

EVALUACIÓN DEL *CHEMSENSOR* COMO HERRAMIENTA DE DISCRIMINACIÓN PRECOZ DE EYACULADOS DE CERDO IBÉRICO EN FUNCIÓN DE SU CONGELABILIDAD

Gómez-Fernández¹, J., Tomás², C., Gómez-Izquierdo¹, E., Carrasco³, J.A. y de Mercado¹, E.

¹ Centro de Pruebas de Porcino del ITACyL. Ctra. Riaza-Toro s/n, 40353 Hontalbilla (Segovia). ² CITA-IVIA. Apdo. 187. 12400- Segorbe (Castellón). España. ³ Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), C/José Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, España. ita-merpened@itacyl.es.

INTRODUCCIÓN

Las diferencias existentes en congelabilidad, entre individuos de una misma raza, parecen tener un origen genético (Thurston et al., 2002). Sin embargo, se desconoce cómo dichas diferencias genéticas se pueden relacionar con la congelabilidad. El poder conocer de antemano si el eyaculado de un verraco congelará bien o mal, sería un punto vital para el uso de la técnica de crioconservación espermática a nivel comercial. Por ello, es necesario encontrar métodos que permitan la determinación precoz de la congelabilidad de los eyaculados, evitando el coste de congelar y descongelar muestras para estimar su calidad espermática. El “ChemSensor” es una técnica basada en la cromatografía de gases – masas que unida a un *software* específico, puede ser utilizado como equipo de discriminación de un conjunto de muestras. Se utiliza en numerosas aplicaciones en la industria alimentaria y química en general (Radovic et al., 2001; Landaud, 2008; Rodríguez-Bencomo et al., 2009). Esta técnica utiliza los compuestos volátiles de las muestras y mediante un software propio obtiene las fracciones másica y su abundancia, para cada una de las muestras. El conjunto de fracciones másicas se comporta como una huella digital de cada muestra y mediante el oportuno programa de quimiometría se llega a una perfecta discriminación entre muestras. Así el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del ChemSensor como herramienta de discriminación de eyaculados en función de su congelabilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se utilizaron 37 eyaculados de diferentes verracos de raza Ibérica. Fueron recuperados de forma manual, diluidos 1:1 en una solución comercial de *Beltsville Thawing Solution* (BTS, Minitube, Alemania) y transportados a 15 °C hasta el laboratorio donde fueron procesados. Antes de ser diluidos se tomó una muestra de 1 ml de semen puro, que se congeló a -80°C hasta su posterior análisis con el ChemSensor. Los eyaculados procesados presentaron valores mínimos de 80% de espermatozoides vivos y 75% de espermatozoides móviles.

Para la determinación de la congelabilidad de los eyaculados, éstos fueron congelados y evaluados post-descongelación para su clasificación. El método de congelación utilizado se basó en el procedimiento descrito originalmente para pajuelas de 5 ml por Westendorf et al., (1975) y modificado por Thurston et al., (1999) y Carvajal et al., (2004), utilizando el medio de congelación Fructosa-yema de huevo (Thilmant, 1997). Las muestras fueron descongeladas en un baño de agua a 37°C durante 20 segundos y diluidas 1:1 en BTS. Pasados 30 minutos de incubación, se analizó el porcentaje de espermatozoides móviles totales (% MT), mediante el sistema SCA (Sperm Class Analyzer®, Microptic, Barcelona, España), así como el porcentaje de espermatozoides vivos totales (% VT), mediante una doble tinción fluorescente con loduro de propidio (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Países Bajos)(espermatozoides con membrana dañada/muertos) y SYBR-14 (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Países Bajos) (espermatozoides con membrana intacta/vivos): un mínimo de 200 células fueron contadas bajo la luz de un microscopio de fluorescencia.

Para el análisis del ChemSensor se extrajeron los compuestos volátiles del semen en un espacio de cabeza unido a un cromatógrafo de gases-masas (Mass selective detector 5973 Network Plus+, Agilent Technologies, Avondale, PA, EE.UU.) con una columna de retención de iones HP-5MS. Los resultados de las diferentes fracciones másicas obtenidos se analizaron con el programa quimiométrico Pirouette® (Infometrix Co., Tulsa, OK, EE.UU.), utilizando el método de clasificación SIMCA (Soft Independent Modelling Class Analogy). El programa procede a la clasificación de las muestras, a las que se asigna una clasificación previa conocida por los métodos analíticos antes indicados. Para el programa ésta es la

clase estimada. El programa responde con una clasificación “calculada”, junto con una distancia a otras clases del sistema. Esta distancia informa de la calidad de la clasificación, siendo mayor cuanto mayor sea la misma. El sistema puede indicarnos que una muestra no pertenece a ninguna de las clases. También se realizó un análisis de clasificación por *clusters* con el programa estadístico Statgraphics, para la separación en dos grupos de los distintos eyaculados (buenos y malos congeladores), usando como variables discriminantes el % MT y el % VT, tras 30 minutos de incubación a 37°C (Roca et al. 2006). Las diferencias entre las medias de los grupos fueron contrastadas con el paquete estadístico SAS (Versión 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EE.UU.) mediante un análisis GLM, para determinar si dichas diferencias entre grupos eran significativas ($P < 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron claramente 2 grupos de congelabilidad (buenos y malos congeladores), con diferencias significativas entre ellos en % MT y el % VT (Tabla 1). En el ChemSensor se utilizaron 500 fracciones másicas para la discriminación de las muestras, que se comportan como auténticas variables. El modelo propuesto es pues de dos clases: buenos congeladores y malos congeladores. En la tabla 2 se observa que los buenos congeladores son discriminados al 100% y que en los malos congeladores únicamente existe uno con clasificación equivocada.

Las distancias obtenidas de separación entre grupos fueron de 2,62. Algunos autores determinan que dichas distancias solo pueden considerarse significativas por encima de 3 (Busto et al. (2002)). Pero Laguerre et al. (2007) determinaron que distancias superiores a 2 pueden considerarse significativas si se parte de un número de muestras reducido. Teniendo en cuenta el bajo número de muestras usadas debido a que son muestras de semen de cerdo Ibérico, del que muchas estirpes se encuentran en peligro de extinción, se puede considerar que las distancias de separación son suficientes para discriminar un grupo de otro.

Estos resultados parecen indicar la existencia de diferencias en la composición bioquímica entre grupos de muestras, posiblemente debidas a que los machos que congelan bien, poseen ciertas características en su estructura celular que hace que su composición sea bien discriminada mientras que los malos congeladores pueden poseer ciertas características de los buenos congeladores y por tanto en ocasiones pueden surgir falsos positivos. Se sabe que existen diferencias genéticas y de composición entre espermatozoides buenos y malos congeladores (Casas et al. 2010; Yeste et al. 2011;) pudiendo ser alguna de éstas la causante de estas diferencias.

Se debe tener en cuenta también que las muestras incluían tanto espermatozoides como plasma seminal. Por tanto es posible que este método sea eficaz a la hora de discriminar los eyaculados ya que la congelabilidad del semen de porcino se cree que no viene determinada solo por un único factor (Hernández et al. 2007), sino que puede ser un conjunto de factores los que la determinen, entre los que se podría incluir la composición del plasma seminal, la composición de la membrana del espermatozoide e incluso la propia estructura del ADN del espermatozoide (Hernández et al. 2007; Casas et al. 2010; Yeste et al. 2011)

Por todo esto, se puede concluir que el ChemSensor es una posible herramienta para discriminar los eyaculados de cerdo por su congelabilidad, pero sería necesario aumentar el número de muestras analizadas para obtener un modelo matemático más eficaz, que permitiera aumentar las distancias de separación y eliminar los falsos positivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carvajal, G., Cuello, C., Ruiz, M., Vázquez, J. M., Martínez, E. A. & Roca, J. 2004. J. Androl. 25: 389-396.
- Busto, O., Martí, M. P. & Guasch J. 2002. Tecnología del vino. 5: 31-35.
- Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Fàbrega A, Rodríguez-Gil JE, & Bonet S. 2010. Theriogenology. 74: 940-950.
- Hernández, M., Roca, J., Calvete, J. J., Sanz, L., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. A., Vázquez, J. M. & Martínez, E. A. 2007. J. Andro. 28: 689-697.
- Laguerre, M., Mestres, C., Davrieux, F., Ringuet, J. & Boulanger, R. 2007. J. Agric. Food Chem. 55: 1077-1083.
- Landaud, S., Helinck, S. & Bonnarme, P. 2008. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 1191-1205.
- Radovic, B. S., Careri, M., Mangia, A., Musci, M., Gerboles, M. & Anklam, E. 2001. Food Chem. 72: 511-520.
- Roca,

J., Hernández, M., Carvajal, G., Vázquez, J.M. & Martínez, E.A. 2006. J. Anim. Sci. 84: 2692-2699. • Rodríguez-Bencomo, J. J., Ortega-Heras, M., Pérez-Margariño, S. & González-Huerta, C. 2009. J. Agric. Food Chem. 57: 6383-6391. • Thilmant, P. 1997. Ann. Med. Vet. 141: 457-462. • Thurston, L. M., Siggins, K., Mileham, A. J., Watson, P. F. & Holt, W. V. 2002. Biol. Reprod. 66: 545-554. • Thurston, L. M., Watson, P. F. & Holt, W. V. 1999. Cryobiology. 39: 335. • Westendorf, P., Richter, L., & Treu, H. 1975. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 82: 261-267. • Yeste, M., Estrada, E., Casas, I., Bonet, S., & Rodríguez-Gil, J.E. 2013. Theriogenology. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.01.008.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto PEP 2006/1273 del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León).

Tabla 1. Clasificación por clusters de los eyaculados de verraco en dos grupos (buenos y malos congeladores), según el porcentaje de espermatozoides vivos (% VT) y móviles totales (% MT) tras la descongelación.

Variable	Grupo de congelabilidad		EEM ¹
	Buenos (N=20)	Malos (N=13)	
% VT	57,8 ^a	42,1 ^b	1,32
% MT	50,3 ^a	28,5 ^b	1,42

^{a, b}: indican diferencias significativas entre grupos de congelación ($P < 0,05$).

¹EEM: Error estándar de la media.

Tabla 2. Clasificación predicha por el modelo y distancias de separación entre los grupos de congelabilidad

Grupo	Clasificación predicha			Distancias	
	Buenos predichos	Malos predichos	No Clasificados	Buenos	Malos
Buenos	20	0	0	0	2,62
Malos	1	12	0	2,62	0

EVALUATION OF THE CHEMSENSOR AS A TOOL FOR EARLY DISCRIMINATION OF IBERIAN PIG EJACULATES ACCORDING TO THEIR FREEZABILITY

ABSTRACT: Prior knowledge of whether an ejaculate of boar will freeze well or not is fundamental to the use of sperm cryopreservation at commercial level. The objective of this work was to evaluate the ability of the ChemSensor (a gas chromatograph with a mass spectrometry detector and chemometric software used routinely to classify samples) as a tool of discrimination of ejaculates depending on their freezability. The results obtained show that the ChemSensor is capable of differentiating two groups of freezability. Due to the distances of separation obtained and a possible false positive, in the future it would be required to analyze a greater number of samples to obtain a more effective mathematical model.

Keywords: boar sperm, freezability, gas-mass chromatography.