INSEMINACIÓN CON SEMEN CONGELADO PORCINO: DEPOSICIÓN CERVICAL E INTRAUTERINA

S. Ruiz, J. Gadea, E. Sellés, M.A. Marco y M. Sansegundo
Departamento de Fisiología (Área Fisiología Veterinaria). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. sruiz@um.es. http://www.um.es/grupo-fisiovet/

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha producido un gran avance en los sistemas de congelación de semen porcino lo que ha posibilitado el conseguir tasas de fertilidad que permitirían su aplicación en IA a nivel comercial (Eriksson et al., 2002; Sellés et al., 2003). Sin embargo, aún son varias las limitaciones que impiden su total implantación, entre ellas, la mejor economía del semen refrigerado, la variación en la congelabilidad del semen entre verracos y el alto número de espermatozoides necesarios por dosis ($5x10^9$ esp/dosis y 2 IA/celo) (Rodriguez-Martínez, 2001).

Una de las alternativas que se plantean para la reducción del número de espermatozoides por dosis es el uso de la IA intrauterina (IA-IU), mediante el empleo de catéteres flexibles que permiten atravesar el canal cevical y realizar la deposición del semen cerca de la unión utero-tubárica (Martínez et al., 2002; Wolken et al., 2002) o a nivel del cuerpo uterino (Watson & Behan, 2002), usando concentraciones espermáticas reducidas. Estos sistemas podrían emplearse en IA con semen congelado y solventar así una de sus limitaciones.

El objetivo de este trabajo fue llevar a cabo una experiencia de campo de IA con semen congelado, empleando deposición cervical e intrauterina profunda, ensayándose en este último caso, dos concentraciones espermáticas y dos diferentes momentos de aplicación de la dosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Congelación de semen

De entre los reproductores de la granja colaboradora, se seleccionó un verraco de fertilidad probada que previamente, había sido sometido a pruebas de congelabilidad, superando al menos el 50% de viabilidad espermática postdescongelación. La fracción espermática del eyaculado se recolectó manualmente, sólo se procesaron para congelación aquellos eyaculados que presentaron al menos un 80% de espermatozoides morfológicamente normales y por encima de un 70% de motilidad. Se congelaron un total de 9 eyaculados.

El semen se congeló mediante el método descrito por Westendorf et al. (1975), envasándose en pajuelas de 0.5 ml con una concentración final de $1x10^9$ esp/ml, 3% de glicerol y 0.5% de Orvus et Paste. Las pajuelas después de selladas fueron congeladas en un biocongelador programable (Icecube 1800, Minitüb, Alemania), con la siguiente curva de enfriamiento: 1ºC/min desde 5ºC a -4.5ºC, 1 min de mantenimiento a -4.5ºC y 30ºC/min desde -4.5ºC a -180ºC (Ruiz et al., 2002). Las pajuelas congeladas se mantuvieron almacenadas en nitrógeno líquido hasta su descongelación para su evaluación in vitro o su uso en IA. La descongelación se realizó mediante la inmersión en agua circulante a 50ºC durante 12 segundos,

seguido de su redilución en BTS a 37°C (Sellés et al., 2003). La evaluación de la calidad seminal en fresco y postdescongelación se realizó mediante la valoración de los parámetros de motilidad, motilidad progresiva (0-5), estado del acrosoma (NAR) y la integridad de membrana mediante la tinción con eosina-nigrosina (EN) y los fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína e ioduro de propidio (DCF).

Inseminación artificial

Tras la detección de celo mediante la presencia del verraco, se inseminaron un total de 75 cerdas multíparas (2° a 5° parto) distribuidas en 4 grupos. 17 hembras fueron inseminadas a las 8 y 24 h de detección del celo, con deposición cervical de semen ($5x10^9$ esp/dosis y 100 ml de volumen de dosis). En los restantes grupos se empleó la sonda Firflex® (Martínez et al., 2002) para la IA-IU. Los grupos 2° y 3° (n= 20) fueron inseminados (24 y 48 h) con $0.5x10^9$ y $1x10^9$ esp/dosis, respectivamente, en un volumen total de 7.5 ml. El 4° grupo (n= 18) fue inseminado (8 y 24 h) con $1x10^9$ esp/dosis y un volumen total de 7.5 ml. Los diagnósticos de gestación se realizaron por ultrasonografía transcutánea 24-28 días post-IA. Se controlaron los datos de retorno a estro, porcentaje de fertilidad y tamaño de camada. La experiencia se realizó durante los meses de mayo a octubre.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de calidad seminal de los eyaculados procesados, en fresco y postdescongelación, se presentan en la tabla n°1. Todas las variables estudiadas se vieron afectadas por el proceso de congelación que produjo una reducción significativa de los valores ($p<0.001$) salvo en la motilidad progresiva que fue superior en el semen congelado. Este fenómeno podría estar relacionado con un patrón de hipermotilidad similar al que presenta el espermatozoide capacitado (Watson, 2000). La calidad seminal en fresco y potsdecongelación fue homogénea en los 9 eyaculados estudiados, sólo se encontró un efecto del eyaculado para el parámetro de motilidad; esta variabilidad de la motilidad podría estar en relación con la subjetividad del proceso de evaluación, que sería menos evidente para el resto de parámetros seminales. De igual modo, Thurston et al. (2002) no encuentran variabilidad entre eyaculados en la calidad del semen descongelado, ya que los sistemas automatizados (biocongeladores programables) permiten reducir al mínimo las diferencias entre eyaculados del mismo macho.

Tabla 1. Resultados de calidad seminal (media ± SEM).

Semen	Motilidad	Motilidad progresiva	NAR	EN	DCF
Fresco	75.56 ± 1.30	3.16 ± 0.08	95.0 ± 0.67	86.33 ± 2.19	82.56 ± 1.72
Congelado	62.07 ± 0.46	3.43 ± 0.03	59.51 ± 0.63	69.62 ± 0.78	57.06 ± 2.71
Anova	<0.001	0.003	<0.001	<0.001	<0.001

Los resultados de fertilidad y prolificidad obtenidos tras la IA se expresan en la tabla n°2. Las tasas de gestación (porcentaje de hembras que no han retornado al estro a los 24 días post-IA) fueron significativamente menores a la IA cervical cuando se utilizó IA-IU a las 24-48 horas. Sin embargo, la tasa de partos únicamente fue significativamente menor para el grupo de IA-IU con $0.5x10^9$ esp/dosis. En todo caso, se hace evidente un elevado número de retornos al estro tardíos que podrían

estar en relación con mortalidades embrionarias tempranas asociadas, posiblemente, a las altas temperaturas a las que fueron sometidos estos animales durante la época en la que tuvo lugar la experiencia (Tast et al., 2002). En cuanto al tamaño de camada, aunque no se alcanzan diferencias significativas entre los distintos grupos (debido a las limitaciones numéricas del ensayo) si podemos indicar una tendencia al descenso de la prolificidad cuando el momento de la IA es tardío (24-48 h).

Tabla nº2. Resultados de fertilidad y prolificidad (media ± SEM).

Protocolo IA (esp/dosis)	IA (h)	Nº cerdas	No retorno 24 días (%)	Fertilidad (%)	LNV	LNT
Cervical (5×10^9)	8-24	17	88.24 ± 8.05^a	64.71 ±11.95^a	8.91 ±1.13	9.45 ±1.21
IU (0.5×10^9)	24-48	20	35.00 ±10.94^b	10.00 ± 6.88^b	7.50 ±1.50	7.50 ±1.50
IU (1×10^9)	24-48	20	45.00 ±11.41^b	30.00 ±10.51^{ab}	6.50 ±1.41	6.67 ±1.33
IU (1×10^9)	8-24	18	66.67 ±11.43^{ab}	27.78 ±10.86^{ab}	8.60 ±2.31	9.00 ±1.95
Anova			0.0043	0.0035	0.6710	0.5314

Podemos concluir diciendo que se confirman las posibilidades del uso del semen congelado para IA en condiciones comerciales (Ruiz et al., 2002; Sellés et al., 2003) obteniendo una fertilidad en IA cervical ($5x10^9$ esp/dosis) similar a la conseguida con semen fresco con el mismo verraco y en la misma época del ensayo ($3x10^9$ esp/dosis, N= 138, % Fert= 73.19%, p= 0.4346), aunque con reducción del tamaño de camada (LNV= 10.31).

En cuanto a la IA-IU, se trata de una técnica que ofrece unas amplias posibilidades, como son la reducción del número de espermatozoides y del volumen de la dosis seminal (Rath et al., 2003). Sin embargo, para una total aplicación de la técnica a nivel práctico es necesario estudiar con profundidad los requerimientos del protocolo y adecuarlos a las condiciones de rutina de la explotación. Deben tenerse en cuenta entre otros, los siguientes factores: número mínimo de espermatozoides por dosis, momento óptimo de aplicación de la dosis, detección adecuada del celo y administración de gonadotropinas para el control de la ovulación (Roca et al., 2002).

BIBLIOGRAFÍA

- Eriksson et al. (2002). Theriogenology. 58: 1065-79.
- Martínez et al. (2002). Reproduction. 123: 163-170.
- Rath et al. (2003). Vet. Rec. (en prensa).
- Roca et al. (2002). Theriogenology. 57: 385.
- Rodriguez-Martínez, H. (2001). 2º Simp. Biotec. Reprod. Anim. Argentina.
- Ruiz et al. (2002). Theriogenology. 57: 480.
- Sellés et al. (2003). Reprod. Dom. Anim. 38: 66-72.
- Tast et al. (2002). Anim. Reprod. Sci. 74: 75-86.
- Thurston et al. (2002). Biol. Reprod. 66: 545-554.
- Watson, PF. (2000). Anim. Reprod. Sci. 60-61: 481-92.
- Watson, PF. & Behan, JR. (2002). Theriogenology. 57: 1683-1693.
- Westendorf et al. (1975). Dtsch. Tierärtzl. Wschr. 82: 261-267.
- Wolken et al. (2002). Theriogenology. 57: 392.