

VIABILIDAD DE SEMEN PORCINO REFRIGERADO CON DILUYENTE MRA[®]. NOTA TÉCNICA

Viability of Porcine Semen Preserved With MRA[®] Diluent. Technical Note

Clara Rugeles-Pinto^{1*}, Ramiro Caicedo-Toro², Carlos Almentero-Suárez¹, Juan Linares-Arias³ y Oscar Vergara-Garay¹

¹Departamento de Ciencias Pecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba. Montería, Córdoba. Colombia. ²Asociación de Porcicultores de Córdoba. Montería, Córdoba. Colombia. ³Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Básicas, Universidad de Córdoba. Montería, Córdoba. Colombia. *Telefax: 4-7860209, crugeles@correo.unicordoba.edu.co

RESUMEN

Con el objetivo de determinar la viabilidad del semen porcino conservado por corto tiempo en diluyente MRA[®], se procesaron un total de 42 eyaculados de 4 reproductores de razas mejoradas (*Pietran* y *Duroc x Pietran*) con edades entre dos y tres años. El semen se colectó por manipulación manual, proporcionando un descanso de cuatro días entre colecta. El semen fue diluido en MRA[®] con proporciones de 1:2 y 1:3 (semen: diluyente). Las características del semen porcino fresco fueron color blanco lechoso, pH de 8,3; 78,2% de vitalidad, 72,4% de motilidad individual rápida progresiva (MIRP) y concentración de 187×10^6 . La fracción del eyaculado diluida en proporción 1:2 a las 24 horas (h) presentó una vitalidad (%V) del 70,2%, y una MIRP de 64,6%. A las 48 h la vitalidad fue 63,65% y la MIRP de 58,53%, con pérdidas del 8% de vitalidad y del 7,8% de la MIRP, respecto a las 24 h. Los valores promedio de %V y MIRP del semen porcino diluido en proporción 1:3 a las 24 h fueron de 74,39%V y 69,39%MIRP, respectivamente; a las 48 h fue de 69,51 el %V y 63,65% la MIRP. Los resultados indican que el mejor comportamiento espermático, en cuanto a vitalidad y MIRP se da en la relación de dilución 1:3 a las 24 h (5% más para ambas variables, $P < 0,05$), en comparación con la relación 1:2, la cual es también viable para ser utilizada en un programa de inseminación artificial.

Palabras clave: Cerdos, conservación, diluyente, semen.

ABSTRACT

The objective of this research was to determine the viability of the preserved porcine semen in short time in MRA[®] diluent.

Fourty two ejaculated from four (4) pig aged between two and three years old were processed. The semen was collected by manual manipulation, providing a rest of four days to the animals. The semen was diluted in the expander MRA[®] in proportions 1:2 and 1:3 (semen: diluent). The semen porcine traits were white-milk color, pH of 8.3, 78.2% of vitality, 72.4% of rapidly progressive individual motility, and concentration of 187×10^6 . The fraction of the ejaculated diluted in proportion 1:2 at 24 hours (h) showed a vitality of 70.2% and rapidly progressive individual motility (RPIM) of 64.6%. At 48 h the vitality was of 63.65% and the RPIM 58.53%, with an 8% of reduction of vitality and 7.8% of the RPIM compared to 24 h. The performance of the vitality and the RPIM of the porcine semen diluted in proportion 1:3 to 24 h were of 74.39% and 69.39%, and at 48 h were of 69.51% and 63.65%, respectively. The results indicate that the best sperm extender in terms of vitality and RPIM, occurs in the relation of dilution 1:3 at 24 h (5 more % for both variables, $P < 0.05$), compared with the relation 1:2, which is also viable for use in an artificial insemination program.

Key words: Conservation, diluent, pigs, semen.

INTRODUCCIÓN

La dilución y conservación del semen porcino (*Sus scrofa*) en refrigeración es una alternativa que brinda la posibilidad de aprovechar al máximo la capacidad reproductiva del verraco, debido a que se obtiene de esta manera una mayor cantidad de lechones por reproductor durante la vida productiva. Para ello, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico de la célula espermática (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (BSA), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), la presión osmótica (NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos) [23].

Los diluyentes comerciales empleados se han ido modificando con el propósito de obtener semen de alta capacidad fecundante en procesos de inseminación artificial (IA). Características como volumen total, concentración y motilidad son indicadores utilizados para valorar la calidad del semen y su respuesta a la manipulación [1], particularmente la motilidad debido a su asociación con el número total de lechones nacidos [6]. Hernández y Cruz [9] y Paulenz y col. [19] reportaron elevadas pérdidas de motilidad del eyaculado porcino en respuesta al tiempo de conservación en diluyentes *Beltsville Thawing Solution (BTS)* a las 72 horas (h) (19%) y *Diluyente reformulación 16 del Centro de Investigaciones para el Mejoramiento Animal de la Ganadería tropical (D16)* a las 24 h (7%) de conservación, respectivamente.

Del Toro y col. [4] encontraron porcentajes de parición de 75 y 80% en cerdas que recibieron dosis seminales preparadas con los diluyentes *Plisko o Kiev* y con el diluyente *Cubano 1* conservados hasta por 72 h, respectivamente.

De acuerdo con Ochoa y col. [17], la motilidad de eyaculados porcinos diluidos con Androhep, Bütschwiler, MRA® y Reading (Modena®) fue significativamente superior para los eyaculados conservados en el diluyente Reading con respecto al tiempo de conservación, deteriorándose hacia las 120 h de conservación.

El uso de protocolos de manejo adecuado del semen y de diluyentes de buena calidad permite ofrecer dosis seminales viables para su posterior uso en la IA en una granja porcina, mejorando su rentabilidad, debido a que la relación verraco - cerdas es 1:100. Así mismo, aumentaría la producción de 900 lechones por verraco al año (monta natural) a 4500 aproximadamente, lo que influye en la rapidez de la mejora genética [7]. El objetivo del presente trabajo fue determinar la viabilidad del semen porcino conservado por corto tiempo en diluyente MRA®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

El estudio se realizó en las instalaciones del programa de porcicultura (unidad experimental) de la Universidad de Córdoba, sede Berástegui, municipio de Ciénaga de Oro, departamento de Córdoba, Colombia, ubicada entre los 8° 52' 41" LN y 75° 37' 27" LO [15]. Esta zona está clasificada como bosque seco tropical, presenta temperatura promedio de 32°C, humedad relativa del 84%, una altura sobre el nivel del mar de 10 m y precipitación promedio anual de 1100 mm, que se distribuye irregularmente en dos períodos: uno lluvioso, con 85% del total de la precipitación anual; y uno seco, comprendido entre los meses de noviembre y abril [10]. El estudio se realizó durante la época de lluvias.

Animales experimentales

Para la presente investigación se utilizaron un total de 42 eyaculados de verracos de razas mejoradas (*Pietran* y *Du-*

roc x Pietran) con edades entre dos a tres años, alimentados con 2,5 kg de alimento balanceado comercial, dos veces al día, con un contenido proteico de 12%. Los animales pertenecían a la granja porcina de la Universidad de Córdoba.

Técnica de recolección del eyaculado

La colección de semen se realizó dos veces a la semana. Para la obtención del semen se utilizó la técnica de manipulación manual, haciendo contracciones con la mano sobre el glande del pene [5, 13]. El semen se colectó en un termo de pasta (Coleman, 2L, Colombia), el cual tenía un filtro y un vaso de poliestireno expandido en su interior.

Evaluación del eyaculado

Las características macroscópicas evaluadas fueron: color, olor, pH y volumen. Estas se valoraron en forma subjetiva, con excepción del pH y del volumen, utilizando los procedimientos de rutina establecidos por Córdoba [3] y Singleton [25].

La vitalidad (%V) y la motilidad individual rápida progresiva (%MIRP) seminales se valoraron por microscopía óptica (Olympus® CX-21, Olimpus, Latinoamerica Inc, México), a partir de una gota de semen depositado sobre un portaobjetos, protegido con una lámina cubreobjetos y visualizado con objetivo de 40x [2, 12].

Concentración espermática

Para el conteo de los espermatozoides se utilizó una cámara de Neubaüer, para lo cual se preparó una dilución de 1:200 del semen en una solución de cloruro de sodio al 1%. El conteo se realizó por medio de microscopía óptica con objetivo de 40x [2]. La calificación se dio como el número total de espermatozoides por mL de semen [4, 25].

Selección del semen

Realizada la evaluación se procedió a la dilución de los eyaculados que alcanzaron los requisitos mínimos de calidad considerados por Rozeboom [21, 22]. Se procesaron 42 eyaculados de color blanco procedentes de 4 reproductores, de concentración mayor o igual a 100×10^6 de espermatozoides por mL, un mínimo de 75% de espermatozoides no aglutinados [21], con motilidad y morfología espermática normal de 80% como mínimo [22] como requisitos mínimos de calidad seminal para programas de IA.

Dilución del semen

La dilución del semen se realizó utilizando las proporciones 1:2 y 1:3 (Semen: diluyente MRA®). Inmediatamente se inició el descenso de la temperatura de las muestras de 37 a 18°C en dos h en una nevera de poliestireno mediana de 18 L (48 x28 x30cm), con viruta de madera en su interior y adicionando hielo para mantener la temperatura por 48 h. Las muestras fueron conservadas entre 5 y 10°C y evaluadas a las 24 y

48 h. El procesamiento de las muestras se realizó en el laboratorio de reproducción animal de la Universidad de Córdoba, Colombia. Este procedimiento se realizó en forma simultánea para las fracciones semen: diluyente, en las proporciones anteriormente mencionadas [5].

Para la evaluación del semen a las 24 y 48 h, se tomó una muestra de cada fracción, éstas se colocaron en baño maría (Mettler W760, Alemania) a 37°C por 30 segundos. A las 24 y 48 h se le determinaron al eyaculado los porcentajes de vitalidad y de MIRP.

Diseño experimental y análisis de resultados

Para este estudio se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial 2x2, siendo un factor la proporción de diluyente (1:2 y 1:3) y el otro factor, los tiempos de conservación (24 y 48 h). Los datos fueron analizados a través de un análisis de varianza con el procedimiento GLM de SAS [26].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características promedio del eyaculado porcino fresco se muestran en la TABLA I. Las características generales del semen porcino fresco fueron similares a las reportadas para cerdos de otras razas por Acosta [1] y Gadea [6].

En la TABLA II se muestran las características microscópicas de la fracción del eyaculado diluido con MRA[®]. Se encontró diferencia altamente significativa ($P<0,01$) entre los tiempos de conservación y entre las relaciones de dilución ($P<0,01$) en los promedios para %V.

Con relación a la fracción del eyaculado diluida en proporción 1:2 se observó pérdida significativa ($P<0,01$) de la vitalidad espermática del orden de 8,2% a las 24 h, similar a lo obtenido por Martínez [13] al conservar semen de un reproductor *Landrace* por un periodo de 24 h a temperatura de 15°C. De la misma forma se presentó una pérdida de 6,55% de la vitalidad a las 48 h. Mientras que la vitalidad de la fracción del eyaculado diluido en proporción 1:3 en MRA[®], se afectó significativamente ($P<0,01$), con pérdidas de 3,81 y 4,88% a las 24 h y 48 h, respectivamente. Lo que indica, que la reducción total de vitalidad espermática a las 48 h es superior en la relación de dilución 1:2 (14,55%), con respecto a la dilución 1:3 (8,69%). Sin embargo, dosis seminales de vitalidad superior al 70% a las 24 h y a 60% a las 48 h de conservación, se considera que po-

TABLA II
VITALIDAD DEL SEMEN PORCINO DILUIDO EN PROPORCIÓN 1:2 Y 1:3 A LAS 24 Y 48 HORAS DE CONSERVACIÓN ENTRE 5 Y 10°C.

Tiempo de conservación	Relación de dilución (1:2)	Relación de dilución (1:3)
Horas	%V	%V
24	70,2 ± 7,33 ^a	74,39 ± 6,5 ^a
48	63,65 ± 9,2 ^b	69,51 ± 8,9 ^c

*Medias con letras diferentes indican diferencia significativa ($P<0,01$).

TABLA III
MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMEN PORCINO DILUIDO EN PROPORCIÓN 1:2 Y 1:3 A LAS 24 Y 48 HORAS DE CONSERVACIÓN ENTRE 5 Y 10°C.

Tiempo de conservación	Relación de dilución (1:2)	Relación de dilución (1:3)
Horas	%MIRP	%MIRP
24	64,63 ± 8,2 ^a	69,39 ± 6,53 ^a
48	58,53 ± 9,0 ^b	63,65 ± 9,8 ^c

*Medias con letras diferentes indican diferencia significativa ($P<0,01$).

seen adecuada capacidad fertilizante para ser usados en programas inseminación artificial [8,27].

En la TABLA III se reporta la motilidad individual (MIRP) de la fracción del eyaculado conservado en diluyente MRA[®] en proporción 1:2 y 1:3 por un periodo de 24 horas.

Se presentó un descenso de 7,77% MIRP en las primeras 24 h y de 6,1% MIRP de las 24 a las 48 h, del semen conservado en la fracción de dilución 1:2 y descenso de 3,01% de la MIRP a las 24 h y de 5,74% de MIRP a las 48 h en la fracción de dilución 1:3.

En general, se presentó una pérdida de MIRP de 13,87% en la fracción del semen diluido en MRA[®] en proporción 1:2, con mayor pérdida de motilidad espermática que en la relación de dilución 1:3, de 8,75%, en un periodo de 48 h de conservación.

Se observan mejor la vitalidad y la motilidad espermática del semen en la relación de dilución 1:3 (con alrededor de 5% más para ambas variables; $P<0,05$) que en 1:2, siendo ambas favorables para ser utilizadas en un programa de IA, al mantener una elevada proporción de espermatozoides vivos y móviles progresivos [14].

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN PORCINO FRESCO SIN DILUIR.

Características						
Macroscópicas			Microscópicas			
Volumen (ml)	Color	pH	Concentración (esperm/ml)	%V	%MIRP	%N
210	Blanco lechoso	8,3	187 x10 ⁶	78,2	72,4	90,48

La vitalidad y la MIRP obtenidas para el semen preservado con el diluyente comercial MRA[®], en proporción 1:2 y 1:3, coincide con lo referido por otros investigadores y señala la eficacia del diluyente MRA[®] para mantener viable la calidad espermática del semen porcino [11, 16, 17] y su potencial fecundante por un período de tiempo mayor a 24 h [18]. La sobrevivencia y la conservación de la motilidad espermática individual se pueden explicar con base en lo referido por Medrano [14], quien atribuye la baja producción de catabolitos resultantes del metabolismo espermático a la presencia de BSA en el diluyente, además de tener propiedades antiaglutinantes [20, 28].

Resultados similares reportaron otros autores, quienes plantearon que el descenso gradual de la calidad espermática con relación al tiempo de conservación, se debe posiblemente al efecto de peroxidación que ocurre en los espermatozoides [8, 16, 27]. Por ello, en el presente estudio solo se conservó semen porcino diluido en medio MRA[®] por un periodo de 48 h.

La pérdida de la motilidad espermática del semen diluido en MRA[®] en las fracciones de dilución 1:2 y 1:3 fue de 13,87 y 8,75% en las primeras 48 h de conservación a 5°C, respectivamente. Las pérdidas de MIRP fueron inferiores a las referidas por Rueda y col. [24] de 18,7% en las primeras 48 h, en semen preservado con diluyente *Dicip*[®]. Sin embargo fueron similares a las pérdidas de motilidad (11,7%) con diluyente *Dicip-m*[®], en un periodo de 48 h [24].

Es probable que al utilizar el diluyente MRA[®] para la conservación del semen porcino refrigerado, el volumen del diluyente reduzca el efecto aglutinante de algunos componentes del plasma seminal porcino, permitiendo preservar mayor viabilidad espermática en la fracción de dilución de 1:3.

CONCLUSIONES

El semen porcino diluido en MRA[®] y preservado en proporciones de dilución 1:2 y 1:3 conserva alta vitalidad y motilidad a las 24 y 48 horas de conservación a temperatura entre 5 a 10°C, conservando mejores tasas de vitalidad y motilidad espermática en la fracción de dilución 1:3.

AGRADECIMIENTO

A la granja Porcina y al laboratorio de Andrología de la Universidad de Córdoba, por el apoyo dado para la realización de la investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ACOSTA, M.; PERDIGÓN, R.; RUEDA, M. Valoración de indicadores de calidad seminal porcina, utilizando la fracción rica del eyaculado. **Rev. Unell. Cienc. Tec.** 26: 49-53. 2008.

- [2] BARACALDO, M.I.; BARTH, A.D.; BERTRAND, W. Steps for freezing bovine semen: from semen collection to the liquid nitrogen tank. In: **IVIS Reviews in Veterinary Medicine**. Ed. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, Pp 105-107. 2007.
- [3] CÓRDOVA I., I.; MUÑOZ M., R.; CÓRDOVA J., S.; CÓRDOVA J., A.; PÉREZ G., J.F. Características del semen de verraco y su evaluación práctica. 2004. Universidad Autónoma del estado de México. En Línea: <http://www.porcicultura.com/articulos/ia/articulo.-php?tema=iar021.08/24/2011>.
- [4] DEL TORO, Y.; ARIAS, T.; DIÉGUEZ, F.J.; MORALES, G.; MARTÍNEZ, M. Nuevo diluyente conservador de semen porcino en estado fresco. **Rev. Comput. Prod. Porc.** 3(1): 57-61. 1996.
- [5] GADEA, J. Los diluyentes de inseminación artificial porcina: revisión. **Span. J. Agric. Res.** 2: 17-28. 2003.
- [6] GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reprod. Domest. Anim.** 39: 303-308. 2004
- [7] GÓMEZ, C.; MOZO, R.; CABREJAS, S. Diluyentes de refrigeración para semen porcino. **Mundo Ganad.** 19: 40-41. 2008.
- [8] HERNÁNDEZ, J. Evaluación de un nuevo diluyente para semen porcino. Revisión. **REDVET.** 10(4): 1-11. 2009.
- [9] HERNÁNDEZ, J.; CRUZ, R. Influencia del tiempo de conservación, raza, volumen y concentración sobre la motilidad del semen fresco porcino almacenado por 96 horas. **Rev. Reprod. Anim.** 30: 75-80. 2004.
- [10] HOLDRIDGE, L. El Diagrama de las zonas de vida. En: **Ecología basada en zonas de vida**, 5ta Reimp., Editorial IICA, San José, Costa Rica, Pp 13-26. 2000.
- [11] JOHNSON, L.A.; ALBERS, J.G.; GROOTEN, H.J.G. Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen in Betsville (BTS), Modified Modena (MM) or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. **Reprod. Domest. Anim.** 23 (2): 49-55. 1988.
- [12] MARTÍNEZ, E.A.; RUIZ, S.; ROCA, J.; VÁZQUEZ, J.M.; COY, P. Nuevas técnicas en contrastación seminal porcina. **Med. Vet.** 9: 71-83. 1992.
- [13] MARTÍNEZ, E.A.; VÁZQUEZ, J.M.; MATAS, C.; ROCA, J.; COY, P.; GADEA, J. Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. **Theriogenol.** 40: 547-557. 1993.
- [14] MEDRANO, A. Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen refrigerado. Universidad Autónoma de Barcelona.

- Facultad de Veterinaria. Bellaterra. España. Tesis Doctoral. 257 pp. 2005.
- [15] MERCADO, T.; PALENCIA, G.; COMBATT, E. Estudio agroclimático del Departamento de Córdoba. Universidad de Córdoba. Colombia. Pp 126. 2006
- [16] MORAES, G.V.; MOREIRA, I. Diluentes na conservação de sêmen resfriado de suíno. **Reunao Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**. 2. Brasilia. 07/24-27. Brasil: Pp 450-451. 1995.
- [17] OCHOA, G.; ACOSTA, M.J.; RUEDA, M.; ORTEGA, R. Evaluación de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. Pruebas *in vitro*. **Rev. Comput. de Prod. Porc.** 13: 239-245. 2008.
- [18] OCHOA, G.; ORTEGA, R. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. **REDVET**. 15(4): 298-306. 2008.
- [19] PAULENZ, H.; KOMMISRUDE, E.; HOFMO, P.O. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. **Reprod. Domest. Anim.** 35: 83-87. 2000.
- [20] ROA, N.; TAMASOUKAS, R.; SILVA, A.; SÁNCHEZ, J. Criopreservación de semen suíno en Venezuela. Revisión. **REDVET**. 6(5): 1-12. 2005.
- [21] ROZEBOOM, K.J.; TROEDSSON, M.H.T.; CRABO, B.G. AI in Swine: The impact of inseminations on the uterine environment. In: **Boar Semen Preservation IV**. JOHNSON, L.A. and GUTHRIE, H.D. (Ed) Allen Press, Inc., Lawrence, KS. Pp 177-184. 2000.
- [22] ROZEBOOM, K. J.; REICKS, D.L.; WILSON, M.E. The reproductive performance and factors affecting on-farm application of low-dose intrauterine deposit of semen in sows. **J. Anim. Sci.** 82: 2164-2168. 2004.
- [23] RUEDA, M.; PERDIGÓN, T.; MENDOZA, D.; BENÍTEZ, J.A.; LEMUS, C.; TOSAR, M. Optimización de la conservación del semen porcino con el diluyente cubano Dicip. **Rev. Comput. Prod. Porc.** 16: 26-30. 2009.
- [24] RUEDA, M. Diluyentes para la conservación de semen porcino. **Rev. Comput. de Prod. Porc.** 18: 19-28. 2011.
- [25] SINGLETON, W.L. A guide to basic boar semen collection, evaluation and processing procedures. 1997. Universidad de Purdue, West Lafayette; USA. En línea: <http://www.ansc.purdue.edu/swine/porkpage/repro/pubs/basic2.htm>. 09/30/2011.
- [26] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). SAS/STAT User's Guide (Release 9.0), Cary, NC, USA. 2001.
- [27] VALENÇA, R.E.; GUERRA, M.M. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 31: 47-53. 2007.
- [28] VASCONCELOS, A.M.; MORAES, G.V.; MOREIRA, I.; RIGOLON, L.P.; MARTINS, E.N. Características espermáticas de sêmen resfriado de suíno e conservado em diferentes diluentes. **Rev. Bras. Zoot.** 30: 394-401. 2001.