INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO A -80ºC Y DE LA TEMPERATURA DE DESCONGELACION SOBRE DOSIS ESPERMÁTICAS PORCINAS DE BAJA CALIDAD.

Valdelvira J.J.[1]; Vidal A.[2]; Alonso J.[1]; Gosálvez L.F.[1]

[1]Departamento de Producción animal. Universidad de Lleida, Av. Rovira Roure, 177. 25198-Lleida.

[2]Diputación de Lleida. C/ Carme, 26. 25007 – Lleida. España

INTRODUCCION

Uno de los retos actuales de la I.A. porcina es la utilización de semen congelado a nivel industrial, que en estos momentos, debido a su alto coste, solo se emplea a nivel experimental (3). Aunque ya hay autores que indican que se pueden conseguir resultados similares a los obtenidos con dosis en fresco (15ºC)(7). Uno de los obstáculos a salvar es el elevado número de espermatozoides con acrosoma lesionado que causa la congelación, debido a que esta es la región más sensible de la célula y el primer lugar donde el frío produce daños (19). Las lesiones sufridas se derivan tanto del enfriamiento, congelación y descongelación (13), como del tiempo de almacenamiento de las dosis (20). Por lo que la temperatura de descongelación es un parámetro crucial (18, 5).

La temperatura de conservación empleada ha sido tradicionalmente –196ºC, utilizando el nitrógeno líquido por sus ventajas económicas y de manejo de las muestras, tanto en laboratorio como en campo, así como su alto grado de efectividad en otras especies (14,2). No obstante el empleo de -80ºC como alternativa al nitrógeno líquido ya se apuntaba como no descartable desde hace mucho tiempo (15, 11).

Distintos autores muestran que el deterioro del espermatozoide se produce en gran medida durante la descongelación (4, 3) siendo el acrosoma la región más sensible de la célula y el primer lugar por donde el frío produce lesiones, (19). El ánimo del presente estudio es evaluar la influencia del tiempo de conservación y temperatura de descongelación sobre la movilidad y la acrosomía en muestras seminales porcinas de baja calidad inicial (15ºC).

MATERIAL Y METODOS

En el presente trabajo se han estudiado 15 muestras de semen heterospérmico procedentes de verracos, aleatoriamente elegidos, de genética PIC 411, con una edad entre 8 y 28 meses, testados periódicamente y alojados en condiciones estándar en un centro de I.A.

Las muestras de semen venían presentada en blister de 80 ml, almacenándose en un frigorífico entre 15-18ºC. El trabajo comenzaba a las 24 horas de la producción de las dosis, observándose la movilidad y calidad del movimiento. Posteriormente se centrifugaban a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, eliminando el sobrenadante y quedando un sedimento de células espermáticas (pellet), de un volumen aproximado de 2,5 ml. Al pellet se le agregaban 2,5 ml de diluyente L-Y, (lactosa, 11%; yema de huevo, 20%) agitando suavemente con el fin de conseguir una solución homogénea. Después se bajaba la temperatura de 15ºC a 5ºC en 1,5 horas. Una vez alcanzada la temperatura de 5ºC se añadían 5 ml de crioprotector L-Y-G-OEP, (lactosa-yema, 95%; glicerol, 4%; OEP, 1%), agitando suavemente para homogeneizar. Posteriormente se envasaban las dosis en pajuelas plásticas de 0,5 ml las cuales se sometían a congelación en vapores de nitrógeno, momento en el que se procedía a la introducirlas en el congelador de -80ºC donde se conservaban.

La descongelación se realizó en intervalos de tiempo comprendidos entre 3, 10 y 30 días. Se emplearon 3 temperaturas y 3 tiempos distintos de descongelación; a

22°C, y 40 segundos; a 42°C y 20 segundos; a 50°C y 10 segundos. Para el estudio de la movilidad masal y de la acrosomia se ha seguido la técnica descrita por Sánchez (1991).

El estudio estadístico se ha realizado mediante un glm con el programa estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se muestran los resultados de la movilidad tras descongelar las muestras. En ella vemos que la mayor movilidad se produce a temperaturas de descongelación de 42°C (25,1% ± 1,2), comparando estos valores con 22°C (21,4% ± 1,3), y con 50°C (23,8% ± 1,5), siendo estos porcentajes menores al 50% conseguido por Hofmo y Almlid, (1991) y Watson, (1995). Aunque hay que tener en cuenta que nuestro material de partida era semen de baja calidad, con una movilidad, a 15°C, del 70%. En cuanto a la relación entre movilidad y tiempo de almacenamiento, la tendencia observada es que existe una relación inversa entre ambos sistemas, aunque sin significación estadística. Esto difiere de lo hallado por Kojima et al., (1971), que indica que a partir de una hora de conservación se equipara la movilidad postcongelación con la movilidad en fresco (15°C).

En la Tabla 2 se observa como el mayor número de acrosomas normales (NAR) se obtienen para las temperaturas de descongelación de 42°C y 50°C (32,6% ± 1,6), no apareciendo diferencias significativas entre estos dos resultados. Diversos autores consiguieron un valor de NAR superior al hallado en este estudio, (12, 8, 21), en el que hemos empleado dosis espermáticas de baja calidad a 15°C, con un NAR del 80%. La temperatura de descongelación de 22°C ha resultado ser la peor de las tres. La relación entre NAR y tiempo de almacenamiento es similar a la hallada para la movilidad, obteniéndose el mejor para el día 3 de almacenamiento. Al desaparecer las diferencias estadísticas entre el día 10 y 30, se puede deducir que las lesiones se producen entre los días 3 y 10 de conservación, afectando a los acrosomas más sensibles a la congelación. Esta tendencia no ha sido hallada por otros autores a –196°C, (1,10). Lo que parece indicar que la temperatura de –80°C es únicamente aconsejable para mantenimiento de dosis a corto plazo.

La temperatura de descongelación influye marcadamente en el resultado del proceso, además, comparando con lo hallado por nosotros, trabajando con semen de alta calidad (6), vemos que la calidad de la muestra de partida influye en los resultados de la congelación, al producirse un porcentaje más elevado de lesiones. Por otro lado indicar que la conservación de dosis a –80°C es una posible solución para el almacenamiento de dosis en centros de inseminación durante cortos periodos de tiempo.

Es necesario realizar más investigación en este campo, estudiando más animales así como realizando inseminaciones, con el fin de ver la viabilidad "in vivo" de estas muestras.

BIBLIOGRAFIA

1 Almlid T., Stavne S.E., Johnson L.A., 1987. Zuchthygiene, 22 (5), 193 – 202.
2 Bwanga C.O., de Bragança M.M., Einarson S., Rodriguez – Martinez H., 1990. J.Vet.Med.A. 37 (9), 651-658.
3 Bwanga C.O., 1991. Act. vet. Scand. 32, 431 - 453.
4 Courtens J.L., Paquignon M.,1985. Int. Congress on Animal Reproduction. Uppsala, Sweden.
5 Eriksson B.M., Rodriguez-Martinez H., 2000. Anim. Reprod. Sci. 63, 205-220.
6 Gosálvez L.F., Valdelvira J.,Vidal A., Boira D., 1999. IX Int. Cong. de Zootec. Oporto (Portugal).

7 Gil J., Jiménez M., Díaz C., Sánchez R., Martín S.,1996.Rep. Dom. Anim. 31(1), 289-290.
8 Hofmo P.O. and Almlid T., 1991.Boar semen preservation II, Maryland, USA. 1990. 19-121.
9 Kojima Y., Bamba K., Lida I., 1971. Bulletin Faculty Agriculture Shizuoka University. 21, 39-41.
10 Kuo Y.H., 1984. Journal of the Agricultural Association of China., 128, 53-56.
11 Larsson K., Einarsson S., Bane A., Swensson T., 1977. Research and development on deep freezing of boar semen. Haallsta, Sweden.
12 Larsson K., 1985.International Congress on Animal Reproduction. Uppsala, Sweden
13 Morris G.J., Watson P.F., 1984. Cryoletters. 5, 352 - 372.
14 Polge C.,1956.The Veterinary Record. 68, 62-76.
15 Pursel V.G., Johnson L.A., 1975. J. Anim. Sci. 40(1), 99-102.
16 Sánchez R., 1991. Control de calidad espermática. Anaporc. 104, 27-33.
17 S.A.S., 1999. SAS Inst. Inc. USA.
18 Thilmant T., 1998. 10th Meeting 28 – 30 October. Bruges. Belgium.
19 Watson P. F., Plummer J. M., 1985. Cong. Deep Freezen of Boar Semen, 113-127. Uppsala.
20 Watson,P.F. 2000. Animal Reproduction Science. 60-61, 481- 492.
21 Watson P.F., 1995. Reprod. Fertil. Dev.(7). 871–869.

	22 °C	42 °C	50 °C	
3 Días	23.6 ± 3.1	26.7 ± 1.6	25.3 ± 3.3	25.2 ± 1.6
10 Días	21.3 ± 2.1	24.6 ± 2.1	23.3 ± 1.9	23.3 ± 1.2
30 Días	19.3 ± 1.8	24.0 ± 2.3	22.7 ± 2.5	22.0 ± 1.3
	21.4 ± 1.3	25.1 ± 1.2	23.8 ± 1.5	

Tabla 1 : Valores medios de **movilidad**, de los cruces y globales, de cada nivel de los factores,Tiempo de conservación y T^a de descongelación (media ± SEM) para muestras conservadas a – 80 °C.

	22 °C	42 °C	50 °C	
3 Días	31.5 ± 2.4	35.6 ± 3.0	35.6 ± 3.4	34.2 ± 1.7^a
10 Días	27.0 ± 2.0	29.7 ± 2.5	31.3 ± 2.4	29.3 ± 1.3^b
30 Días	26.1 ± 2.3	32.6 ± 2.7	30.8 ± 2.3	29.8 ± 1.4^b
	28.2 ± 1.3^b	32.6 ± 1.6^a	32.6 ± 1.6^a	

Tabla 2 : Valores medios de **NAR**, de los cruces y globales, de cada nivel de los factores, Tiempo de conservación y T^a de descongelación (media ± SEM) para muestras conservadas a – 80 °C.

Medias globales seguidas de letras distintas son estadísticamente diferentes, a,b, ($p<0.05$).