ITEA (2003), Vol. **Extra N.º 24.** Tomo I, 330-332

FACTORES QUE AFECTAN A LA CAPACIDAD DE CONGELACIÓN DEL SEMEN PORCINO

J. Gadea, S. Ruiz, E. Sellés, MA. Marco
Departamento Fisiología. Facultad de Veterinaria.
Universidad de Murcia. e-mail: jgadea@um.es, www.um.es/grupo-fisiovet

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar la fertilidad del semen congelado en inseminación artificial (IA) obteniéndose resultados a nivel comercial muy prometedores (Gadea et al., 2001; Ericksson et al., 2002; Ruiz et al., 2002; Sellés et al., 2003). 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.). Sin embargo, para el desarrollo comercial de esta técnica, hasta ahora limitado a casos muy especiales, es necesario entre otras cosas conocer la/s causa/s de la amplia variabilidad que presentan los verracos en su capacidad de congelación del semen.

El objetivo de este trabajo es el análisis de algunos de los factores que influyen a la hora de seleccionar los eyaculados que van a ser sometidos a los procesos de congelación. Entre los que incluimos la estación del año, la línea genética y el efecto individual.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los eyaculados procedían de 52 verracos de fertilidad probada que pertenecían al centro de Inseminación Artificial ADESPO-Lorca, correspondientes a 6 líneas genéticas (Landrace (LD), Large White (LW), Duroc (DU), Pietrain (PI) e Híbridos comerciales finalizadores (C) y (F)). Muestras de 10 ml de los eyaculados, recogidas a lo largo de todo el año, fueron congeladas mediante el método descrito por Westendorf et al. (1975), basado en la utilización de un medio con lactosa y yema de huevo. El semen fue envasado en pajuelas de 0.5 ml con una concentración final de 1 x 10^9 espermatozoides/ml, 3% de glicerol y 0.5% de Orvus et Paste. El proceso de descongelación se realizó mediante inmersión en un baño de agua caliente a 50°C durante 12 segundos y posterior dilución en BTS a 37°C (Sellés et al., 2003). La evaluación de la calidad seminal se realizó midiendo los parámetros de motilidad (Mot), motilidad progresiva (Mpr) valorada en una escala de 0-5, estado del acrosoma (NAR), integridad de membrana mediante tinción con eosina-nigrosina (EN) y los fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína e ioduro de propidio (DCF) y el porcentaje total de morfoanomalías (Morfol).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a la calidad del semen fresco, se encontraron diferencias asociadas a la línea genética para motilidad, con los peores resultados en la línea F, y la morfología (peores resultados para LW y F, Tabla 1); con un marcado efecto individual (macho dentro de raza) para la mayoría de parámetros estudiados. En ningún caso se detecto un efecto de la estación sobre estos parámetros, probablemente debido a las condiciones de climatización que tienen las instalaciones donde se albergaban estos animales que anulan o minimizan el estrés térmico.

Los valores medios obtenidos en el semen descongelado (Tabla 2) son sensiblemente inferiores a los obtenidos en otros trabajos (Gadea et al., 2001;

Ruiz et al., 2002; Sellés et al., 2003) donde únicamente se utilizaron buenos congeladores y se procesaron eyaculados completos. La línea genética tuvo efecto sobre todos los parámetros salvo para la motilidad. Sin embargo, la línea no afectó del mismo modo a las diversas características seminales estudiadas. Destaca el efecto individual que es altamente significativo para todos los parámetros. La estación afectó a la motilidad total, progresiva y EN con un descenso en primavera frente a otoño.

Tabla 1. Efecto de línea genética sobre las características del semen fresco. N = 362 eyaculados. 52 verracos de 6 líneas genéticas. (Media ± SEM).

Línea	N Eyac	Mot	Mpr	EN	NAR	DCF	Morfol
C	77	74.1 ± 0.6^{ab}	3.3 ± 0.0	83.7 ± 0.8	94.5 ± 0.5	83.8 ± 0.8	13.5 ± 0.9^{a}
DU	11	77.2 ± 1.2^{a}	3.3 ± 0.1	85.9 ± 2.3	96.0 ± 1.2	86.0 ± 1.8	10.5 ± 2.1^{a}
F	45	70.6 ± 1.1^{b}	3.3 ± 0.0	83.0 ± 0.8	94.5 ± 0.9	82.3 ± 1.2	22.5 ± 2.1^{bc}
LD	27	72.2 ± 0.9^{ab}	3.4 ± 0.0	83.4 ± 1.6	92.1 ± 1.3	83.4 ± 1.2	13.4 ± 1.7^{e}
LW	32	72.3 ± 0.9^{ab}	3.3 ± 0.0	85.0 ± 1.5	94.7 ± 1.0	83.2 ± 1.5	25.8 ± 2.4^{c}
PI	170	71.6 ± 0.5^{ab}	3.8 ± 0.5	82.5 ± 0.7	93.6 ± 0.4	81.7 ± 0.7	18.0 ± 1.0^{ab}

Anova	Mot	Mpr	EN	NAR	DCF	Morfol
Línea	0.0102	0.6518	0.7696	0.2271	0.6098	<0.0001
Macho (línea)	<0.0001	0.3171	0.0376	<0.0001	0.3222	<0.0001
Estación	0.4235	0.9678	0.7687	0.0874	0.2138	0.3609
Línea*Estación	0.9984	0.9874	0.8576	0.1405	0.4606	0.1651

Cuando analizamos el porcentaje de las pajuelas que pueden ser consideradas aceptables para su uso en IA (EN > 50, NAR > 40), observamos que sólo el $26.68 \pm 2.10\%$ de las pajuelas eran aceptable y que ni la línea genética ni la estación ejercen un efecto significativo sobre este porcentaje y que únicamente el efecto macho (anidado en raza) tiene una influencia significativa ($p < 0.0001$).

Tabla 2 Efecto de la línea genética sobre las características del semen descongelado. N = 442 pajuelas, 170 eyaculados, 52 machos, 6 líneas.

Línea	N Eyac	Pajuelas	Mot	Mpr	EN	NAR	DCF
C	37	95	52.5 ± 1.2	3.7 ± 0.1^{a}	55.0 ± 1.6^{a}	32.7 ± 1.1^{a}	42.7 ± 1.4^{ab}
DU	6	13	51.9 ± 2.6	3.7 ± 0.1^{ab}	$49.9. \pm 3.7^{ab}$	34.6 ± 3.6^{b}	49.8 ± 3.3^{ab}
F	29	65	48.9 ± 1.5	3.6 ± 0.1^{ab}	56.1 ± 1.6^{a}	31.6 ± 1.3^{ab}	44.3 ± 1.3^{ab}
LD	9	24	52.7 ± 2.3	3.7 ± 0.1^{ab}	48.6 ± 3.3^{b}	24.4 ± 2.2^{b}	38.7 ± 2.8^{a}
LW	13	41	53.0 ± 1.5	3.5 ± 0.1^{ab}	56.5 ± 2.3^{ab}	28.7 ± 2.1^{ab}	47.6 ± 1.6^{b}
PI	76	208	48.6 ± 0.9	3.6 ± 0.1^{b}	54.2 ± 1.1^{a}	31.8 ± 0.8^{a}	43.9 ± 1.0^{b}

Anova	Mot	Mpr	EN	NAR	DCF
Línea	0.1060	0.0070	0.0109	0.0067	0.020
Macho (línea)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Estación	0.0394	0.0276	<0.0001	0.4806	0.0847

Para estudiar la posible relación entre calidad antes y después de congelación se realizó un análisis de correlación de Pearson. Los coeficientes de correlación encontrados son muy reducidos y en pocos casos significativos (Tabla 3). Todo ello indica que aunque la alta calidad del semen fresco es un requisito imprescindible para el éxito del proceso de congelación, ésta no asegura una buena calidad post-descongelación. La posibilidad por tanto de detectar los buenos congeladores debe estar basada en otros factores no asociados con la calidad del semen de partida.

Diversos trabajos ya han demostrado diferencias entre razas (Paquigon y Courot, 1976; Johnson et al., 1981). Recientemente, Park y Yi (2002) describen diferencias entre la capacidad de congelación del semen porcino (razas Yorkshire y Duroc), asociadas a cambios en los niveles de testosterona y a cambios estacionales. Sin embargo, de acuerdo a los resultados aquí mostrados pensamos que la variación es debida principalmente al efecto individual.

Tabla 3. Relación entre los parámetros seminales post-congelación con los del semen fresco. Correlaciones de Pearson (r) y probabilidad (p).

	Mot		Mpr		EN		NAR		DCF	
	r	p	r	P	r	p	r	p	r	P
Mot-fresco	0.044	0.357	0.060	0.207	-0.121	0.011	-0.023	0.627	-0.110	0.021
Mpr-fresco	0.019	0.692	0.056	0.241	-0.099	0.037	-0.013	0.783	-0.084	0.080
EN-fresco	0.109	0.021	0.132	0.005	-0.007	0.887	-0.014	0.773	0.091	0.057
NAR-fresco	-0.039	0.410	0.036	0.452	0.023	0.623	0.080	0.094	0.032	0.499
DCF-fresco	0.093	0.050	-0.010	0.831	-0.071	0.137	0.024	0.614	-0.132	0.006
Morfología	-0.092	0.053	-0.154	0.001	0.175	0.000	-0.047	0.320	0.120	0.012

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 (Larsson, 1976; Johnson et al., 1981), clasificando a los machos como buenos o malos congeladores (Watson et al., 1995). Hasta hace muy poco no se conocían las posibles causas de esta variabilidad, de manera que la única solución viable era la optimización de los procesos de congelación para reducir al máximo la variabilidad y descartar aquellos machos realmente malos congeladores. Medrano et al. (2002) sugieren que se debe adaptar el protocolo de congelación (curva de enfriamiento) a cada uno de los machos, lógicamente esto se aleja de los procesos estandarizados a los que debe tender la industria porcina, mediante el uso de sistemas automatizados (biocongeladores programables) que permiten reducir la variabilidad entre eyaculados y pajuelas (Ruiz et al., 2002, 2003). Un apasionante nuevo campo de estudio se abre para los próximos años, ya que recientemente se han hallado los primeros datos que asocian la capacidad de congelación a una base genética (Thurston et al., 2002).

En conclusión, la estación y la raza no tienen un efecto definitivo sobre la capacidad de congelación del semen, que está más asociada a la capacidad individual. Por tanto hasta que la selección por marcadores genéticos sea una realidad deberemos trabajar de forma empírica en la selección de los reproductores asumiendo que la alta calidad del semen fresco es un requisito imprescindible pero no suficiente para obtener buenos resultados en la calidad post-descongelación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Eriksson et al. (2002), Theriogenology 58: 1065-79. **Gadea** et al. (2001), ITEA 22: 799-801. **Johnson** et al. (1981), J. Anim. Sci. 52:1130-1136. **Johnson.** (1985), Proc. 1st Int Conf Deep Freezing of Boar Semen, 199-223. **Larsson** (1976), Acta Vet. Scand. 17: 63-73. **Medrano** et al. (2002), Reproduction 123:315-322. **Paquigon** et al. (1976), 8th ICAR. Kracow 1041-1044. **Park** et al. (2002), Anim Reprod Sci, 73: 53-61. **Ruiz** et al. (2002), Theriogenology. 57: 480. **Ruiz** et al. (2003), ITEA. **Sellés** et al. (2003), Reprod. Dom. Anim. 38: 66-72. **Thurston** et al. (2002), Biol. Reprod. 66: 545-554. Watson (1995). Reprod Fertil Dev 7: 871-891. **Westendorf** et al. (1975), Dtsch. Tierärtzl. Wschr. 82: 261-267.

Agradecemos la inestimable colaboración de D. Jose Antonio Saura. ADESPO- LORCA.