

El uso de semen porcino congelado

JOAQUIN GADEA.

DEPARTAMENTO FISIOLÓGIA. FACULTAD DE VETERINARIA.
UNIVERSIDAD DE MURCIA.

En la actualidad, la inseminación artificial porcina es una técnica reproductiva de amplia aplicación en todo el mundo desarrollado. Sin embargo, el uso de semen congelado queda hoy día limitado a casos muy específicos, o bien asociado a la introducción en las explotaciones de nuevo material genético de alto valor para inseminar determinados animales puros en las granjas de selección, o bien asociado a labores de investigación. No obstante, el uso de semen congelado puede hoy en día aportar ciertas ventajas sobre el semen refrigerado como son el transporte a largas distancias o la conservación durante un tiempo muy prolongado (años) con unos resultados productivos que progresivamente mejoran y se acercan a los obtenidos con semen refrigerado.

Este artículo tiene como objetivo revisar, a la luz de las últimas investigaciones, la aplicación que puede tener en condiciones comerciales el semen congelado, analizando las ventajas y limitaciones que esta técnica presenta.

Desarrollo histórico

En el año 1949 el equipo del Dr. C. Polge en Cambridge (Reino Unido) usa por primera vez con éxito el glicerol como agente crioprotector para congelar espermatozoides. Este hecho supuso, por citar un ejemplo, un espectacular desarrollo de los sistemas de congelación y la utilización masiva de semen congelado en la inseminación artificial bovina, siendo la base de las grandes mejoras productivas en las razas lecheras.

Por el contrario, en la especie porcina la aplicación inicial de las técnicas de congelación espermática no se obtuvo el éxito esperado. Y no es hasta 20 años después, en 1970, también en Cambridge, cuando obtienen las primeras camadas a partir de semen congelado mediante la deposición del mismo a nivel uterino mediante una intervención quirúrgica (laparotomía) (Polge et al., 1970). En estos trabajos está implicado el mismo Polge, junto a Salomon e Ian Wilmut (que posteriormente se hará mundialmente famoso como creador de la oveja clónica Dolly). Un año después, en 1971 se obtienen las primeras camadas con inseminación cervical mediante el uso de catéteres de inseminación en diferentes laboratorios (Crabo y Einarsson, 1971; Pursel y Johnson, 1971; Graham et al., 1971).

Se produce un cambio radical cuando en el mismo año 1975, en EEUU (Pursel y Johnson, 1975) y en Alemania (Westerndorf

et al., 1975) se desarrollan dos métodos de congelación que pueden ser aplicados a nivel comercial y que en esencia son los que se continúan utilizando hoy en día. Ambos métodos utilizan diluyentes que están basados en la utilización de la yema de huevo y glicerol como agentes crioprotectores, una concentración elevada de azúcares y la adición de un agente detergente (Orvus et paste). El método alemán (Westerndorf et al., 1975) utiliza un medio que consta de lactosa (11%) y yema de huevo (20%) y envasa las muestras seminales en pajuelas de 5 ml, mientras que el método americano Beltsville descrito por Pursel y Johnson (1975) utiliza el medio denominado BF-5 (Beltsville freezing - 5), en cuya composición se incluye glucosa, yema de huevo y Tris como agente regulador del pH, y las muestras seminales se colocan sobre nieve carbónica para congelarse en forma de píldoras (pellets) de un centenar de microlitros.

El método alemán es el que ha perdurado con ciertas modificaciones como el uso de pajuelas de menor volumen (0.5 ml) o ajustes en las condiciones de adición del glicerol (Almid et al., 1988) y es el más frecuentemente empleado en la actualidad.

Durante la década de los 90 se mejoraron las condiciones del proceso de congelación con el estudio de nuevos envases, curvas de congelación, etc. En este periodo la Facultad de Veterinaria de Uppsala (Suecia) ha sido un referente mundial, con los trabajos dirigidos por el profesor Rodríguez-Martínez. En esta misma década se realizaron importantes estudios sobre las bases de la crioconservación y las particularidades del proceso en el porcino, donde destacan los trabajos de los británicos P.F. Watson y W.V. Holt.



Ventajas de la inseminación artificial y del uso del semen congelado

La inseminación artificial como técnica reproductiva aporta una serie de ventajas, entre las que se encuentran:

- La amplia difusión del material genético del verraco seleccionado, que permite inseminar un mayor número de hembras.
- Mejoras sanitarias en la explotación, al evitar el contacto directo macho-hembras por lo que se impide la transmisión de enfermedades por vía venérea y por contacto.
- Se evalúa continuamente la capacidad de producir espermatozoides de calidad suficiente para asegurar la fecundación.
- Supone de forma indirecta mejorar el control de los resultados reproductivos de la explotación.
- Reducción en el número de verracos por hembra, con la consiguiente reducción en costes de adquisición, alojamiento, alimentación, etc. Ese dinero ahorrado puede ser destinado a la compra de verracos de mejor calidad genética.

Pero la utilización de semen congelado en el sistema de inseminación puede ofrecer unas ventajas adicionales:

- Permite el intercambio de material genético a larga distancia y durante un periodo muy largo (años). Este periodo de tiempo puede ser crucial para efectuar un control sanitario o genético del semen/verraco antes de su uso. Eso es posible hoy con el diagnóstico de enfermedades infecciosas basado en el estudio de la presencia de ADN del agente infeccioso mediante técnicas de PCR (Reacción de polimerasa en cadena) y el desarrollo de marcadores genéticos asociados a la producción es un proceso creciente.
- Creación de bancos genéticos. De interés evidente en el caso de la conservación de razas en peligro de extinción (un claro ejemplo es el notable trabajo desarrollado por el Dr. Poto del Instituto Murciano de Investigación Agroalimentaria en la conservación del Chato murciano) y de grandes posibilidades para la conservación de líneas o estirpes de especial interés.
- Estos bancos de genes también pueden ser importantes a nivel comercial por ejemplo para asegurar la conservación de líneas genéticas valiosas ante posibles situaciones desfavorables (epizootía, incapacidad para recogida, infertilidad/subfertilidad por altas temperaturas, etc).
- A nivel práctico permite el introducir material genético de alto valor sin los riesgos derivados de la introducción de nuevos animales en la explotación. Especialmente aplicable a la líneas puras (abuelas).

Limitaciones del uso semen de congelado

El proceso de congelación/descongelación provoca lesiones en cualquier tipo de célula, pero los espermatozoides son especialmente sensibles a las bajas temperaturas, sufriendo el proceso que se denomina "choque por frío". Las particularidades que presenta el espermatozoide porcino hace que sea muy sensible al choque por frío (Pursel et al., 1973), que produce una alteración de funcionalidad de la membrana espermática y la viabilidad celular se ve comprometida. Estas alteraciones del espermatozoide suponen que la vida media del mismo se ve acortada, es decir, se reduce el tiempo en el cual el espermatozoide puede ser fértil. De tal manera que al usarse en inseminación artificial se obtenían resultados inferiores a los obtenidos con semen refrigerado como el clásico trabajo de Johnson et al. de 1985. En él, se concluía que la fertilidad del semen congelado era sensiblemente menor a la obtenida con semen refrigerado y que podría estimarse en una reducción media del 20% en la tasa de partos.

La reducción en el rendimiento reproductivo ha sido el gran limitante de esta técnica. Sin embargo, en los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar la fertilidad del semen congelado en inseminación artificial con resultados a nivel comercial muy prometedores (Thilmant, 1998; Gadea et al., 2001; Ericksson et al., 2002; Ruiz et al., 2002; Sellés et al., 2003) que suponen tasas de partos por encima del 70% y para algunos machos más del 80%. Por tanto, hoy con estos resultados sería conveniente evaluar si es rentable comercialmente el uso del semen congelado para determinadas aplicaciones, como el uso para las razas en pureza. En cualquier caso debemos desterrar la idea muy difundida entre el sector que afirma que los espermatozoides porcinos no se pueden congelar de forma adecuada y su uso no permite unos rendimientos reproductivos adecuados porque, sencillamente, no es cierta. Esta misma idea incierta se difunde en sentido contrario cuando hacemos referencia al semen congelado en el ganado vacuno de leche, donde la mayor parte de la inseminación artificial se realiza con semen congelado, cuando la fertilidad obtenida no supera en el mejor de los casos el 70%.

La utilidad fundamental de esta técnica está asociada a la incorporación de genética de alto valor a nuestra explotación

(para razas en pureza, abuelas y bisabuelas). Por tanto los rendimientos reproductivos obtenidos, sin dejar de ser importantes, son secundarios a la consecución del objetivo primario que es la mejora genética de nuestra explotación porcina. Desgraciadamente este uso tan claramente rentable en la actualidad no se está aprovechando quizás debido a un problema en la transferencia de la tecnología al sector.

Téngase en consideración que si existiera una red de distribución de semen congelado adecuado, que produjera dosis seminales congeladas procedentes de animales de valor genético de excelencia y de calidad seminal suficiente, el ganadero únicamente debería mantener su dosis en un tanque de nitrógeno líquido (tal como hace el ganadero de vacuno lechero) y en el momento adecuado descongelar la muestra sobre un diluyente simple (por ejemplo BTS) y proceder a la inseminación en unas condiciones similares a las del semen refrigerado. El coste adicional de este proceso (en ningún caso elevado) sería fácilmente contrarrestado por las mejoras productivas consecuencia de la introducción en la explotación de material genético mejo-

Cuadro I. Método de congelación.

1. Dilución en BTS 1:1
2. Mantener en refrigerador a 15 °C durante 2.5 horas
3. Centrifugación a 1000g x 10 min
4. Resuspender en 11% lactosa + 20% yema de huevo (diluyente A)
5. Ajustar concentración a 10⁹ spz/ml
6. Mantener a 5 °C durante 2 horas
7. Mezclar dos partes diluyente A + una parte diluyente B (1.5% Equex + 6-9% glicerol)
8. Vapores de nitrógeno durante 20 min o Biocongelador
9. Sumergir en nitrógeno y conservar en tanque

Pajuelas de 0,5 ml (Almild & Johnson, 1988, J. Anim. Sci. 66:2899-2905.)

rante, y no directamente de la fertilidad obtenida en la utilización del semen congelado.

En cualquier caso es posible mejorar los rendimientos reproductivos con semen congelado, permitiendo ampliar su uso a distintas situaciones donde el rendimiento y ventajas superen a las limitaciones. Las vías de mejora han ido dirigidas a optimizar los sistemas de congelación para obtener una calidad seminal aceptable tras la descongelación (nuevos procedimientos de congelación, diluyentes, aditivos, envases, etc.). Pero todavía hay algunos aspectos que pueden mejorar sensiblemente.

Amplia variabilidad entre verracos

La selección de verracos ha sido basada hasta el momento en los rendimientos productivos que éstos ofrecen en la descendencia (índices de crecimiento y conversión, conformación, calidad de canal), cubriendo unos mínimos de calidad seminal que aseguren un rendimiento reproductivo adecuado. Sin embargo, hasta el momento no se ha realizado una verdadera selección de reproductores por su capacidad de congelación como previamente se ha realizado en el vacuno de leche.

En numerosos estudios se han descrito grandes diferencias en la capacidad de congelación que presentan los espermatozoides de machos diferentes (revisado por Johnson, 1985), que afectan tanto a la viabilidad de los espermatozoides tras la descongelación como a la fertilidad in vivo (Johnson et al., 1981). De manera tradicional los machos han sido clasificados como "buenos congeladores" o "malos congeladores" (Medrano et al., 2002). Hasta hace muy poco no se sabía nada sobre las posibles causas de esta variabilidad, de manera que la única

solución viable es la de optimizar los procesos de congelación para reducir al máximo la variabilidad y descartar aquellos machos realmente malos congeladores (Gadea y cols, 2003). Recientemente se han encontrado los principios de una base genética que justifique estas diferencias (Thurston et al., 2002). Un apasionante nuevo campo de estudio se abre para los próximos años, cuando sea posible detectar mediante el uso de un marcador genético aquellos verracos con mayor capacidad de congelación espermática.

Coste de las dosis seminales congeladas

Uno de los problemas a solucionar es el mayor coste que presentan las muestras seminales congeladas. Esto es debido a diversas causas:

- El número de espermatozoides por dosis es sensiblemente mayor en el caso de semen congelado frente al refrigerado para asegurar unos buenos resultados reproductivos. Se usan dosis de $5-6 \times 10^6$ espermatozoides cuando en refrigerado es de $2-3 \times 10^6$. De esta manera, de un eyaculado sólo podemos producir la mitad de dosis que en el uso común.
- La producción de las dosis es más costosa en tiempo y materiales. Además requiere un equipamiento sofisticado y costoso que sólo es rentable si la producción de dosis congeladas es elevada.
- El mantenimiento de las dosis en tanques de nitrógeno líquido de las muestras seminales es costoso ya que se necesitan varias pajuelas por inseminación, de manera que el consumo de nitrógeno líquido es importante.

En la actualidad, se está haciendo un esfuerzo en reducir el número de espermatozoides por dosis, que así mismo supondría reducir significativamente el coste de producción y mantenimiento, para ello hay abiertas diversas líneas de actuación:

- Mejorar los procesos de congelación, para que haya una proporción mayor de espermatozoides viables en el momento de la inseminación.
- Sincronizar mejor el momento de la ovulación de la cerda con el momento de inseminación de tal manera que aseguremos el encuentro del mayor número de espermatozoides viables con los ovocitos recién ovulados (Larson, 1976). Esto implica, o bien, el empleo de diagnósticos de ovulación mediante el uso de ecografía por vía rectal o transabdominal (Knox y Zas, 2001), o bien, la utilización de protocolos de sincronización de la ovulación con tratamientos hormonales (de Rensis et al., 2003).
- Utilización de inseminaciones intrauterinas profundas que permitan reducir el número de espermatozoides por dosis (Roca et al., 2003).

Por nuestra parte, el equipo de investigación Fisiología de la Reproducción de la Universidad de Murcia comenzó a trabajar en congelación de espermatozoides porcinos en el año 1996, gracias a la financiación obtenida en la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología. En los inicios el objetivo fue la puesta a punto de los sistemas de congelación con una tecnología muy rudimentaria y la aplicación a la conservación de material genético de alto valor de razas en peligro de extinción como el Chato Murciano (Peinado et al., 1998) y de animales de razas comerciales. En esa primera etapa, se pusieron a punto los protocolos de congelación, se experimentó con los diversos envases

disponibles y se utilizaron nuevas técnicas para evaluar la calidad del semen después de la descongelación.

Igualmente se puso a punto la técnica de fecundación in vitro con espermatozoides congelados (Gadea et al., 1998^a y 1998^b; Matás et al., 2002), que por una parte permite producir embriones in vitro que tras la correspondiente transferencia permita el nacimiento de lechones (Coy et al., 2001). Por otra parte la fecundación in vitro es el sistema más preciso para evaluar la capacidad fertilizante del semen congelado (Selles et al., 2003).

Se han estudiado diversos factores que pueden mejorar la eficiencia de la técnica: la curva de congelación con sistemas automatizados o biocongeladores (Murgas et al., 2001; Ruiz et al., 2002), las condiciones óptimas para la descongelación (Sellés et al., 2003), las diferencias en la capacidad de congelación de las diversas fracciones del eyaculado (Sellés et al., 2001), las condiciones en las que se produce la inseminación (Ruiz et al., 2003), así como el efecto de la estación, la línea genética y el verraco en la capacidad de congelación (Gadea et al., 2003). Los resultados de fertilidad del semen congelado a nivel comercial parecen muy prometedores obteniendo tasas de partos superiores al 70% ya alcanzando para algunos verracos más del 80% (Gadea et al., 2001; Ruiz et al., 2002 y 2003; Selles et al., 2003).

En los últimos tiempos nos hemos centrado en el estudio de las alteraciones que produce la congelación en la célula espermática y, especialmente, en la desestabilización que se produce durante la congelación del sistema antioxidante del espermatozoide. Esta información sobre los procesos básicos puede ser vital para posteriormente aplicarla en el diseño de nuevos protocolos y diluyentes que permitan minimizar el daño espermático. El contenido de glutatión (principal agente antioxidante no enzimático) se reduce durante el proceso de congelación (Gadea et al., 2004), así como se alteran las proteínas de la membrana espermática (Gadea et al., 2004). La adición de

este glutatión en los diluyentes hasta el momento no tiene un efecto claro, la aplicación en el medio de congelación no parece tener un efecto positivo (Sellés et al., 2003; Matás et al., 2004). Sin embargo, si hay una mejora al añadir este compuesto en el medio de descongelación (Gadea et al., 2000 y 2004). Igualmente estamos estudiando como se modifican las proteínas de la membrana de los espermatozoides por el proceso de congelación (Marco y Gadea, 2003; Gadea et al., 2004^b) información que nos permitirá evaluar si los nuevos procesos son más eficientes. Esperamos poder seguir avanzando en el conocimiento en este campo para poder transferir los resultados de nuestra investigación al sector productivo.

Conclusiones

El uso del semen congelado en la especie porcina no ha sido muy difundido hasta el momento. Esta técnica aporta unas ventajas muy interesantes para el sector y se dispone de la suficiente experiencia sobre el tema para poderla aplicar de forma satisfactoria en unas determinadas situaciones en condiciones de campo. Al mismo tiempo las investigaciones sobre este campo apuntan a una mejora notable en los resultados reproductivos que permitirán un uso más amplio en un futuro próximo. ■

Bibliografía en poder del autor

