

---

## **Efecto de la proteína anticongelante *Anti-Freeze Protein tipo III* sobre la calidad del semen porcino criopreservado: La centrifugación refrigerada como método de concentración sobre la calidad del semen porcino**

Chapero, L.A.<sup>1</sup>; Bilbao, M.G.<sup>1,2</sup>; Marengo, L.<sup>1</sup>; Rossetto, L.<sup>1</sup>; Aimar Chiesa, I.<sup>1</sup>; Fernández, F.<sup>1</sup>; Moran, K.D.<sup>1,2</sup>; Boeris, M.A.<sup>1</sup>; Anconetani, M.<sup>1</sup>; Schwindt, C.<sup>1</sup>; Barbará, M.<sup>1</sup>; Cura, S.<sup>1</sup>; Tortone, C.<sup>1</sup>; Farcey, M.F.<sup>1</sup>; Zapata, L.O.<sup>1</sup>; Bartolomé, J.A.<sup>1</sup>; Ramos, S.<sup>1</sup>; Molejón, M.I.<sup>2,3</sup>; Weiz, G.<sup>2,3</sup>; Breccia, J.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam.

<sup>2</sup>CONICET.

<sup>3</sup>INCITAP - UNLPam.

mgbilbao@vet.unlpam.edu.ar

### **RESUMEN**

La concentración de semen mediante la técnica de centrifugación es uno de los primeros pasos en los protocolos de criopreservación, por lo que el menor daño que se ejerza sobre los espermatozoides (esp.) en este proceso resulta de fundamental importancia para los pasos ulteriores. Asimismo, se desea obtener en cada dosis el mayor número de esp. viables con acrosomas intactos. El propósito de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes protocolos de centrifugación refrigerada como técnica de concentración sobre la calidad espermática, con el fin de estandarizar un protocolo de criopreservación. Para ello, durante los meses de abril a diciembre de 2018, se analizaron n = 13 muestras de semen, obtenidas mensualmente mediante la técnica de mano enguantada, provenientes de tres verracos pertenecientes a la FCV-UNLPam. Se consideraron aceptables aquellos eyaculados que tuvieran  $>200 \times 10^6$  esp/mL,  $>60\%$  de esp. móviles y  $>60\%$  de esp. morfológicamente normales. Se evaluaron tres protocolos de centrifugación a  $15^\circ\text{C}$ : 2400 Xg por 3 minutos (C1), 2400 Xg por 10 minutos (C2) y 1500 Xg por 10 minutos (C3). Las variables analizadas antes (SC) y después de C1, C2 y C3, fueron: i) Concentración espermática ( $10^6$  esp/mL), determinada mediante SpermaCue; ii) % de esp. con motilidad progresiva (MP), en microscopio de contraste de fases (400x) a  $37^\circ\text{C}$ ; iii) % de esp. morfológicamente normales, por el método de tinción húmeda en BSF; y iv) % esp. con integridad acrosomal, ambos utilizando microscopio con contraste de fases DIC - Nomarski a 1000x. Las variables con distribución normal se analizaron mediante la prueba de ANOVA. Las variables cuya distribución no se ajustó a la normalidad se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis. Los valores se expresan como Media  $\pm$  EEM, considerándose diferencias significativas cuando  $P < 0,05$ . Encontramos que los tres protocolos de centrifugación aumentaron la



concentración respecto del semen SC (SC:  $520,58 \pm 55,67$ ; C1:  $1625,00 \pm 46,20$ ; C2:  $1597,27 \pm 49,42$ ; C3:  $1593,64 \pm 41,00$ ;  $P < 0,001$ ), sin alterar el % de esp. morfológicamente normales ( $P = 0,773$ ) ni el % de esp. con integridad acrosomal ( $P = 0,136$ ). Sin embargo, se registraron diferencias en el % de esp. con MP obtenida luego de la centrifugación (SC:  $77,83 \pm 1,89$ ; C1:  $69,58 \pm 1,89$ ; C2:  $72,27 \pm 1,95$ ; C3:  $68,64 \pm 1,36$ ;  $P = 0,003$ ). Al analizar estas diferencias con el posttest de Bonferroni, C2 fue el único que no disminuyó el % de esp. con MP ( $P = 0,208$ ). Por lo tanto, podemos concluir que si bien ninguno de los protocolos de centrifugación modificó el % de esp. con morfología normal y en especial el % de esp. con acrosomas normales, solo uno de ellos parecería no afectar el % de esp. con MP. Por lo tanto,  $2400 \times g$  a  $15^\circ C$  por 10 minutos no afectaría la calidad seminal.

Palabras clave: Semen, Porcinos, Criopreservación, Acrosomas, HOS Test.

## **Effect of the addition of Anti-Freeze Protein Type II to commonly used extender on boar semen quality: Refrigerated centrifugation as concentration strategy on boar sperm quality**

### **ABSTRACT**

Sperm concentration by refrigerated centrifugation is the first step in the semen cryopreservation. For that reason, it is necessary to minimize the injury introduced on spermatozoa during this process to avoid impairment of their in vitro fertilizing ability. We aimed to compare the effect of three different refrigerated centrifugation protocols on boar semen quality. From April to December (2018),  $n = 13$  ejaculated from  $n = 3$  males from FCV-UNLPam, were obtained by the gloved hand technique. Ejaculated with  $> 200 \times 10^6$  sperm/mL,  $> 60\%$  motile sperm and  $> 60\%$  morphologically normal sperm were included in this assay. We tested three centrifugation protocols at  $15^\circ C$ :  $2400 \times g$  for 3 minutes (C1),  $2400 \times g$  for 10 minutes (C2) and  $1500 \times g$  for 10 minutes (C3). Before centrifugation (BC) and after C1, C2 y C3, sperm concentration ( $10^6$  sperm/mL) was measured using SpermaCue; the % of sperm with progressive motility (PM) was determined using phase-contrast microscopy (400 x) at  $37^\circ C$ ; the % of sperm with normal morphology and the % of sperm with acrosomal integrity, were determined using phase-contrast DIC - Nomarski microscopy at 1000 x. Normally distributed variables were analyzed with ANOVA. Variables not normally distributed even after transformation were analyzed using the Kruskal-Wallis test. Values are presented as Mean  $\pm$  SEM and significative differences were considered  $P < 0,05$ . We found that the three protocols enhanced sperm concentration (SC:  $520,58 \pm 55,67$ ; C1:  $1625,00 \pm 46,20$ ; C2:  $1597,27 \pm 49,42$ ; C3:  $1593,64 \pm 41,00$ ;  $P < 0,001$ ), without altering neither the % of sperm with normal morphology ( $P = 0,773$ ), nor the % of sperm with acrosomal integrity ( $P = 0,136$ ). Conversely, we found that the % of sperm with PM was altered by centrifugation protocol (SC:  $77,83 \pm 1,89$ ; C1:  $69,58 \pm 1,89$ ; C2:  $72,27 \pm 1,95$ ; C3:  $68,64 \pm 1,36$ ;  $P = 0,003$ ). Using Bonferroni posttest to analyze differences between each centrifugation protocol and BC, only C2 maintained unchanged the % of sperm with PM ( $P = 0,208$ ). Therefore, we conclude that  $2400 \times g$  at  $15^\circ C$  for 10 minutes would be



appropriated to concentrate boar semen as the first step of the cryopreservation process.

Keywords: Semen, Boar, Cryopreservation, Acrosome, HOS Test.

