

CORRELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL IN VITRO Y LA FERTILIDAD IN VIVO EN CAPRINO DE RAZA MURCIANO-GRANADINA

Mocé¹, E., Lozano-Palazón², S.A., Contreras¹, S.J., Martínez-Granell¹, M., Villalba¹, I., Bernácer¹, J., Gómez¹, E.A.

¹CITA-IVIA, Polígono la Esperanza, 100. Apdo. 187, 12400-Segorbe, Castellón. ²ACRIMUR, C/ Barón del Solar, 22, 30520-Jumilla (Murcia); moce_eva@gva.es

INTRODUCCIÓN

Todos reconocemos que el semen juega un papel fundamental en la fecundación, pero sobre el éxito de un programa de inseminación influyen diversos factores que dependen de los sementales, de las cabras y de factores externos (ambientales o de manejo).

El análisis de la motilidad espermática es, por su rapidez y sencillez, uno de los más utilizados en los centros de inseminación para evaluar la calidad de las dosis producidas. Con los programas de análisis de imágenes (sistemas CASA) se obtiene información acerca de la cantidad de movimiento, pero también de la calidad de ese movimiento. Además de estos sistemas, la citometría de flujo también se utiliza cada vez más en andrología para evaluar la calidad de las dosis producidas.

En algunas especies se han observado correlaciones entre algunas variables obtenidas con los sistemas CASA y la fertilidad (Yaniz et al., 2018). En caprino, sólo existe un trabajo de este tipo en el que se establecieron correlaciones entre la fertilidad y los parámetros de motilidad del semen congelado (Furstoss et al., 2010). No obstante, la mayoría de las inseminaciones en caprino a nivel nacional se realizan con semen refrigerado.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la relación entre la calidad del semen in vitro con la fertilidad del semen refrigerado en campo en ganado caprino de raza Murciano-Granadina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron muestras de semen fresco y refrigerado de 13 machos cabríos de raza Murciano-Granadina ubicados en las instalaciones del CITA-IVIA (Segorbe, Castellón) y pertenecientes al Programa Nacional de mejora genética de la raza. En las pruebas de fertilidad se utilizaron datos de inseminación de 549 cabras de raza Murciano-Granadina alojadas en 12 ganaderías pertenecientes a la Asociación Española de Criadores de la Cabra Murciano-Granadina (ACRIMUR), localizadas en diferentes provincias.

Para la preparación de las dosis se utilizó un diluyente de refrigeración a base de leche desnatada suplementado con glucosa (2 mg/mL). La concentración de los eyaculados se ajustó a 560×10^6 espermatozoides/mL, y el semen se envasó en pajuelas de 0,25 mL que se refrigeraron lentamente desde 20 °C hasta 4 °C en un baño de agua programable o durante el transporte de las dosis en nevera a 4 °C en un prototipo de refrigeración. Cada pajuela de 0,25 mL contenía una dosis de inseminación (140×10^6 espermatozoides).

Se evaluó la calidad de los eyaculados en semen fresco (muestra tomada tras la dilución con el diluyente de refrigeración) y después de la refrigeración. Se realizaron análisis de motilidad mediante el sistema CASA (ISAS versión 1.0.17, Prolser, Valencia) y análisis de la integridad de la membrana plasmática mediante la tinción dual SYBR14-yoduro de propidio y citometría de flujo (Epics XL-MCL, Beckman Coulter, IZASA, Barcelona) según los protocolos y diluyentes descritos por Konyali et al. (2013).

Para este trabajo se utilizaron las siguientes variables obtenidas del sistema CASA: móviles totales (MT, %), móviles progresivos (MP, %), velocidades VCL, VSL y VAP ($\mu\text{m/s}$), índices LIN, STR y WOB (%) y las variables ALH (μm) y BCF (Hz). La descripción detallada de estos parámetros y su significado se puede consultar en Martínez-Pastor et al. (2011). Con respecto al análisis de integridad de membrana plasmática sólo se consideró la población de espermatozoides SYBR+/yoduro de propidio- (IMP, %).

Para la sincronización del estro en las cabras se utilizó un protocolo corto basado en el descrito por Menchaca y Rubianes (2007). Brevemente, el día 0 se colocaron esponjas intravaginales con 30 mg de acetato de flugestona (FGA, SINCROPART® 30 mg, CEVA Salud Animal, Barcelona) y al mismo tiempo se aplicó una inyección intramuscular (IM) de entre 2,5 y 5 mg de prostaglandina F₂ α (Enzaprost® T, CEVA Salud Animal, Barcelona). El día 6 se retiraron esponjas y cada cabra recibió una inyección IM de 250 UI (para las IA realizadas en otoño-invierno) o de 300 UI (para las IA realizadas en primavera-verano) de PMSG (SINCROPART® PMSG 6000 UI, CEVA Salud Animal, Barcelona).

La IA se realizó el día 8, en un intervalo entre las 45 y las 48 h tras la inyección de PMSG. El contenido de una dosis de IA fue depositado lentamente lo más profundo posible en el cuello uterino. En el estudio se utilizó la fertilidad a parto.

Para el análisis de los datos se utilizaron los paquetes estadísticos Statgraphics Centurion XVII y SAS Statistical Software versión 9.2. Al ser la fertilidad un carácter binario se utilizaron modelos de regresión logística, que permiten utilizar efectos numéricos y efectos categóricos fijos y modelos lineales generalizados, que permiten incluir efectos aleatorios (por ejemplo, sesión). Como criterios estadísticos se utilizaron el test chi-cuadrado de Wald, que testa si el valor del coeficiente estimado para el efecto es distinto de cero (una $P < 0,05$ indica que es diferente de cero), y criterios de información de Akaike (AIC) y de Schwarz (BIC) que informan sobre el ajuste del modelo (mejor ajuste a valor más pequeño).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La calidad del semen fresco y refrigerado de este estudio es elevada (Tabla 1) y la fertilidad obtenida fue del 59,3%, valor próximo a los valores medios de 2017 en las asociaciones nacional y española (MURCIGRAN, 2018; comunicación personal). Los valores MT y MP de nuestro estudio son similares a los observados en trabajos previos para esta especie (Barbas et al., 2018; Konyali et al., 2013; Santiago-Moreno et al., 2017; Xu et al., 2009). Por otra parte, no hay demasiados trabajos en caprino donde se hayan estudiado los parámetros cinéticos. Nuestros resultados son inferiores a los observados por Barbas et al. (2018) en algunos de los parámetros cinéticos del semen fresco (VCL, VAP y ALH) y superiores para el resto de parámetros. Además, nuestros resultados son en general superiores a los observados por Santiago-Moreno et al. (2017). Estas diferencias entre trabajos pueden ser debidas a diferencias en el protocolo seguido para evaluar la motilidad (concentración de espermatozoides, diluyente o cámara de recuento celular utilizados), en el software utilizado o razas utilizadas, factores que influyen en las medidas obtenidas (Yeste et al., 2018). Tanto en fresco como en refrigerado los mayores coeficientes de variación aparecen en los porcentajes de espermatozoides vivos y los menores en el índice de rectitud y en el índice de oscilación (STR y WOB).

Muchos autores han resaltado la dificultad que representa proponer un análisis de laboratorio capaz de predecir la capacidad fecundante de las dosis debido al gran número de factores que influyen sobre este carácter (para una revisión, ver Graham y Mocé, 2005). Así, el uso de un número elevado de espermatozoides y la preselección de los eyaculados garantizan fertilidades elevadas pero enmascaran los eyaculados subfértiles.

Esto explica que los modelos y los efectos que más influyen sobre el carácter fertilidad varíen entre trabajos. Generalmente, se observan correlaciones entre alguna de las velocidades y la fertilidad. De entre todos los modelos estudiados en este trabajo, los mejores ajustes se obtuvieron con un modelo que incluía la sesión como efecto aleatorio y un solo efecto numérico, la velocidad curvilínea (VCL) del semen fresco o la velocidad media (VAP) (Tabla 2). En otras especies, VCL (en ovino, Santolaria et al., 2015) o VCL junto con MT y MP (en porcino, Broekhuijse et al., 2012) son las variables con mayor capacidad predictiva de la fertilidad. No obstante, en otros trabajos es VAP la que más se correlaciona con la fertilidad del semen criopreservado en caprino (Furstoss et al., 2010) y vacuno (Nagy et al., 2015) o semen refrigerado en ovino (Vicente-Fiel et al., 2014).

Es necesario destacar que muchos estudios no incluyen la sesión como efecto en los modelos de análisis. Nuestros resultados evidencian que este efecto, que es ambiental y difícil de controlar porque incluye múltiples factores, es el que más influye sobre la fertilidad. El predominio del efecto sesión, por tanto, complica todavía más el encontrar un análisis de laboratorio con capacidad predictiva de la fertilidad de las dosis de semen en granja.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbas, J.P. 2018. *Cryobiology* 82: 137-147.
- Broekhuijse, M.L. et al. 2012. *J. Anim. Sci.* 90: 779-789
- Furstoss, V. et al. 2010. *Theriogenology* 74: 1197-1206.
- Graham, J.K. et al. 2005. *Theriogenology* 64: 492-504.
- Konyali, C. et al. 2013. *Cryobiology* 67:124-131.
- Martínez-Pastor, F. et al. 2011. *Theriogenology* 75: 783-795.
- Menchaca, A. 2007. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 590-593.
- Nagy, Á. et al. 2015. *Acta Vet. Hung.* 63: 370-381.
- Santiago-

Moreno, J. et al. 2017. Anim. Reprod. Sci. 181: 141-150. • Santolaria, M.P. 2015. Anim. Reprod. Sci. 163: 82-88. • Vicente-Fiel, S. et al. 2014. Anim. Reprod. Sci. 146: 15-20. • Xu, C.L. et al. 2009. Reprod. Domest. Anim. 44: 771-778. • Yaniz, J.L. et al. 2018. Reprod. Fertil. Dev. 30: 799-809. • Yeste, M. et al. 2018. Reprod. Fertil. Dev. 30: 789-798.

Agradecimientos: INIA RTA2017-00049-C02-01 cofinanciado con fondos FEDER.

Tabla 1. Análisis descriptivo de calidad seminal en 62 eyaculados frescos y refrigerados (N = número de inseminaciones)

Variable	Unidades	Semen fresco					Semen refrigerado				
		Media	Max.	Min.	CV (%)	N	Media	Max.	Min.	CV (%)	N
IMP	%	67	92	26	20,4	449	55	84	17	25,6	449
MT	%	79	95	51	11,6	513	77	94	59	10,4	513
MP	%	63	81	39	15,3	513	62	82	36	13,8	513
VCL	µm/s	134	172	95	12,8	513	142	180	109	11,2	513
VSL	µm/s	117	153	81	14,4	513	121	155	87,2	12,8	513
VAP	µm/s	127	165	88	13,9	513	134	172	95,5	12,6	513
LIN	%	84	91	74	5,2	513	83	89	71	4,8	513
STR	%	89	94	82	3,2	513	88	93	81	3	513
WOB	%	93	96	86	3,0	513	93	96	84	2,9	513
ALH	µm	1,84	2,8	1,47	14,2	513	2,06	3,02	1,60	12,5	513
BCF	Hz	10,7	12,3	8,9	7,6	513	10,7	12,7	9,13	7,1	513

Tabla 2. Mejores modelos logísticos mixtos tras selección de variables de calidad seminal en semen fresco y refrigerado (N = 513 inseminaciones)

Modelos	E. Aleatorio*	Covarianza**	E. Numérico	P-Wald	AIC	BIC
Modelo 1	Sesión	0,4243	VAP fresco (µm/s)	0,0024	184,3	183,8
Modelo 2	Sesión	0,4370	VCL fresco (µm/s)	0,0020	184,9	184,4

*Sesión: jornada de preparación de dosis y de inseminación; **Covarianza: estimación de la varianza asociada al efecto aleatorio; P-Wald : Probabilidad del test chi-cuadrado de Wald. Valores menores de 0,05 indican que el coeficiente en el modelo es diferente de 0 con una probabilidad mayor del 95%; AIC: criterio de información de Akaike; BIC: criterio de información de Schwartz.

CORRELATION BETWEEN IN VITRO SPERM QUALITY PARAMETERS AND IN VIVO FERTILITY IN THE MURCIANO-GRANADINA GOAT BREED

ABSTRACT: We studied the relation between some in vitro sperm quality parameters and the in vivo fertility in goats from the Murciano-Granadina breed. Refrigerated semen doses were prepared from 13 bucks and were inseminated into 549 goats. Motility and sperm plasma membrane integrity (PMI) were evaluated in 62 fresh and refrigerated ejaculates by means of a computer-assisted motility analyzer system (CASA) and flow cytometry. The quality of the fresh ejaculates (79% total motile, 69% progressively motile and 67% PMI) and refrigerated doses (77% total motile, 62% progressively motile and 55% PMI) was high, and the average fertility at parturition was 59%. From all the models studied, the best adjustment was obtained with a model that included the session (of doses preparation and artificial insemination) as random and the curvilinear velocity of fresh semen (VCL) or average path velocity (VAP) as numerical effects. However, the session is the effect that mostly influences the fertility obtained. As this is an environmental effect including many factors and it is not easily controllable, finding a lab assay whose results highly correlate with the in vivo fertility is difficult.

Keywords: fertility; in vitro quality; CASA system; correlation.