

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON HARINA DE LINAZA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN VERRACOS PIETRAIN RESISTENTES O PORTADORES DEL GEN HALOTANO

Effect of linseed supplementation on sperm quality in halothane gene resistant and carriers pietrain boars

*Esther García-Hernández, Beatriz Serrano-Pérez y Javier Álvarez-Rodríguez**

Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Lleida. Av. Rovira Roure 191. E-25198 Lleida. España (jalvarez@ca.udl.cat) Autor responsable.*

RESUMEN

En la actualidad se siguen utilizando líneas genéticas paternas portadoras del gen halotano debido a que permiten incrementar el valor de las canales. La aptitud reproductiva de estos verracos podría modularse mediante la suplementación con alimentos ricos en ácidos grasos poliinsaturados n-3. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto la suplementación de harina de linaza sobre la calidad espermática en verracos Pietrain resistentes o portadores gen halotano; se utilizaron 78 verracos, teniendo en cuenta su edad y genotipo. De ellos, se analizaron 2332 muestras seminales donde se evaluó el volumen de eyaculado, la concentración espermática, la motilidad, las gotas proximales, y en una sub-muestra de 93 dosis seminales se analizó la resistencia osmótica de la membrana (Ort), el test de endosmosis (Host) y la fragmentación de ADN (Túnel). También se analizó la concentración de testosterona y metabolitos sanguíneos (urea, creatinina y triglicéridos) de los verracos. Se observó que la inclusión de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en la dieta de los verracos redujo el porcentaje de gotas proximales en el espermatozoide, especialmente en los verracos portadores del gen halotano, y se mostró una tendencia a reducir la resistencia de la membrana acrosomal (Ort) y a mejorar la integridad y funcionalidad de la membrana del espermatozoide (Host), aunque no afectó a la fragmentación del ADN espermático. Además, la suplementación con linaza mejoró la concentración de testosterona sanguínea en los verracos jóvenes.

Palabras clave: Ácidos grasos poliinsaturados n-3; contrastación seminal; gen del receptor de rianodina; linaza.

ABSTRACT

Genetic lines carrying the halothane gene are still being used because they allow increasing the economic revenue of progeny carcasses. The reproductive capacity of boars could be modulated by supplementing with feed rich in n-3 polyunsaturated fatty acids. This study aimed at evaluating the effect of including top-dressed linseed expeller on the seminal quality of halothane gene free Pietrain boars (NN) and carriers (Nn). Seventy-eight boars balanced by age and genotype were used. Of these, 2332 seminal samples were analyzed for ejaculate volume, sperm concentration, motility, and proximal cytoplasmic droplets. A sub-sample of 93 seminal doses was analyzed for osmotic membrane resistance (Ort), endosmosis test (Host) and DNA fragmentation (Tunnel). The concentration of testosterone and blood metabolites (urea, creatinine and triglycerides) of the boars was also analyzed. It was observed that the inclusion of linseed expeller increased the motile sperm (71.3 vs. 73.2%, $P<0.05$) and reduced the percentage of proximal cytoplasmic spermatozoa (2.87 vs 1.57%, $P<0.05$). Linseed supplementation increased sperm membrane integrity (Host) (72.69 vs. 77.78%, $P<0.05$), and there was a tendency to reduce sperm membrane resistance (Ort) (87.82 vs 83.91%, $P=0.08$), without affecting the sperm DNA fragmentation. In addition, linseed supplementation increased circulating testosterone (5.9 vs. 17.5 ng/mL, $P<0.05$). Modifying dietary fat composition of boars reduced the seminal proximal droplets especially in halothane gene carriers, but it did not affect sperm DNA fragmentation.

Key Words: n-3 polyunsaturated fatty acids; sperm assessment; Rianodine receptor gene; Testosterone; Linseed expeller.

INTRODUCCIÓN

El verraco (*Sus scrofa domestica*) tiene una gran influencia sobre la difusión de la mejora genética en el ganado porcino. Desde hace años, se conocen los efectos desfavorables de la utilización de machos finalizadores portadores del alelo recesivo (n) gen halotano o gen del receptor de rianodina (RYR1) [9, 10]. Estos efectos incluyen sensibilidad al estrés, hipertrofia y alteración en el metabolismo de las fibras musculares que provocan carnes pálidas, blandas y exudativas (PSE) [12]. Sin embargo, el alelo recesivo de este gen (n) también presenta algunas ventajas, como son el mayor rendimiento de las canales y mayor porcentaje de magro que los cerdos no portadores (N) [25]. Por este motivo, la mayoría de empresas porcinas siguen utilizando líneas genéticas paternas portadoras del gen halotano ya que incrementan el valor económico de las canales. Es posible que, además de los efectos sobre la calidad de la carne, el locus RYR1 afecte a otros parámetros como la aptitud reproductiva de los verracos [13].

En la actualidad, es reconocido el papel de dos grupos de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) esenciales, que no pueden ser sintetizados por el organismo y deben ser ingeridos a través de la dieta [11, 24]. Por un lado, los omega-6 (n-6), representados principalmente por los ácidos linoleico (C18:2 n-6) y araquidónico (C20:4 n-6), y por otro, los omega-3 (n-3), representados principalmente por los ácidos linoléico (C18:3 n-3), eicosapentanoico (EPA, C20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3). Las recomendaciones actuales de ácidos grasos en piensos de verracos consideran únicamente la inclusión de un 0,7% de C18:2 n-6 [8], con el objetivo de mejorar el aspecto de la piel y el pelo. Sin embargo, no especifican la proporción de AGPI n-3 ni la relación n-6/n-3 que resultaría recomendable dada su implicación en fenómenos de inmunidad, reproducción y formación de los lípidos de las membranas celulares [15, 17]. En general, los piensos comerciales de verraco presentan una relación n-6/n-3 de entre 10 y 25, lo que podría comprometer ciertas funciones reproductivas en las que es necesario un mayor aporte de AGPI n-3.

En este contexto, la suplementación con una fuente de ácidos grasos poliinsaturados AGPI omega-3, como la harina de linaza (*Linum usitatissimum*) (HL), podría modular la aptitud reproductiva de verracos sometidos a elevados ritmos productivos en los centros de inseminación artificial, especialmente en aquellos animales que son, además, portadores del gen halotano. La linaza es un producto resultante del proceso de extracción del aceite de lino (*Linum usitatissimum*) (solvente y presión), escasamente utilizado en España. Los principales países productores son, en este orden, Canadá, China e India [5]. Su consumo está aumentando en los países desarrollados como

fuentes de ácidos grasos poliinsaturados AGPI omega-3 (ácido alfa-linolénico), debido a los posibles efectos beneficiosos sobre la salud humana y animal [6, 21]. La fracción grasa de la linaza es altamente insaturada (un 85% de ácidos grasos insaturados C18), con alto contenido en ácido alfa-linolénico (51%) respecto a otras oleaginosas [7].

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de harina de linaza (HL) (ingrediente rico en ácidos grasos poli insaturados AGPI omega 3) sobre la calidad espermática en verracos Pietrain resistentes (NN) o portadores (Nn) gen halotano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

El estudio se realizó en las instalaciones del centro de inseminación de Premier Pigs (Alós de Balaguer, Lleida, España) entre octubre 2014 y abril 2015. Se utilizaron un total de 78 verracos, alojados en corrales individuales con cama de serrín y ambiente controlado (15-22°C). La población del estudio estuvo constituida por verracos de raza Pietrain heterocigotos del gen halotano (Nn) (n=27) y verracos resistentes (NN) (n=51). La edad de los animales también fue un factor a tener en cuenta y se clasificaron por jóvenes los que tenían una igual o inferior a 2 años al inicio del estudio (n=40; 1,57 ± 0,29 años), mientras que los adultos tenían más de 2 años (n=38; 2,41 ± 0,24 años).

Los verracos recibieron la misma dieta durante los 2 primeros meses (mes) del estudio, y a continuación se formularon dos dietas a partir de un pienso de verracos (control, n=46) y un pienso de verracos (3 kg/día (d) para adultos y 2,5 kg/día para jóvenes) suplementado con 200 g/d de harina de linaza sobre el comedero de pienso (tratamiento, n= 32). Los grupos se equilibraron teniendo en cuenta el genotipo y la edad de los verracos. El nivel de suplementación de (HL) se diseñó para proveer una relación en la dieta entre ácidos grasos poli-insaturados (AGPI) n-6 / AGPI n-3 de 10 en el grupo control y 8 en el grupo tratamiento, respectivamente. En la (TABLA I) se muestran los nutrientes calculados y analizados del pienso de verracos y el suplemento de harina de linaza. Los análisis se realizaron sobre muestras mensuales del pienso y la (HL) utilizadas en el experimento.

TABLA I
ENERGÍA METABOLIZABLE (EM), NUTRIENTES CALCULADOS¹ Y ANALIZADOS EN EL PIENSO DE VERRACOS Y EL SUPLEMENTO DE HARINA DE LINAZA (% DEL ALIMENTO, A MENOS QUE SE INDIQUE LO CONTRARIO)

	Pienso	Harina de linaza
EM (kcal/kg)	3107	2970
Materia seca	89,4	91,0
Cenizas	5,9	5,6
Proteína bruta	16,6	31,5
Extracto etéreo	6,7	7,6
Fibra bruta	5,1	9,9
Fibra neutro-detergente	16,6	23,2
Ácidos grasos saturados	1,62	0,66
Ácidos grasos monoinsaturados	2,01	1,2
Ácidos grasos poliinsaturados n-6 (AGPI n-6)	2,05	0,74
Ácidos grasos poliinsaturados n-3 (AGPI n-3)	0,20	2,91
Lisina total	0,84	1,18
Nutrientes analizados		
Cenizas (%)	6,2	5,9
Proteína bruta (%)	17,3	32,4
Extracto etéreo (%)	6,9	8,8
Fibra bruta (%)	3,5	7,8
Fibra neutro-detergente (%)	15,8	29,6
Fibra ácido-detergente (%)	5,6	11,8
Ácidos grasos saturados (% del total de AG) ²	22,2	8,7
Ácidos grasos mono-insaturados (% del total de AG)	32,7	18,6
Ácidos grasos poli-insaturados n-6 (% del total de AG)	40,7	17,9
Ácidos grasos poli-insaturados n-3 (% del total de AG)	4,3	54,8
AGPI n-6 / AGPI n-3	9,4	0,3

¹ Composición calculada en base al porcentaje de inclusión de cada ingrediente y su valor nutritivo según FEDNA (2010-2015). Los ingredientes del pienso de verracos (proporción de inclusión en orden decreciente) fueron: Maíz (21,9%), salvado de trigo (17,7%), cebada (15,0%), trigo (15,0%), soja integral extrusionada (8,0%), harina de soja 46,5%PB (6,2%), pulpa de remolacha (5,0%), hidrolizado de mucosa intestinal (Palbio 50RD) (4,0%), grasa mezcla 3-5° (2,9%), CaHPO₄ (1,4%), CaCO₃ (1,0%), Corrector vitamínico-mineral (Norpig verracos 1%, Tecnovit, Alforja, Tarragona, Spain) (1,0%), NaCl (0,3%), NaHCO₃ (0,2%), DL-metionina 99% (0,2%), Mycofix plus® (Biomín Holding GmbH, Herzogenburg, Austria) (0,2%), L-lisina 50%PB (0,1%). ² Se calculó la proporción de ácidos grasos saturados (C10:0; C12:0; C14:0; C16:0; C17:0; C18:0; y C20:0) monosaturados (C16:1n-7; C17:1n-7; C18:1n-9; and C20:1n-9) y poliinsaturados (AGPI) (C18:2n-6; C18:3n-3; C20:2n-6; C20:3n-6; C20:4n-6; C20:4n-6 y C22:6n-3).

Evaluación de la calidad seminal

Se recogieron los eyaculados de los verracos entre 1 y 3 veces por semana (sem) en los 6 (mes) de estudio, muestreando un total de 2332 eyaculados. Se recogieron 817 eyaculados de verracos a los que únicamente se les había realizado una extracción semanal, 1442 eyaculados de verracos a los que se les realizaron 2 extracciones por (sem), y 73 eyaculados de verracos con 3 extracciones a la (sem). El número de extracciones por semana se equilibró homogéneamente entre verracos con diferente genotipo, dieta y edad.

Se analizaron 1574 muestras de semen de verracos resistentes al gen halotano (NN) (n=703, grupo control; n=871, grupo tratamiento) y 759 muestras de semen de verracos heterocigotos (Nn) (n=332, grupo control; n=427, grupo

tratamiento). Las muestras se distribuyeron en 1364 eyaculados de verracos adultos (n=709, grupo control; n=655, grupo tratamiento) y 971 muestras de verracos jóvenes (n=328, grupo control; n=643, grupo tratamiento).

Se evaluó en todos los eyaculados su volumen, que se midió con probeta, después de extraer la fracción pre-espermática. A continuación, se tomó una muestra de 1 mL de semen para determinar la concentración de espermatozoides (número de espermatozoides por mL) con la cámara de Neubauer (Paul Marienfeld, GmbH & Co., Lauda-Koenigshofen, Alemania). Se analizaron en todas las muestras seminales el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos y el porcentaje de gotas proximales mediante un sistema automatizado CASA (ISASPSUS; Proiser, Valencia, España).

El sistema de análisis de espermatozoides asistido por ordenador funciona a 25 fotogramas de vídeo por segundo (25 Hz), con la configuración de zona de partícula = de 10 a 80 μm y radio de búsqueda = 11 μm . Los espermatozoides se definieron como no móviles si su velocidad sobre la trayectoria promedio fue inferior a 10 $\mu\text{m}/\text{s}$. Se consideraron espermatozoides con motilidad progresiva si presentaban una velocidad de trayectoria media > 45 $\mu\text{m}/\text{s}$ y un índice de linealidad $\geq 45\%$.

Adicionalmente, en un total de 93 muestras de dosis seminales (58 del grupo control y 35 del grupo experimental) procedentes de 45 verracos del estudio, se realizaron las pruebas de resistencia osmótica (ORT) y de endosmosis (HOST), así como el análisis de la fragmentación del DNA espermático en un laboratorio externo al Centro de Inseminación Artificial, entre el tercer y cuarto mes del estudio. Las dosis seminales (3×10^9 espermatozoides en 80 mL) se prepararon con el diluyente de larga duración Vitasem® (Magapor, Ejea de los Caballeros, España), y se conservaron a $17,2 \pm 1,9^\circ\text{C}$ en neveras portátiles durante su transporte y durante su conservación en el laboratorio. Se comprobó el pH (Model GLP 22, Crison, Barcelona, España) de las dosis seminales antes de proceder a su análisis ($\text{pH}=7,22 \pm 0,07$) a las 24-48 hora (h) después de la recogida del eyaculado. Para prevenir posible contaminación, se lavó el electrodo de pH antes y después de cada medida con una solución 0,1 M de PBS ($\text{pH}= 7,0$).

A continuación, se evaluó la resistencia de la membrana acrosomal (test de resistencia osmótica, ORT) después de la incubación seminal (50 mL) en un medio hiposmótico (0,45 mL con 75 mOsm a 37°C durante 15 minutos (min)). Posteriormente, se procedió a fijar la muestra con glutaraldehído, se tñió con eosina-nigrosina y se comprobó el porcentaje de acrosomas resistentes mediante un microscopio de contraste de fases (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments, Barcelona, España) con objetivo de 1000X y aceite de inmersión.

Así mismo, se realizó un test de endosmosis (HOST) para evaluar la integridad funcional de la membrana de los espermatozoides, que a su vez refleja la viabilidad de los mismos [23], siguiendo el protocolo original [14], pero utilizando una menor presión osmótica (75 vs. 150 mOsm/kg) y un período más corto de tiempo (15 vs. 120 min) [19]. Tras fijar la muestra con glutaraldehído, se realizó el recuento de espermatozoides con enrollamiento final de la cola por entrada de agua intersticial (mínimo de 200 espermatozoides en, al menos, cinco campos de visión diferentes) con un microscopio de contraste de fases (1000 x a 37°C). A mayor porcentaje de espermatozoides con cola enrollada, mayor será la calidad de la muestra. Aquellos espermatozoides que no presentan enrollamiento se clasifican como negativos al test.

Finalmente, se evaluó la fragmentación del ADN del espermatozoide como indicador de daño endógeno en el mismo mediante la técnica de TUNEL (marcado del extremo libre por dUTP mediante la desoxittransferasa terminal, o *Terminal dUTP Nick-End Labeling*).

Las muestras seminales (3×10^9 espermatozoides/mL) se diluyeron con una solución tampón fosfato salina (*Phosphate buffered saline*, PBS) hasta una concentración de 4×10^7 espermatozoides/mL, y se fijaron con una solución de fijación (PBS al 4% de paraformaldehído) y se incuban las muestras durante 60 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugan a 600 x g y se lavan 2 veces con PBS durante 10 min por lavado. A continuación, se las células se resuspendieron en 100 μL de solución de permeabilización (0,1% tritón, 0,1% citrato sódico) durante 2 min a 4°C (BSH Electrodomésticos, Zaragoza, España) y se vuelven a centrifugar (600 x g) y lavar dos veces con PBS durante 10 min por lavado. Se realizó la preparación con la mezcla de reacción de TUNEL (solución de marcaje y enzimática), de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics-Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Con el filtro de fluorescencia (Nikon Model LH-M100C-1, Nikon Instruments, Barcelona, España) del mismo microscopio descrito anteriormente (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments, Barcelona, España) (1000 X), se calculó el porcentaje de espermatozoides teñidos (con fluorescencia verde) sobre el total de espermatozoides contados (mínimo 200). Primero, utilizando luz visible se visualizaron y contaron las células en un campo y después se observaron las mismas células utilizando un filtro verde (B-2A: 450-490 nm de excitación).

Concentración sanguínea de testosterona y metabolitos

Entre el segundo y tercer mes después del inicio tratamiento, se tomaron semanalmente 13 muestras de sangre (10 mL) (BD Vacutainer, Becton-Dickinson and Company, Plymouth, Gran Bretaña) de la parte lateral de la extremidad posterior de verracos antes de la oferta de pienso diaria (08:00 h), para analizar su concentración sérica de testosterona por quimioluminiscencia (Immulate®, Siemens, California, EUA), y urea, creatinina y triglicéridos por método enzimático-colorimétrico (Beckmancoulter®). El número total de muestras de sangre de verracos se equilibró por grupos experimentales: control (n=29) y tratamiento (n=22); genotipo NN (n=33) y genotipo Nn (n=18); adultos (n=35) y jóvenes (n=16).

Análisis estadístico

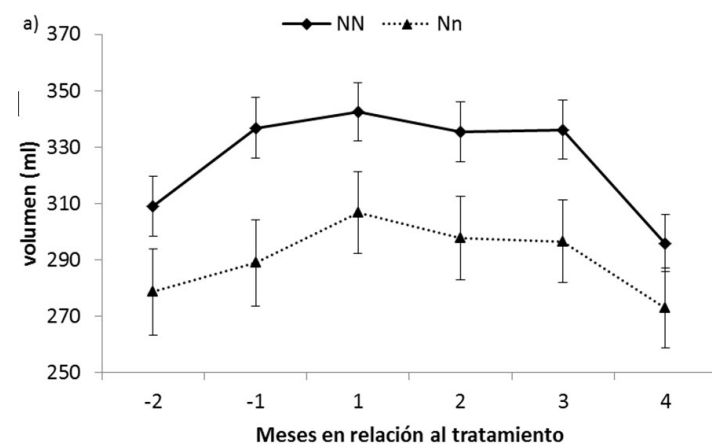
Se comprobó la normalidad de todas las variables antes de aplicar los análisis de varianza. En los casos en que la distribución de los datos de algunas no permitía su análisis preciso se aplicó una transformación de las mismas a logaritmo. En el caso de los parámetros de contrastación seminal clásica, todas las variables excepto el volumen de eyaculado se transformaron a logaritmo (concentración de espermatozoides, espermatozoides móviles normales (que no tienen anomalías de cola), espermatozoides con gotas proximales). Los datos se evaluaron por análisis de varianza con un modelo mixto con el programa JMP® Pro 11.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), cuyos efectos fijos fueron el suplemento de linaza (control vs. tratamiento), la edad (jóvenes vs. adultos), y el gen halotano (NN vs. Nn), el mes (-2, -1, 0, 1, 2, 3, 4), la frecuencia de extracción de semen (1 vs. 2 vs. 3 veces/

sen). Las interacciones dobles evaluadas fueron: suplemento x mes, suplemento x edad, suplemento x genotipo, genotipo x edad, genotipo x mes y edad x mes. El verraco se incluyó como efecto aleatorio para reducir la varianza residual del modelo.

En el caso de los parámetros ORT, HOST y fragmentación de ADN (Túnel), únicamente se transformó a logaritmo los datos de esta última. Los resultados de estas variables se evaluaron por análisis de varianza con un modelo mixto, cuyos efectos fijos fueron el suplemento de linaza (control vs. tratamiento), la edad (jóvenes vs. adultos), y el gen halotano (NN vs. Nn), así como las interacciones dobles entre dichos efectos. El verraco se incluyó como efecto aleatorio para reducir la varianza residual del modelo.

Se transformaron a logaritmo los resultados de testosterona sanguínea para alcanzar una distribución normal de los datos, sin que fuera necesario realizar para los resultados de metabolitos sanguíneos.

Los resultados de estas variables se evaluaron por análisis de varianza con un modelo mixto, cuyos efectos fijos fueron el suplemento de linaza (control vs. tratamiento), la edad (jóvenes vs. adultos), y el gen halotano (NN vs. Nn), además de las interacciones dobles entre dichos efectos. El verraco se incluyó como efecto aleatorio para reducir la varianza residual del modelo.



En todos los modelos estadísticos, los resultados se muestran como medias de mínimos cuadrados \pm error estándar. Las medias de mínimos cuadrados logarítmicas se transformaron nuevamente a su escala original para su exposición en las Tablas y Figuras de resultados. El nivel de significación de los efectos (valor P) fue de 0,05 y hasta 0,10 se consideraron como tendencias. La separación de medias se realizó con un test de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Volumen, concentración, motilidad y espermatozoides con gotas proximales

Los verracos NN mostraron un volumen de eyaculado promedio superior a los Nn durante los 6 meses de estudio ($325,9 \pm 9,8$ vs. $290,3 \pm 13$ mL/d, en NN y Nn, respectivamente; $P < 0,05$). Esta diferencia afectó, a su vez, a la concentración de espermatozoides, que fue inferior en NN que en Nn ($2,30 \pm 0,02$ vs. $2,38 \pm 0,03$ log espermatozoides/mL, que se corresponden con $199,5$ vs. $239,9$ espermatozoides/mL, respectivamente; $P < 0,05$). La evolución temporal del volumen de eyaculado no difirió significativamente entre genotipos (FIG. 1a).

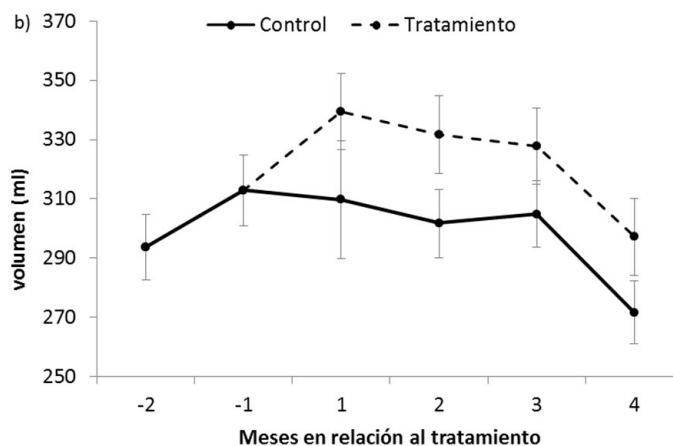


FIGURA 1. (A) EVOLUCIÓN DEL VOLUMEN DE EYACULADO EN FUNCIÓN GENOTIPO (NN VS. Nn) (B) Y DEL TRATAMIENTO (CONTROL VS. SUPLEMENTO DE LINAZA).

La evolución del volumen medio de eyaculado no difirió significativamente entre tratamientos. Sin embargo, la respuesta del tratamiento fue dependiente de la edad del verraco. En los verracos adultos no hubo diferencias de volumen de eyaculado al suplementar con (HL) ($324,5 \pm 18,0$ mL/d; $P > 0,05$); mientras que los verracos jóvenes suplementados mostraron un mayor volumen de eyaculado que los control ($261,3 \pm 14,0$ mL/d vs. $322,0 \pm 14,5$ mL/d, en control y tratamiento, respectivamente, $P < 0,05$) (FIG. 1b). De forma paralela, la concentración de espermatozoides no difirió en los verracos adultos al suplementar con linaza ($2,35 \pm 0,03$ espermatozoides/mL, que se corresponden $223,9$ espermatozoides/mL) pero se redujo en los verracos jóvenes ($2,40 \pm 0,02$ vs. $2,25 \pm 0,02$ espermatozoides/

mL, que se corresponden con $251,2$ vs. $177,8$ espermatozoides/mL, respectivamente; $P < 0,05$). No obstante, existen estudios que han observado una mejora más concluyente de la producción de espermatozoides por eyaculado al suplementar la ración basal ($2,2$ kg pienso/día) con $0,3$ kg de un suplemento rico en AGPI n-3 (31%) durante un período de 16 sem [4].

La evolución de los espermatozoides móviles progresivos fue diferente entre verracos NN y Nn (FIG. 2a). La motilidad de espermatozoides de los animales NN mejoró durante el estudio respecto a los animales Nn, aunque no se observaron diferencias entre genotipos a partir del segundo mes de experimento (FIG. 2a).

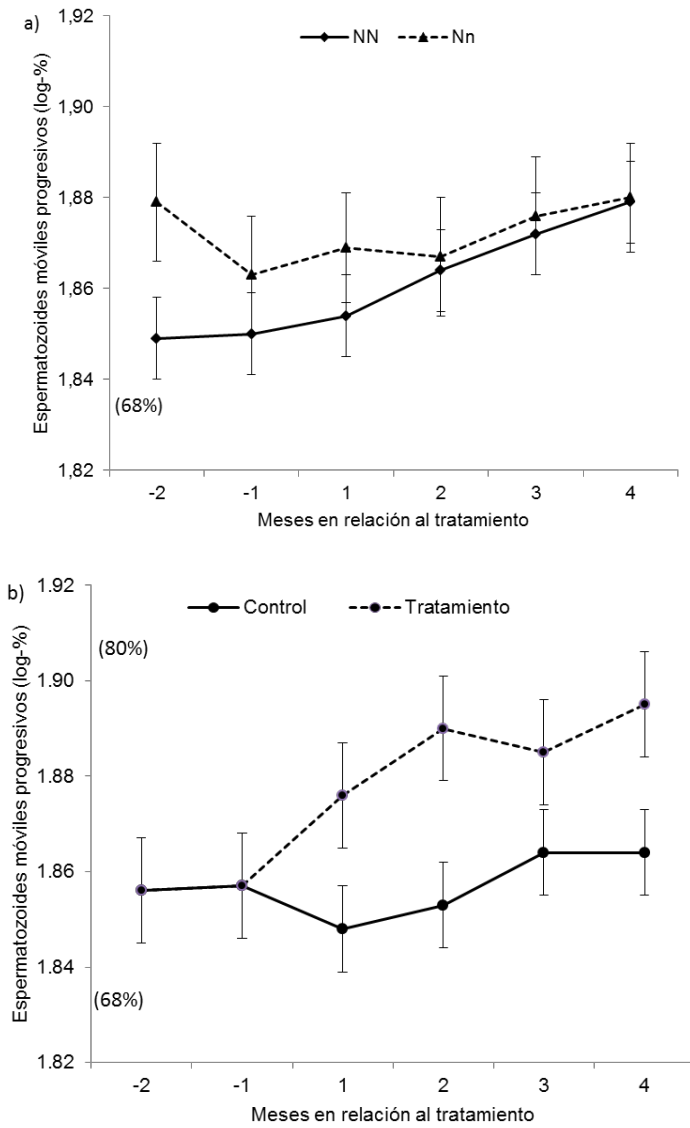


FIGURA 2. EVOLUCIÓN DEL PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MÓVILES EN FUNCIÓN GENOTIPO (NN VS. NN) (A) Y DEL TRATAMIENTO (CONTROL VS. SUPLEMENTO DE LINAZA) (B) (RESULTADOS EN LOGARITMO Y SU VALOR TRANSFORMADO ENTRE PARÉNTESIS AL LADO DEL EJE Y).

El suplemento de linaza incrementó el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos en el período de estudio (1,85 vs. 1,88 ± 0,01; P<0,05, que se corresponden a 71,3 vs 73,2% de espermatozoides móviles progresivos). En el grupo control la motilidad espermática progresiva no varió a lo largo del experimento (P>0,05); mientras que en el grupo de tratamiento esta incrementó especialmente a partir del mes 2 de estudio (FIG. 2b). Estos resultados concuerdan con lo observado por Urban y col. [26] en verracos Large-White y Landrace y por Luc y col. [18] en verracos Pietrain resistentes (NN) y portadores del gen halotano (Nn). En dichos trabajos, los animales no portadores (NN) presentaron un volumen seminal y una motilidad progresiva

de espermatozoides superior a los portadores (Nn).

En el genotipo NN, el suplemento de linaza no afectó al porcentaje medio de gotas proximales de los eyaculados (0,298 vs. 0,225 ± 0,04, P>0,05; que se corresponden a 1,98 vs 1,68% de gotas proximales, en control y tratamiento, respectivamente). En los verracos del genotipo Nn, el suplemento de linaza redujo esta morfoanomalía (0,459 vs. 0,196 ± 0,02, P<0,05; que se corresponden a 2,87 vs 1,57% de gotas proximales, respectivamente). Las diferencias entre genotipos (FIG. 3a) y tratamientos (FIG. 3b) persistieron a lo largo del estudio.

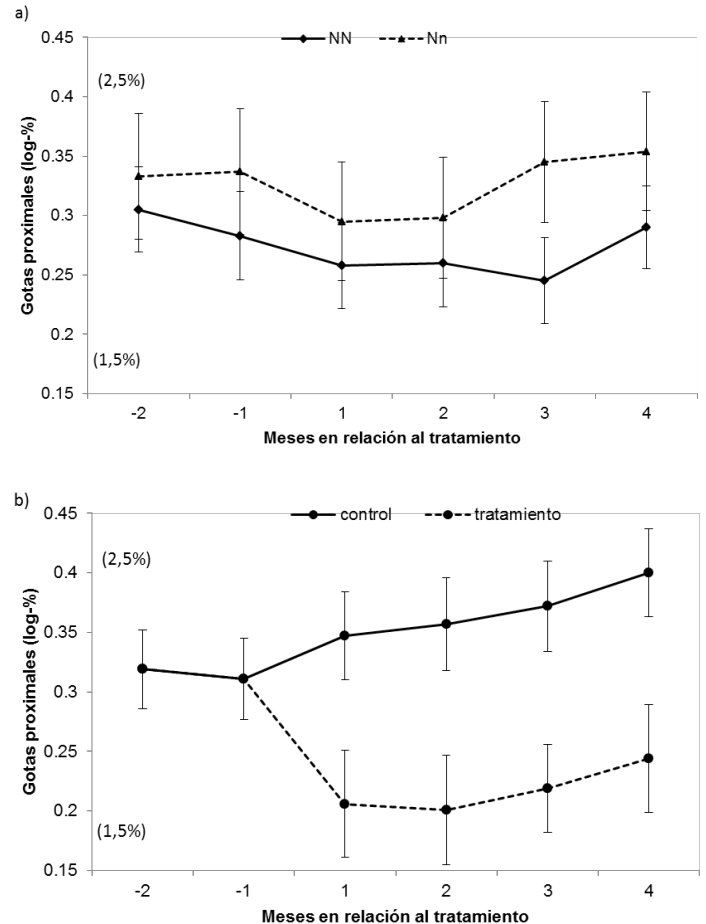


FIGURA 3. (A) EVOLUCIÓN DEL PORCENTAJE DE GOTAS PROXIMALES EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO (NN VS. NN) Y (B) DEL TRATAMIENTO (CONTROL VS. SUPLEMENTO DE LINAZA) (RESULTADOS EN LOGARITMO Y SU VALOR TRANSFORMADO ENTRE PARÉNTESIS AL LADO DEL EJE Y).

La inclusión (15%) de un suplemento rico en AGPI n-3 (57% AGPI n-3) durante 8 sem se tradujo en una disminución de las anomalías morfológicas espermáticas y en una mejora de la motilidad y viabilidad durante períodos de refrigeración de 5-7 d [22]. Por su parte, Yeste y col. [27] al suplementar la ración basal (2,2 kg pienso/d) con 0,3 kg de aceite de pescado (30% de AGPI n-3), en comparación con la misma cantidad (0,3 kg/d) en forma de maíz, durante 26 sem, observaron una reducción del grado de inmadurez y una mejora de la integridad del acrosoma (Ort)

de los espermatozoides en los verracos Large-White y Pietrain pero no en los verracos Duroc, lo que los autores atribuyeron a diferencias en la composición de la membrana plasmática del espermatozoide entre genotipos. En hombres con problemas de fertilidad, el elevado consumo de grasa omega-3 también se ha relacionado con un menor porcentaje de espermatozoides con formas anormales [1].

Test de resistencia osmótica (Ort), test de endosmosis (Host) y fragmentación de ADN (Túnel)

En la (TABLA II) se muestran los resultados de test de resistencia osmótica (Ort), test de endosmosis (Host) y fragmentación de ADN (Túnel) y en función del genotipo, tratamiento, y grupo de edad.

TABLA II
TEST DE RESISTENCIA OSMÓTICA (ORT), TEST DE ENDOSMOSIS (HOST) Y FRAGMENTACIÓN DE ADN (TÚNEL) EN FUNCIÓN DEL TRATAMIENTO, GENOTIPO Y GRUPO DE EDAD (RESULTADOS EN LOGARITMO Y VALOR TRANSFORMADO ENTRE PARÉNTESIS)

	Ort (%)	Host (%)	Túnel (%)
Genotipo			
NN	85,0 ± 1,16	74,97 ± 1,14	0,41 ± 0,03 (2,59)
Nn	86,73 ± 2,7	75,50 ± 2,91	0,37 ± 0,08 (2,34)
Suplemento linaza			
Control	87,82 ± 1,4b	72,69 ± 1,49a	0,39 ± 0,03 (2,45)
Tratamiento	83,91 ± 2,2a	77,78 ± 2,43b	0,39 ± 0,07 (2,45)
Grupo de edad ¹			
Adulto	85,34 ± 2,7	77,83 ± 2,91	0,32 ± 0,08 (2,09)
Joven	86,39 ± 1,25	72,64 ± 1,32	0,46 ± 0,03 (2,88)
Nivel de significación (valor <i>P</i>) de los efectos ¹			
Genotipo	0,55	0,87	0,65
Suplemento linaza	0,08	0,06	0,97
Edad	0,73	0,12	0,14

¹ NS=*P*>0,10. Letra distinta en la misma columna y efecto indica diferencias (*P*<0,10). Las interacciones genotipo x edad, y suplemento x edad resultaron no significativas (*P*>0,10). En la fragmentación por la técnica de Túnel, los resultados se muestran en logaritmo y su valor transformado entre paréntesis.

El genotipo no afectó a los resultados de test de resistencia osmótica (Ort), test de endosmosis (Host) ni a la fragmentación de ADN (Túnel). En este sentido, se ha descrito un retraso o prevención parcial de la fragmentación de ADN espermático con la utilización de diluyentes para la fabricación de dosis seminales [20], lo que podría haber atenuado las diferencias en estos parámetros entre genotipos.

El suplemento de linaza mostró una tendencia de reducción de la resistencia de la membrana acrosomal (Ort), así como una tendencia de mejora de la integridad y funcionalidad de la membrana del espermatozoide (Host). Sin embargo, no afectó significativamente a la fragmentación de ADN espermático (Túnel). Estos resultados concordarían con el experimento de Castellano y col. [2], donde la suplementación con aceite de pescado (40% de AGPI n-3, a dosis de 60 gramos (g)/d) durante 6-7 mes, mostró

un efecto débil sobre la mejora de la integridad del acrosoma y la reducción de la fragmentación del ADN espermático de dosis seminales refrigeradas y fue incapaz de mejorar la calidad seminal durante la criopreservación del semen porcino. Por su parte, la edad de los verracos no afectó significativamente a estos parámetros (*P*>0,10), aunque numéricamente se observa una tendencia a una menor integridad acrosomal (*P*=0,12) y a una mayor fragmentación del ADN espermático (*P*=0,14) en verracos jóvenes que en adultos, lo que evidenciaría el menor rendimiento de los mismos durante los primeros meses de estancia en los centros de inseminación artificial.

Concentración sanguínea de testosterona y metabolitos

En la (TABLA III) se muestra la concentración de testosterona, urea, creatinina y triglicéridos sanguíneos en los verracos durante el experimento.

TABLA III
CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA, UREA, CREATININA Y TRIGLICÉRIDOS SANGUÍNEOS EN FUNCIÓN DEL GENOTIPO (NN VS. NN), DEL TRATAMIENTO (CONTROL VS. SUPLEMENTO DE LINAZA) Y LA EDAD (ADULTOS VS. JÓVENES)

	Log-Testosterona (ng/mL)	Urea (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)
Genotipo ¹				
NN	0,93 ± 0,08 (8,5)	29,2 ± 1,28	2,62 ± 0,06	23,88 ± 1,37
Nn	0,79 ± 0,10 (6,1)	29,35 ± 1,55	2,57 ± 0,07	21,69 ± 1,65
Suplemento linaza				
Control	0,77 ± 0,10a (5,9)	28,39 ± 1,01	2,68 ± 0,07	24,13 ± 1,78
Tratamiento	1,24 ± 0,12b (17,5)	30,17 ± 1,03	2,77 ± 0,09	25,34 ± 2,14
Edad				
Joven	1,15 ± 0,13b (14,0)	27,67 ± 1,52a	2,63 ± 0,09a	25,18 ± 2,26
Adulto	0,87 ± 0,09a (7,4)	30,88 ± 1,23b	2,82 ± 0,07b	24,29 ± 1,62
Nivel de significación (valor P) de los efectos ¹				
Genotipo	0,63	0,91	NS	0,32
Suplemento	<0,001	0,56	NS	0,59
Edad	0,34	0,29	0,04	0,67

¹ NS=P>0,10. Letra distinta en la misma columna y efecto indica diferencias (P<0,05). En la concentración de testosterona circulante, los resultados se muestran en logaritmo y su valor transformado entre paréntesis.

El suplemento de linaza afectó a la concentración de testosterona, siendo además esta respuesta dependiente de la edad, de forma que el suplemento de linaza afectó positivamente a la concentración de testosterona en los verracos jóvenes (0,55 ± 0,13 vs 1,46 ± 0,15; que se corresponden con 3,5 ng/mL y 28,8 ng/mL en control y tratamiento, respectivamente) pero no en los adultos (0,75 ± 0,10, P>0,05; que se corresponden con 5,6 ng/mL). En verracos, la suplementación con aceite de pescado a largo plazo (7 mes) modifica la composición de los ácidos grasos y la producción de hormonas esteroideas en el testículo [3], confirmando el incremento del nivel de testosterona circulante en sangre. Se ha observado además que existe una estrecha relación entre el nivel de n-6/n-3 de la dieta y el incremento significativo de la concentración sanguínea de testosterona y prostaglandinas) cuando la relación AGPI n-6/n-3 en la dieta es próxima a 1 [16]. Sin embargo, esta relación obligaría a suplementar la dieta con un nivel de linaza mucho más elevado que el analizado en este experimento.

Además, en los verracos NN, la concentración de urea sanguínea (como indicador del catabolismo de aminoácidos dietarios o corporales) fue superior en los verracos adultos que en los jóvenes (32,4 ± 1,0 vs. 26,0 ± 1,6 mg/dL, P<0,05), mientras que esta diferencia no se observó en los verracos Nn (promedio 29,4 ± 1,5 mg/dL, P>0,10). La edad afectó significativamente a la concentración de creatinina sanguínea (como indicador de masa muscular), que fue superior en adultos que en jóvenes (TABLA III).

CONCLUSIONES

La modificación de la composición de la grasa consumida en la dieta de los verracos mediante una suplementación con harina de extracción de linaza redujo el porcentaje de gotas proximales en el espermatozoide, especialmente en los verracos portadores del gen halotano, y mostró una tendencia para reducir la resistencia de la membrana acrosomal (Ort) y mejorar la integridad y funcionalidad de la membrana del espermatozoide (Host), aunque no afectó a la fragmentación del ADN espermático. Además, la suplementación con linaza mejoró la concentración de testosterona sanguínea en los verracos jóvenes.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen la colaboración de la empresa Premier Pigs S.L. y Magapor S.L. por su ayuda para el muestreo y análisis de las muestras. Proyecto financiado por CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) del Ministerio de Economía y Competitividad de España (IDI2014-1128).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATHAMAN, J.A.; TOTH, T.L.; FURTADO, J.; CAMPOS, H.; HAUSER, R.; CHAVARRO, J.E. Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Human Reprod.** 27 (5): 1466–1474. 2012.

- [2] CASTELLANO, C.A.; AUDET, L.; BAILEY, J.L.; LAFOREST, J.P.; MATTE, J.J. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17°C or cryopreserved. **Theriogenol.** 74:1482-1490. 2010.
- [3] CASTELLANO, C.A.; AUDET, I.; LAFOREST, J.P.; MATTE J.J.; SUH, M. Fish oil diets alter the phospholipid balance, fatty acid composition, and steroid hormone concentrations in testes of adult pigs. **Theriogenol.** 76(6):1134–1145. 2011.
- [4] ESTIENNE, M.J.; HARPER, A.F.; CRAWFORD, R.J. Dietary supplementation with a source of omega-3 fatty acids increases sperm number and the duration of ejaculation in boars. **Theriogenol.** 70:70-76. 2008.
- [5] FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. 2015.
- [6] FARMER, C.; GIGUÈRE, A.; LESSARD, M. Dietary supplementation with different forms of flax in late gestation and lactation: Effects on sow and litter performances, endocrinology, and immune response. **J. Anim Sci.** 88(1): 225-237. 2010.
- [7] FUNDACION ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN (FEDNA). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos, 3ª Ed. Normas FEDNA, Madrid, Spain. 502 pp. 2010.
- [8] FUNDACION ESPAÑOLA PARA EL DESARROLLO DE LA NUTRICIÓN (FEDNA). Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos, 6ª ed. Normas FEDNA, Madrid, Spain. 502 pp. 2013.
- [9] FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; DE LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILER, J.E.; O'BRIEN, P.J.; MACLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Sci.** 253:448-451. 1991.
- [10] GADE, P.B.; CHRISTENSEN, L. Effect of different stocking densities during transport on welfare and meat quality in Danish slaughter pigs. **Meat Sci.** 48:237-247. 1998.
- [11] GIVENS, D.I.; GIBBS, R.A. Current intakes of EPA and DHA in European populations and the potential of animal-derived foods to increase them. **Proc. Nutr. Soc.** 67(3):273-280. 2008.
- [12] GUÀRDIA, M.D.; ESTANY, J.; BALASCH, S., OLIVER, M.A.; GISPERT, M.; DIESTRE, A. Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs. **Meat Sci.** 67(3):471-478. 2004.
- [13] HARDGE, T.; GREGOR, G. The influence of RYR1 genotype on male fertility in pigs. **46th anual Meeting of EAAP**, Prague, 09/4-7. Czech Republic, Pp 268 . 1995.
- [14] JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VENN, H.H.; PDREZ-PELHEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **J. Reprod. Fertil.** 70:219-228. 1984.
- [15] LANGERHUUS, S.N.; TØNNESEN, E.K.; JENSEN, K.H.; DAMGAARD, B.M.; HALEKOH, U.; LAURIDSEN, C. Effects of dietary n-3 and n-6 fatty acids on clinical outcome in a porcine model on post-operative infection. **Br. J. Nutr.** 107(5): 735-743. 2012.
- [16] LIN, Y.; CHENG, X.; MAO, J.; WU, D.; REN, B.; XU, S.Y.; FANG, Z.F.; CHE, L.Q.; WU, C.M.; LI, J. Effects of different dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios on boar reproduction. **Lipids Health Dis.** 15: 31. 2016.
- [17] LIU, Q.; ZHOU, Y.F.; DUAN, R.J.; WEI, H.K.; PENG, J.L.; JIANG, S.W. Dietary n-6 : n-3 ratio and Vitamin E improve motility characteristics in association with membrane properties of boar spermatozoa. **Asian J. Androl.** 19(2):223-229. 2016.
- [18] LUC, D.; BO, H.X; THOMSON, P.C.; BINH, D.V.; LEROY, P.; FARNIR, F. Reproductive and productive performances of the stress-negative Pietrain pigs in the tropics: the case of Vietnam. **Anim. Prod. Sci.** 53:173-179. 2013.
- [19] PEREZ-LLANO, B.; LORENZO, J.L.; YENES, A.; TREJO, A.; GARCIA-CASADO, P.A.; short hypo-osmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenol.** 56:387–398. 2001.
- [20] PÉREZ-LLANO, B.; ENCISO, M.; GARCÍA-CASADO, P., SALA, R.; GOSÁLVEZ, J. Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. **Theriogenol.** 66:2137-2143. 2006.
- [21] PRASAD, K. Flaxseed and cardiovascular health. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 54(5):369-377. 2009.
- [22] RADOMIL, L.; PETTITT, M.; MERKIES, K.; HICKEY, K; BUHR, M. Stress and Dietary Factors Modify Boar Sperm for Processing. **Reprod. Dom. Anim.** 46:39–44. 2011.
- [23] ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenol.** 53:1415–1420. 2000.
- [24] RUSSO, G.L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochem. Pharmacol.** 77(6):937-46. 2009.
- [25] TOR, M.; ESTANY, J.; VILLALBA, D.; CUBILÓ, D.; TIBAU, J.; SOLER, J.; SANCHEZ, A.; NOGUERA, J.L. A within-breed comparison of RYR1 pig genotypes for performance, feeding behaviour, and carcass, meat and fat quality traits. **J. Anim. Breed. Genet.** 118:417–427. 2001.
- [26] URBAN, T.; KUCIEL, J. The effect of point in RYR1 gene on the semen quality traits in boars of Large White and Landrace breeds. **Czech J. Anim. Sci.** 46 (10):1-5. 2001.
- [27] YESTE, M.; BARRERA, X.; COLL, D.; BONET, S. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. **Theriogenol.** 76(1): 184–196. 2011.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

REVISTA CIENTÍFICA

Vol, XXVIII, N° 1 _____

Esta revista fue editada en formato digital y publicada en febrero de 2018, por el Fondo Editorial Serbiluz, Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela

www.luz.edu.ve
www.serbi.luz.edu.ve
produccioncientifica.luz.edu.ve