ambiente (20-22°C) (Rodríguez - Martínez, no publicado). Ensayos de fertilidad están siendo realizados en suinos usando semen congelado con distintos pH en el diluyente.

SUMMARY

ASPECTS OF SEMEN PRESERVATION IN RUMINANTS AND SWINE. Assessment of the percentage of progressively motile spermatozoa is the most widely used method to evaluate processed semen today. Sperm motility is however, an unreliable parameter to determine the viability of the cells, and it is neither positively correlated with fertility, when considering homogeneous groups of fertile males. The sperm number/insemination dose and the percentage of preserved sperm membranes are considered as relevant factors for the potential fertility of the preserved semen. The extracellular pH plays an important role in the preservation of the sperm of ruminants and swine regarding the maintenance of the sperm structures during the processing of the diluted semen.

BIBLIOGRAFIA

1. ACOTT, T.S. & CARR, D.W. (1984) Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence - factor. *Biol. Reprod.*, 30: 926-935.
2. ANDERSON, J. (1942) The hydrogen-ion concentration of the semen of the bull. *J. Agric. Sci.*, 32: 298-307.
3. BERGER, W. (1983) Spermabeburteilung mit Hilfe der Biolumineszenzmessung von ATP, ADP und AMP, Thesis, München.
4. BWANGA, C.O.; de BRANGANCA, M.M.; EINARSSON, S. & RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (1990) Cryopreservation of boar semen in mini-and maxi- straws. *J. Vet. Med.* (submitted for publication).
5. CARR, D.W.; USSELMAN, M.C. & ACOTT, T.S. (1985). Effects of pH, lactate, and viscoelastic drag on sperm motility: a species comparison. *Biol. Reprod.*, 33: 588-595.
6. De BRANGANCA, M.M.; BWANGA, C.O.; EINARSSON, S. & RODRIGUEZ MARTINEZ, H. (1989). Viability of boar semen exposed to an acidic extender and preserved at 20°C for up to 48 hours. *Proc. SIPAR postgr. course, Uppsala.*
7. FOULKES, J.A., and B.J. Mac Donald (1979). The relationship between ATP content and motility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 11: 313- 319.
8. GRAHAM, E.F.; M.K.L. SCMEHL; B.K. EVENSON, and D.S. NELSON (1978). Viability assays for frozen semen. *Cryobiology*, 15: 242-244.
9. GRAHAM, E.F.; M.K.L. SCMEHL, and D.S. NELSON (1980). Problems with laboratory assays. *Proc. 8th N.A.A.B. Tech. Conf. A.I. Reprod.*, 1-8.
10. HRUDKA, F. (1987) Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int. J. of Andrology*, 10: 809-828.

11. LAFLUF, O.; M. CHIOSSONI, A.; A. CRESCI & H. RODRIGUEZ-MARTINEZ (1990). Influence of diluter's pH upon the fertility of ram spermatozoa. (In manuscript).
12. LINFORD, E.; F.A. GLOVER, C.BISHOP, and D.L. STEWART (1976). The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. reprod. Fert.*, 47: 283-291.
13. MANN, T. & LUTWAK-MANN, C. (1982). Male reproductive function and semen: Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Springer-Verlag, Berlin.
14. McGRADY, A.V. & NELSON, L. (1972). Cationic influences on sperm biopotentials *Exp. Cell. Res.*, 47: 192-196.
15. OKAMURA, N.; TAJIMA, Y.; SOEJIMA, A.; MASUDA, H. & SUGITA, Y. (1985). Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct stimulation of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.*; 260: 9699-9705.
16. OKAMURA, N.; TAJIMA, Y. & SUGITA, Y. (1988). Decrease in bicarbonate transport activity during epididymal maturation in porcine sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 1280-1287.
17. PACE, M.M.; J.J. SULLIVAN, F.I. ELLIOTT; E.F. GRAHAM, G.H.; COULTER, (1981). Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0.5 ml. french straws. *J. Anim. sci.*, 53, 3, 693-701.
18. PRINZEN, R. (1977). ATP Bestimmungen (Adenosin-Tri-Phosphat) mit einer schnellmethode an frischen und tiefgefrorenen Bullenspermien (A method for the rapid determination of ATP (Adenosine-Triphosphate) in fresh and frozen bull sperm). *Zuchthyg.*, 12: 105-108.
19. RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; EKSTEDT, E. & EINARSSON, S. (1990). Acidification of epididymal fluid in the boar. *Int. J. andrology*, 13: in press.
20. RODRIGUEZ, J.; SODERQUIST, L. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (1989). Influence of the pH of the diluent onto the viability of frozen bull spermatozoa. *Proc. SIPAR postgr. course, Uppsala*.
21. SAACKE, R.G. and J.M. WHITE (1972) Semen quality tests and their relationship to fertility. *Proc. 4th N.A.A.B. Tech. Conf. A.I. Reprod.* 22-27.
22. SALISBURY, G.W.; N.L. VAN DEMARK, J.R. LODGE (1978) *Physiology of reprod. and artif. insem. of cattle*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 313, 330, 429.
23. STEWART, D.L.; C. O'Hagan, and F.A. GLOVER (1972) The prediction of the fertility of bull semen from laboratory tests. *Proc. 7th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I.; Munich*, 2, 1279-1283.
24. SODERQUIST, L. and K. LARSSON (1985). Relationship between ATP content and post thaw motility in bull semen. *Acta Vet. Scand.*, 26: 308-312.
25. SODERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. & JANSSON, L. (1990). Post-thaw motility, ATP contents and cytochrome-C oxidase activity of A.I. bull spermatozoa in relation to their fertility. In manuscript.

26. UWLAND, J. (1984). Possibilities and limitations of semen evaluation for prognosis of male fertility. From: The male in farm animal reproduction. In: Current topics in vet. med. and animal science., 30: 269-288.
27. WOOD, P.D.P., J.A. Foulkes, R.C. Shaw and D.R. Melrose (1986) Semen assessment fertility and the selection of Hereford bulls for use in AI. J. Reprod. Fert. 76: 783-795.