
Sección: Artículos de investigación

Determinación del efecto tóxico de extractos pulmonares sobre semen porcino refrigerado

Artículo de Cerutti D, Castillo M, Ramos S, Koncurat M, Cisale, H

CIENCIA VETERINARIA, Vol. 23, Nº 1, enero-junio de 2021, ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea), pp. 39-46

DOI: <https://doi.org/10.19137/cienvet-202123103>

Determinación del efecto tóxico de extractos pulmonares sobre semen porcino refrigerado

Determination of the Toxic Effect of Pulmonary Extracts on Refrigerated Porcine Semen

Determinação do efeito tóxico de extratos pulmonares em sêmen suíno refrigerado

Cerutti D¹; Castillo M²; Ramos S³, Koncurat M², Cisale, H⁴

1 Cátedra de reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa. Calle 5 esquina 116, General Pico (6360). La Pampa. República Argentina

2 Cátedra de Biología General Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Pampa.

3 Cátedra de Producción Porcina. Universidad Nacional de La Pampa.

4 Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Rosario. Boulevard Colón 1999 (376,07 km) 2170 Casilda, Santa Fe, Argentina

Correo electrónico: dacerutti@hotmail.com

RESUMEN

Los surfactantes sintéticos han mostrado efectos positivos sobre la integridad de la membrana celular de los espermatozoides crio conservados, sin afectar su motilidad. Dado que los extractos pulmonares poseen sustancias surfactantes, es de esperar que produzcan efecto positivo sobre la fertilidad de los espermatozoides de verraco luego de su crio conservación. Con el objetivo de disponer de evidencia preliminar respecto de la ausencia/presencia de toxicidad de extractos pulmonares sobre el semen, se utilizaron eyaculados de dos verracos con edades comprendidas entre los 24 y los 30 meses. Cada eyaculado se dividió en dos grupos. Uno de ellos se diluyó con un medio comercial de media duración (Grupo testigo) y el otro con el mismo medio más el agregado de: 2.5, 5 o 10 % de extracto pulmonar de cerdo (Grupos tratamiento). Como indicadores del efecto del tratamiento sobre la calidad del semen se determinó la relación vivos muertos, el host test y la integridad acrosómica. Las muestras se evaluaron luego de 0, 24 y 48 horas de incubación a 17°C y 36°C. El experimento se repitió en tres eyaculados de cada uno de los verracos, a efectos de determinar



Esta obra se publica bajo licencia Creative Commons 4.0 Internacional. (Atribución-No Comercial-Compartir Igual) a menos que se indique lo contrario, <http://www.creativecommons.org.ar/licencias.html>

la interacción entre los componentes del medio de conservación, y los extractos pulmonares, y la calidad de los espermatozoides porcinos. Los resultados demostraron que no existen diferencias significativas en los parámetros observados entre los diferentes momentos de evaluación, ni en las diferentes concentraciones de extractos, como tampoco se observó diferencia entre individuos. Se concluye que los extractos pulmonares no presentan efectos tóxicos sobre los espermatozoides porcinos.

Palabras clave: semen porcino, surfactantes pulmonares, crio conservación

ABSTRACT

Synthetic surfactants have shown positive effects upon the integrity of the cell membrane of cryopreserved sperm without affecting their motility. As pulmonary extracts have surfactant substances, they are expected to produce a positive effect on the boar sperm fertility after cryopreservation. In order to have preliminary evidence regarding the absence / presence of toxicity of pulmonary extracts on semen, ejaculates from two boars, aged between 24 and 30 months, were used. Each ejaculate was divided into two groups. One of them was diluted with a middle-term commercial medium (Control group) and the other with the same medium plus the addition of: 2.5, 5 or 10% of pig pulmonary extract (Treatment group). As indicators of the treatment effect on semen quality, the live-dead ratio, the host test and the acrosome integrity were determined. Samples were evaluated after 0, 24 and 48 hours of incubation at 17 ° C and 36 ° C. The experiment was repeated in three ejaculates of each one of the boars, in order to determine interaction between the components of the preservation medium and the pulmonary extracts, and the quality of the porcine sperm. The results show that there are no differences in the parameters observed between the different evaluation moments, nor in the different extract variations, as well as no difference between individuals. It is concluded that pulmonary extracts do not present toxic effects on porcine sperm.

Keywords: porcine semen, pulmonary surfactants, cryopreservation

RESUMO

Os surfactantes sintéticos têm demonstrado efeitos positivos na integridade da membrana celular dos espermatozoides criopreservados,

sem afetar sua motilidade. Uma vez que os extratos pulmonares contêm substâncias surfactantes, espera-se que produzam um efeito positivo na fertilidade dos espermatozoides de javali após sua criopreservação. Com o objetivo para obtenção de evidências preliminares quanto à ausência / presença de toxicidade dos extratos pulmonares no sêmen, foram utilizados ejaculados de dois varrascos com idade entre 24 e 30 meses. Cada ejaculação foi dividida em dois grupos. Um deles foi diluído com meio comercial de média duração (Grupo Controle) e o outro com o mesmo meio acrescido de: 2.5, 5 ou 10% de extrato de pulmão de porco (Grupos Tratamento). Como indicadores do efeito do tratamento sobre a qualidade do sêmen, foram determinados a proporção de vivos-mortos, o host test e a integridade do acrossômico. As amostras foram avaliadas após 0, 24 e 48 horas de incubação a 17 ° C e 36 ° C. O experimento foi repetido em três ejaculações de cada um dos varrascos, a fim de determinar a interação entre os componentes do meio de preservação e os extratos pulmonares e a qualidade dos espermatozoides suínos. Os resultados mostraram que não há diferenças significativas nos parâmetros observados entre os diferentes momentos de avaliação, nem nas diferentes concentrações dos extratos, nem diferença entre os indivíduos. Conclui-se que os extratos pulmonares não apresentam efeitos tóxicos nos espermatozoides suínos.

Palavras-chave: Sêmen suíno, surfactante pulmonar, criopreservação

Fecha recepción: 03/08/2020

Aceptado para publicar: 18/09/2020

Introducción

La difusión de la inseminación artificial en cerdos se ha visto dificultada por la baja supervivencia de espermatozoides luego de la criopreservación, lo que dificulta el transporte de material genético. La incorporación de agentes tensioactivos ha significado un gran avance en la eficiencia de esta biotecnología en el manejo de semen porcino ^(1,2), y de otras especies como, equino⁽³⁾, caprino ⁽⁴⁾ bovino ⁽⁵⁾, ovino ⁽⁶⁾ caninos ⁽⁷⁾ y felinos. ⁽⁸⁾ Estos estudios determinaron efectos positivos en la interrelación de los componentes de los diluyentes y los lípidos y proteínas de la membrana plasmática de los espermatozoides. En estos trabajos se determinó un efecto positivo de los surfactantes sintéticos sobre la integridad de la membrana celular de los espermatozoides. El tejido pulmonar

posee agentes surfactantes naturales como fosfolípidos: dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina insaturada, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, y proteínas: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D. Es importante determinar si existe en los extractos pulmonares algún efecto benéfico en la crioconservación de semen de cerdo. Antes de comenzar con ensayos concluyentes determinamos la ausencia de efectos tóxicos que dichos extractos ejercen sobre los espermatozoides de verraco.

No hay reportes de efectos del uso de extractos naturales de pulmones sobre la membrana plasmática de los espermatozoides.

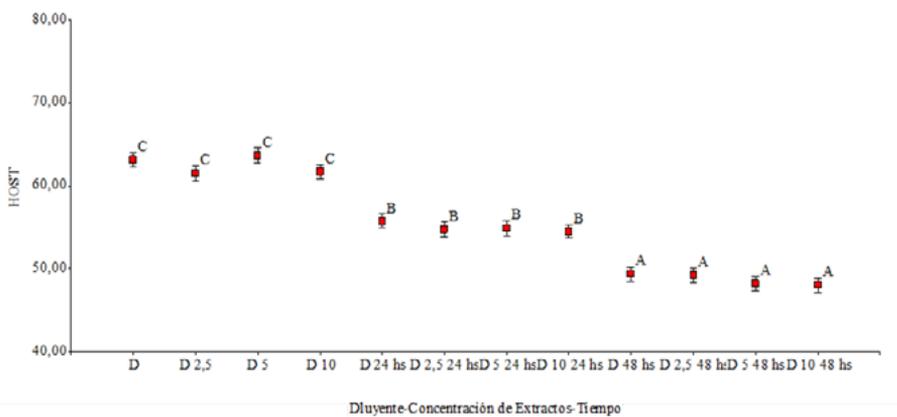
Materiales y métodos

Se utilizaron eyaculados porcinos obtenidos en el Centro de reproducción de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.Pam. La extracción de semen se realizó por medio de la técnica manual ⁽⁹⁾, utilizando bolsa de recolección con filtro, recolectando solo la porción rica en espermatozoides. Una vez en el laboratorio se determinó la concentración, integridad acrosómica, test hipo osmótico y relación vivos muertos. Las muestras se dividieron en ocho grupos, uno diluido en solución salina tamponada (PBS), tres con PBS más el agregado de 2.5, 5 o 10 % de extractos pulmonares que se conservaron a 36°C; otro con diluyente M IIR Minitube, de media duración (grupo testigo) conservado a 17°C, y a los tres grupos restantes se le agregaron: 2.5, 5 o 10 % de extractos pulmonares y se conservaron a 17°C para su evaluación. La concentración final de espermatozoides evaluados, se unificó en 3 x 10⁷ células por ml. en todos los casos. El extracto pulmonar se preparó con trozos de 1cm² provenientes del lóbulo dorsal del pulmón de cerdos de 3 a 5 meses de edad obtenidos en frigorífico; se colocaron en 5 partes de solución fisiológica, se trituraron con molinillo y se centrifugaron a 5.000 rpm durante 10 minutos, luego se recogió el sobrenadante y se filtró mediante filtros de 60 micras, congelándolos en tubos eppendorf a -20°C hasta su uso. La concentración se determinó por medio de cámara de Bürker. La relación vivos muertos se observó por medio de la tinción de eosina-nigrosina con microscopio de luz directa (Nikon Eclipse e 200) y objetivo de inmersión a 1000 aumentos. La integridad acrosómica se determinó por medio de observación directa con microscopio de contraste de Fase (Nikon Eclipse e 200) objetivo de inmersión a 1000 aumentos. El test hipo osmótico se realizó incubando 10 microlitros de semen en 10 ml de solución hipo osmótica (citrato de sodio al 0.49 % y fructosa al 0.9 %) a 36°C durante 10 minutos, se fijó con solución hiposmótica formolada y se observó en un microscopio de contraste de fase a 1000 aumentos. Las

muestras conteniendo diluyente comercial más el agregado de extractos pulmonares fueron diluidas y evaluadas a las 0, 24 y 48 horas de incubación a 17°C; las muestras conteniendo PBS y diferentes concentraciones de extractos pulmonares también se evaluaron a las 0 hs a 36°C. Los resultados se compararon mediante anova. Cualquier diferencia significativa ($p < 0,05$) entre muestras, en algún parámetro evaluado, se considerará efecto tóxico de los extractos pulmonares sobre los espermatozoides de cerdo.

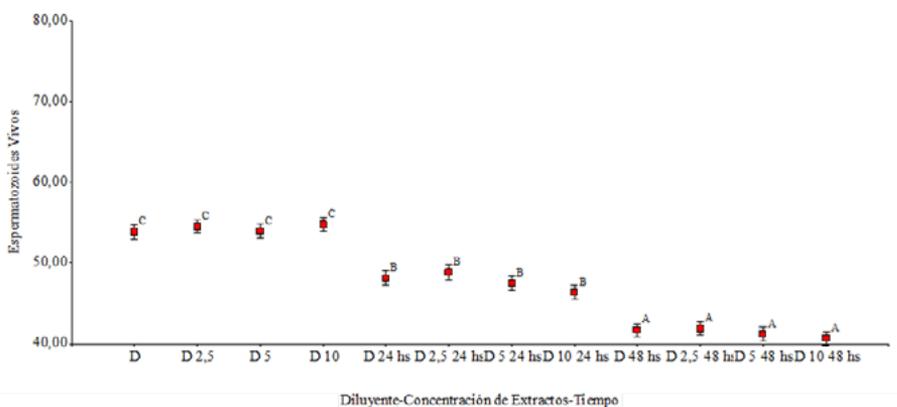
Resultados

Test de endósmosis



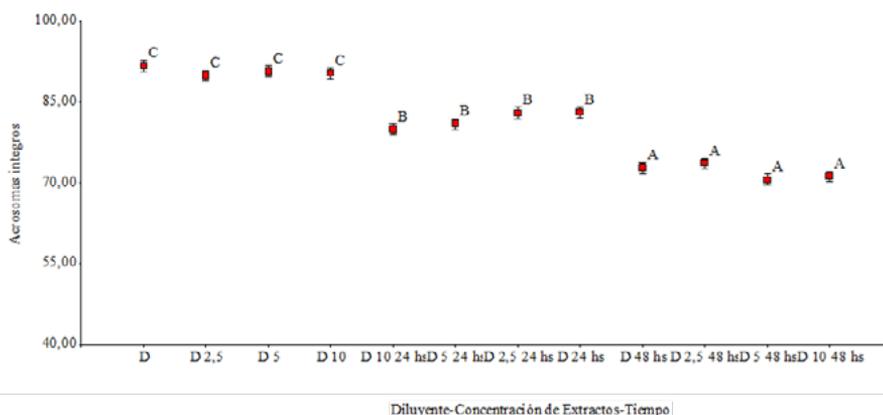
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$)

Relación Vivos/Muertos



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p <= 0,05$)

Integridad Acrosómica



Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Discusión

La evidencia científica de los efectos positivos de los surfactantes sintéticos fue observada en equinos ovinos ⁽¹⁾, cerdos ^(2,3), equinos ⁽⁴⁾, caprinos ⁽⁵⁾, bovinos ⁽⁶⁾, caninos ⁽⁷⁾ y felinos ⁽¹⁻⁸⁾, siendo evaluados solos ^(1,2,3,4,7.) o combinada con diferentes componentes de efecto crio conservante conocidos, como la yema de huevo o glicerol ^(5,6). No hay trabajos publicados del efecto surfactante de los extractos pulmonares, aunque diferentes autores determinaron la presencia en el tejido pulmonar, de agentes surfactantes naturales potentes como dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), fosfatidilcolina insaturada, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, y proteínas: SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, no existen trabajos que evalúen efecto de los extractos pulmonares porcinos sobre la crio conservación del semen

Conclusión

No habiéndose encontrado diferencias en los parámetros evaluados, bajo las condiciones del presente experimento, para los medios de crio conservación, conteniendo diluyente comercial y diluyente con el agregado de 2,5, 5 y 10 % de extractos pulmonares, se determina la ausencia de toxicidad de los extractos pulmonares utilizados en la crio conservación de semen porcino.

Bibliografía

1. Graham E, Crabo B. Some Factors Influencing the Freezing Of Boar Spermatozoa. Proc. 7th. Int. Cong. Anim. Reprod., München 1972, Vol. 2, pp. 1627.
2. Shulman V, Johnson I. Effect Of Orvus Es Paste On Acrosome Morphology, Motility And Fertilizing Capacity Of Frozen-Thawed Boar Semen, Poursel. J. Anim. Sci. 1978. 47: 198-202.
3. Martin J, Klug E, Günzel A. Investigations On Centrifugation Of Stallion Semen And Storage In Large Volume Straws. 2nd. Int. Symposium on Equine Reproduction. 1978 Davis, California, 24-28.07.
4. Hellemann C, Gonzalez M, Guzman A. Efecto De Yema De Huevo en Polvo, un Surfactante y Centrifugación En La Supervivencia De Espermatozoides Caprinos Congelados, Arch. Med. Vet. 1992. 24(2): 23-30.
5. Arriola J, Foote H. Glycerolation And Thawing Effects On Bull Spermatozoa Frozen In Detergent-Treated Egg Yolk And Whole Egg Extenders. J. Dairy Sci. 1987 70: 1664-1670.
6. Hellemann M, Jara T. Efecto De Un Surfactante Sobre La Integridad De Espermatozoides Ovinos Crioconservados, Centro de Inseminación Artificial, Universidad Austral de Chile. 1997. Casilla 567, Valdivia, Chile
7. Alhaider A, Watson P. Cryopreservation Of Dog Semen: The Effects Of Equex Stm Paste On Plasma Membrane Fluidity And The Control Of Intracellular Free Calcium. Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Royal College Street. 2009. London NW1 0TU, UK
8. Axné E, Hermansson U, Linde-Forsberg C. The Effect Of Equex Stm Paste And Sperm Morphology On Post-Thaw Survival Of Cat Epididymal Spermatozoa. Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences. 2004. P.O. Box 7039, S-75007 Uppsala, Sweden.
9. Marotta E. Extracción de semen en el cerdo: técnica y material. Revista de Medicina Veterinaria 1973. 54:2534.

