

## LA SUPLEMENTACIÓN DEL SEMEN PORCINO CON CAFEÍNA Y CALCIO DURANTE LA INSEMINACIÓN UTILIZANDO UNA NUEVA SONDA DE INSEMINACIÓN MEJORA LA FERTILIDAD.

van Leeuwen- Ibarrola J.<sup>1\*</sup>, Reicks D.<sup>2</sup>, Desherces S.<sup>1</sup>, Carion O.<sup>1</sup>, Schmitt E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I&D, IMV Technologies, l'Aigle, Francia, <sup>2</sup> Swine Vet Center, St. Peter, Mn, EEUU

\* **autora corresponsal.** Tel. +33 233 346 464, Correo electrónico: [Jessika.vanLeeuwen@imv-technologies.com](mailto:Jessika.vanLeeuwen@imv-technologies.com)

### Introducción

El uso de IA en la industria porcina ha aumentado considerablemente durante las décadas recientes y algunos países como por ejemplo los Países Bajos inseminan casi el 100% de sus animales (Feitsma, 2009). El desarrollo de diluyentes para el semen porcino ha contribuido claramente a este éxito porque permite el uso de un solo eyaculado para varias dosis de inseminación (Althouse, 1997).

Los diluyentes comerciales modernos permiten la dilución del eyaculado concentrado pero también la preservación del semen durante 2-10 días dependiendo de cada fabricante.

Sin embargo una porción del semen se pierde como resultado de la dilución (Watson, 1995) y esa porción aumenta cuando la preservación se prolonga (Althouse, 1997). Los diluyentes comerciales son entonces formulados para optimizar la preservación del semen proveyéndolos de nutrientes, estabilizando el pH, disminuyendo la proliferación bacteriana (Althouse, 1997; Vyt, 2007) y protegiendo el semen contra el choque por baja temperatura (Althouse, 1997). Los nutrientes provienen generalmente de la glucosa que, ante la falta de oxígeno, estimula el metabolismo anaeróbico que produce una baja de pH intra-celular y restringe la motilidad de los espermatozoides lo que ayuda a la sobrevivencia del semen durante la preservación (Johnson et al., 2000). La adición de EDTA al medio ayuda a estabilizar la membrana del espermatozoide y previene los primeros pasos del proceso de capacitación y la reacción del acrosoma (Johnson et al., 2000). El diluyente entonces prolonga la preservación del semen pero no tiene un valor agregado para la inseminación porque después de la inseminación los espermatozoides tienen que convertirse en espermatozoides hiper motiles, capacitados. Después de la deposición del semen en el cérvix es importante que los espermatozoides lleguen rápido al depósito del semen cerca del istmo ya que la sincronización de la ovulación es altamente variable entre cerdas (Soede et al., 1995). Eso significa que el semen tendrá que permanecer viable en el depósito de semen por aproximadamente 24 horas. Se ha intentado mantener un nivel alto de motilidad del semen con la suplementación de cafeína al diluyente. La cafeína aumenta la motilidad dependiendo de la dosis ((en el semen humano; Harrison et al., 1979, 1980ab; Imoedemhe et al., 1992), (en el semen porcino; Yamaguchi et al., 2013)). Esa alta motilidad no da como resultado una mayor fertilidad. Imoedemhe et al. (1992) han demostrado una reducción en la capacidad de fertilizar ovocitos humanos que puede ser causada por cambios estructurales en la membrana de los espermatozoides (Harrison et al., 1980ab) ya que

Funahashi et al. (2000 y 2001) demostraron que la baja fertilidad después de la preservación del semen porcino con cafeína fue causa de un aumento en la capacitación y de la reacción del acrosoma.

Los niveles de calcio extra-celulares están también relacionados con la inducción de la capacitación, hiper activación y reacción del acrosoma (en ratón; Fraser, 1987) con efectos perjudiciales para la sobrevivencia de los espermatozoides cuando fue agregado durante la preservación (Gupta et al., 2005).

No obstante la adición de cafeína y calcio al semen porcino inmediatamente antes de la IA dio como resultado una tasa de partos más alta (Yamaguchi et al., 2009), lo que indica que ambos ingredientes pueden tener un efecto positivo sobre los procesos fisiológicos para mejorar la actividad del espermatozoide y aumentar su capacidad de fertilizar. Desde un punto de vista práctico no es conveniente tener que suplementar cada dosis con cafeína y calcio antes la IA ya que cuesta mano de obra y tiempo. Además el riesgo de contaminación cruzada aumentaría. Se necesita una solución práctica para administrar esos ingredientes al momento de la IA para facilitar el proceso y aumentar la fertilidad.

El estudio actual utilizó una nueva sonda de inseminación para investigar el efecto sobre la fertilidad de las cerdas comerciales al suplementar el semen porcino con cafeína y calcio al momento de la inseminación sin incrementar la mano de obra.

### Material y Métodos

#### *Alojamiento y dietas de los animales*

El estudio se efectuó en Julio de 2011 en 2 hatos comerciales de cerdos en Minnesota, Estados Unidos. Después del destete, las cerdas (n = 414; PIC) fueron trasladadas a la sala de gestación y colocadas en jaulas individuales. Las cerdas fueron alimentadas dos veces al día con un máximo de 4 kg diarios de una dieta formulada a base de maíz y soya que contenía aproximadamente 14 MJ/kg con 14% PC (proteína cruda) y 1% de lisina. Todas las jaulas fueron equipadas con bebederos de chupón que proveían de agua a libertad.

#### *Detección de estro e inseminación*

Del destete en adelante, la detección del estro fue realizada diariamente a las 07:00h por técnicos de granja entrenados usando el contacto con el macho a través de una cerca. Se consideró que el estro empezaba cuando la hembra mostraba por primera vez el reflejo de inmovilidad durante la prueba de presión del lomo ante la presencia del macho y terminaba cuando la hembra dejaba de presentar el reflejo de

inmovilidad. Las cerdas fueron inseminadas por la mañana después de que se detectó el estro por primera vez (09:00h) y la inseminación fue repetida cada mañana a las 09:00h si la hembra presentaba un buen reflejo de inmovilidad.

Todos los animales fueron inseminados al azar con una nueva sonda de inseminación (imagen + No. de patente) ya sea conteniendo cafeína y calcio (CaCa2+n=209; 108 y 101 en granjas 1 y 2 respectivamente) o no conteniendo cafeína y calcio (Control; n=205; 111 y 94 en granjas 1 y 2, respectivamente). La nueva sonda de inseminación libera un gel (conteniendo o no cafeína y calcio) en el cérvix de la hembra justo antes de la deposición del semen. El semen y el gel se mezclan y distribuyen dentro del tracto genital de la hembra.

Todas las inseminaciones fueron hechas por técnicos en IA con experiencia y se usaron dosis comerciales de IA consistentes en 80ml de semen con  $3 \times 10^9$  células espermáticas diluidas en diluyente comercial. El semen fue almacenado por un máximo de 5 días.

#### Tasa de partos y tamaño de la camada

Al parto se registró el número de lechones nacidos vivos y nacidos muertos y las placentas fueron revisadas cuidadosamente para buscar momias escondidas, después se registró el número de momias.

#### Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).

Las diferencias entre tratamientos para el Total de nacidos y Nacidos vivos fueron analizadas usando el procedimiento Proc Mixed en SAS. La diferencia en la tasa de partos fue analizada con regresión logística en SAS usando el procedimiento de eliminación por regresión.

Se corrigió el efecto de granja en los datos donde era relevante. Un nivel de probabilidad de  $< 0.05$  fue considerado significativo y  $P < 0.1$  fue considerado una tendencia. Los datos presentados en el texto son medias  $\pm$  DE (desviación estándar) a menos que se especifique lo contrario.

#### Resultados

El promedio de la tasa de partos fue 84.1% y no difirió entre tratamientos. Hubo sin embargo una diferencia en la tasa de partos entre granjas 88.5 vs. 80.5% (para la granja 1 y granja 2, respectivamente;  $P = 0.05$ ).

El tamaño de la camada tendió ( $P = 0.06$ ) a ser más alto (nacidos totales) CaCa2+ comparado al Control (13.5 $\pm$ 0.3 vs. 12.7 $\pm$ 0.3 lechones, respectivamente, tabla 1) y lechones nacidos vivos fue más alto ( $P < 0.04$ ) para CaCa2+ comparado al Control (12.4 $\pm$ 0.3 vs. 11.6 $\pm$ 0.3 lechones, respectivamente, tabla 1).

Tabla 1: Datos reproductivos (media  $\pm$  DE)(desviación estándar)

	Tratamiento		Valor P
	CaCa2+	Control	
No. de hembras	209	205	
Tasa de partos (%)	82	86	0.22*
Total nacidos	13.5 $\pm$ 3.4	12.9 $\pm$ 3.5	0.06**
Nacidos vivos	12.5 $\pm$ 3.1	11.8 $\pm$ 3.4	0.037**

\* Granja  $P = 0.05$

\*\* granja, y granja\*tratamiento  $P > 0.1$

#### Discusión

El presente trabajo usó una nueva sonda de inseminación para investigar el efecto de la suplementación de cafeína y calcio al momento de la inseminación en el subsecuente comportamiento reproductivo de las cerdas bajo condiciones comerciales. Los comportamientos de fertilidad de la cerda mejoran con el uso de la nueva sonda de inseminación en combinación con la suplementación de cafeína y calcio. El efecto positivo en la fertilidad ocasionó un aumento en el tamaño de la camada mientras que la tasa de partos se mantuvo igual.

El aumento del tamaño de la camada fue atribuido a un aumento en la motilidad del esperma cuando las células espermáticas entran en contacto con la cafeína y el calcio liberado por el gel dentro de las 6 horas siguientes a la inseminación. La cafeína es probable que estimule la motilidad espermática en el mismo grado in-vivo como se observó in-vitro (Harrison et al., 1979, 1980ab; Imoedemhe et al., 1992). El aumento en la motilidad de las células espermáticas puede estimular el transporte de esperma a través del tracto reproductivo hasta el reservorio de esperma (Matthijs et al., 2003). Esto puede también reducir el volumen de la dosis de inseminación perdido por reflujo. El reflujo después de la inseminación puede representar hasta 50% de la pérdida de esperma en las primeras horas después de la inseminación (Steverink et al., 1998; Matthijs et al., 2003; Taylor, 2007). La segunda causa más importante de pérdida de esperma después de la inseminación es una gran afluencia de granulocitos neutrofilicos polimorfonucleares (PMN) en el útero después de la inseminación (Pursel et al., 1978; Rozeboom et al., 1998, 1999; Matthijs et al., 2003; Taylor 2007). Estos PMN eliminan el esperma por fagocitosis (Pursel et al., 1978; Matthijs et al., 2003). En cerdas primerizas esto depende de la presencia de plasma seminal en la dosis de IA. La presencia de plasma seminal reduce la afluencia de PMN (Rozeboom et al., 1999) dando un potencial reducido de fagocitosis de esperma. Aún no está claro cuales componentes en el plasma seminal son responsables de esta regulación a la baja de la respuesta inmune. Algunos componentes del plasma seminal han demostrado regular hacia arriba la respuesta inmune en el útero (Bischof et al., 1994; Engelhardt et al., 1997). La suplementación de cafeína (Yamaguchi et al., 2013) y calcio (Matthijs et al., 2003; Yamaguchi et al., 2009) al medio de inseminación puede limitar la respuesta

inmune uterina: reduciendo el número de PMN en el útero (Matthijs et al., 2003; Yamaguchi et al., 2013). Esta observación se debe probablemente a una regulación a la baja de la expresión del mRNA para mediadores pro-inflamatorios; Yamaguchi et al. (2013) demostraron una expresión reducida de IL-8 y COX-2 mRNA después de la inseminación con el medio suplementado con cafeína. Ambos, IL-8 y COX-2 son conocidos como mediadores para la respuesta inflamatoria del útero (Taylor 2007; Taylor et al., 2009). Esta regulación a la baja de la respuesta inflamatoria resulta en una afluencia reducida de PMN en el útero y una fagocitosis reducida de esperma. Mathijs et al., (2003) encontraron más células espermáticas libres (no fagocitadas) en el útero de animales que fueron inseminados con un medio que contenía cafeína y calcio. No hubo diferencia en el número de células espermáticas libres en el oviducto cuando se comparó la inseminación con semen preparado con medio con y sin cafeína y calcio. Sin embargo los autores encontraron que el número de esperma en el oviducto se correlacionaba con el número de esperma libre (no fagocitado) en el útero (Matthijs et al., 2003). Esto puede ser una consecuencia de fagocitosis reducida, permitiendo que más células espermáticas sean transportadas al reservorio de esperma y así optimizar las tasas de fertilización. El alto número de células espermáticas usado en las dosis comerciales, “la sobre dosificación”, así como el momento del muestreo pueden explicar la falta de diferencia en el número de esperma libre en el oviducto reportado en estos estudios. De hecho el efecto sobre la fertilidad de la suplementación de cafeína y calcio al medio de inseminación sería más fácil de detectar cuando la cantidad de células espermáticas es reducida en las dosis de inseminación. Yamaguchi et al. (2009) demostraron que cuando se usa semen congelado-descongelado las tasas de partos se elevan más del doble después de la inseminación (con dosis bajas) con medios suplementados con cafeína y calcio cuando se compararon con medios no suplementados. Ellos también encontraron que las tasas de preñez fueron más altas después de la inseminación con semen congelado-descongelado en medios suplementados con cafeína comparados con los medios no suplementados (Yamaguchi et al., 2013). El tamaño de la camada en ambos estudios no fue afectado por la suplementación del semen con cafeína y calcio o cafeína sola. En el estudio reportado en este documento, las tasas de partos no difirieron entre tratamientos pero el tamaño de la camada (nacidos totales y nacidos vivos) tendió a ser más alto para cerdas que fueron inseminadas con semen suplementado con cafeína y calcio. El hecho de que la tasa de partos no fue afectada por la suplementación de cafeína y calcio sino el tamaño de la camada puede ser consecuencia del uso en nuestro estudio de una dosis estándar de IA de semen fresco (de acuerdo a los estándares de la industria: número alto (<math>2.5 \times 10^9</math>) de células espermáticas y alto volumen (90mL)). Yamaguchi et al. (2009; 2013) usaron concentraciones bajas y bajos volúmenes de semen congelado-descongelado en sus estudios y

encontraron que las tasas de preñez/partos mejoraron. Cuando se usan dosis comerciales de semen la “sobre dosificación” de semen es suficiente para fertilizar los ovocitos necesarios para mantener la preñez (Roberts et al., 1993). El semen fresco a diferencia del semen congelado-descongelado, contiene plasma seminal, el cual tiene propiedades protectoras contra la respuesta inflamatoria del útero (Rozeboom et al., 1999) y así aumenta el número disponible de esperma aún más. Ya que esto garantizará la concepción de embriones suficientes para sostener la preñez (Roberts et al., 1993), la preñez y/o tasas de partos no son altamente afectadas cuando se sigue un protocolo estándar de IA. Sin embargo, cuando la disponibilidad de suficiente esperma en el momento óptimo para la fertilización se convierte en una limitante, esto puede afectar el tamaño de la camada ya que un momento sub-óptimo de inseminación disminuye el número de ovocitos fertilizados y el número de embriones (Soede et al., 1995) y así el tamaño de la camada. La tasa de preñez/tasa de partos no son afectadas a menos que la concentración de esperma sea realmente insuficiente (Watson and Behan, 2002). De igual forma la fagocitosis de PMN puede disminuir el número de espermas disponibles para fertilización y así disminuir el tamaño de la camada. Parece razonable asumir que en situaciones donde las condiciones son sub-óptimas para la fertilidad (temperatura ambiente alta que afecta la calidad del esperma, número bajo de espermas / dosis de inseminación de bajo volumen, semen congelado / descongelado, etc.) el efecto de la fagocitosis reducida de esperma sobre la fertilidad subsecuente es más alto que cuando está presente una sobredosis de semen fértil viable.

En conclusión, el uso de esta nueva sonda de inseminación que suplementa semen de cerdo con cafeína y calcio al momento de la IA mejora la subsecuente fertilidad (mayor tamaño de la camada). Esto es probablemente causado por una mayor motilidad y capacitación de las células espermáticas. El efecto positivo puede haber sido reforzado por una regulación a la baja de la respuesta inflamatoria del útero después de la inseminación permitiendo que más esperma alcance el sitio de fertilización.

Las posibles aplicaciones para esta nueva sonda de inseminación durante periodos de infertilidad estacional, en combinación con dosis de IA con baja concentración/bajo volumen o en combinación con el uso de semen congelado-descongelado debería, por lo tanto ser investigado posteriormente.

#### **Reconocimientos:**

Los autores desean agradecer a W.W. y M.J. Thatcher por el análisis estadístico.

#### **Referencias**

- Althouse G., 1997. The Compendium 777-781.  
 Alvarez J., Storey B., 1982. Biol Reprod 27, 1102–1108.  
 Bischof R., Lee C., Brandon M., Meeusen E., 1994. J Reprod Immunol 26;131-146.

- Engelhardt H., Croy B., King G., 1997. *J Reprod Fertil Suppl.* 52; 115-131.
- Feitsma H., 2009. *Acta Sci Vet* 37; s61-s71.
- Funahashi H., Asano A., Fujiwara T., Nagai T., Niwa K., Fraser L., 2000. *Mol Reprod Dev* 55; 117-127.
- Funahashi H., Nagai T., 2001. *Mol Reprod Dev* 58; 424-431.
- Gupta A., Gupta P., Jain S., Moudgil P., Tiwary A., 2005. *Drug Dev Res* 65 (1); 1-16.
- Fraser L., 1987. *J Reprod Fert* 81 (1); 77-89.
- Harrison R., Sheppard B., Kallizer M., 1980a. *Androl* 12; 34-38.
- Harrison R., Sheppard B., Kallizer M., 1980b. *Androl* 12; 434-437.
- Imoedemhe D., Sigue A., Pacpaco E., Olazo A., 1992. *J Assist Reprod and Gen* 9; 2 Male infertility.
- Johnson L., Weitze K., Fiser P., Maxwell W., 2000. *Anim Reprod Sci* 62; 143-172.
- Matthijs A., Engel B., Woelders H. 2003. *Reproduction* 125 (3); 357-367.
- Pursel V., Schulman L., Johnson L., 1978. *Biology of Reproduction* 19 (1); 69-76.
- Roberts R., Xie S., Trout W., 1993. *J Reprod Fertil Suppl.*48; 171-86.
- Rozeboom, K., Troedsson M., Crabo B., 1998. *J Reprod Fertil* 114 (2); 195-199.
- Rozeboom K., Troedsson M., Molitor T., Crabo B., 1999. *J Anim Sci* 77; 2201-6.
- Steверink, D., Soede N., Bouwman E., Kemp B., 1998. *Anim Reprod Sci* 54 (2);109-119.
- Soede N., Wetzels C., Zondag W., de Koning M., Kemp B., 1995. *J Reprod Fertil* 104; 99-106.
- Taylor U. 2007. PhD thesis. Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany.
- Taylor U., Zerbe H., Seyfert H., Rath D., Baulain U., Langner K., 2009. *Anim Reprod Sci* 115; 279-89.
- Vyt P., 2007. PhD thesis University of Ghent, Belgium.
- Watson P., 1995. *Reprod Fertil Dev* 7; 871-91.
- Yamaguchi S., Funahashi H., Murakami T., 2009. *J Reprod Develop* 55(6); 645-649.
- Yamaguchi S., Suzuki C., Noguchi M., Kasa S., Mori M., Isozaki Y., Ueda S., Funahashi H., Kikuchi K., Nagai T., Yoshioka K., 2013. *Therio* 79; 87-93.
- Watson P., Behan J., 2002. *Therio* 57; 1683-1693.