

# Calidad seminal porcina de dosis congeladas durante más de 10 años



SONIA GALIÁN ARNALDOS; BEGOÑA PEINADO RAMÓN; ÁNGEL POTO REMACHA; LAURA ALMELA VERACRUZ.

*Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Equipo de Mejora Genética Animal.*

## RESUMEN

En el banco de germoplasma del IMIDA (Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario) se almacenan 3.977 dosis seminales de cerdo Chato Murciano, pertenecientes a 23 verracos, llevando algunas de ellas más de 10 años conservadas en nitrógeno líquido. Dosis con más de 10 años de almacenamiento fueron descongeladas y se evaluaron, de forma subjetiva mediante observación microscópica, la motilidad individual, el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de espermatozoides viables mediante tinción vital de eosina-nigrosina y el estado del acrosoma. Todos los parámetros se analizaron inmediatamente tras la descongelación y cada hora, durante cuatro horas. Se compararon los resultados con los obtenidos de

esas mismas muestras cuando solo llevaban 24 horas de congelación. Tras análisis estadístico, los resultados muestran una calidad seminal óptima en el momento de la descongelación, pero esta disminuye a lo largo del tiempo en mayor medida que la de dosis descongeladas 24 horas después de ser obtenidas.

**Palabras clave:** *calidad seminal, descongelación, porcino, banco de germoplasma.*

## INTRODUCCIÓN

El IMIDA trabaja en la recuperación de razas autóctonas en peligro de extinción, entre ellas la raza porcina Chato Murciano. Para ello, se mantienen crioconservadas dosis seminales de machos de la raza, obtenidas a lo largo de los años. Concretamente se guardan 3.977 dosis de 23 ejemplares distintos. Algunas de estas dosis llevan más de 10 años congeladas y pertenecen a animales ya fallecidos. Varios autores han encontrado daños en las membranas plasmáticas y acrosomales de los espermatozoides tras su congelación (*Hammerstedt et al., 1990; de Leeuw et al., 1991; Williams et al. 2015*) y por

**TABLA 1**

Valores promedio tras años de congelación.

	Motilidad individual	Móviles (%)	Tinción vital (% viables)	Acrosomas intactos (%)
TIEMPO 0	3,67 ± 0,14*	52 ± 4%*	73,98 ± 3,01%*	72,67 ± 4,11%*
TIEMPO 1	3,70 ± 0,11*	46 ± 3%*	66,25 ± 3,31%*	60 ± 5,70%*
TIEMPO 2	3,52 ± 0,096*	38 ± 3%*	58,80 ± 3,23%*	53 ± 6,18%*
TIEMPO 3	3,31 ± 0,12*	31 ± 3%*	51,25 ± 3,14%*	48,83 ± 5,94%*
TIEMPO 4	2,79 ± 0,24*	20 ± 3%*	44,25 ± 3,46%*	43,70 ± 6,79%*

\* Error estándar de la media.

**TABLA 2**

Valores promedio tras 24 horas de congelación.

	Motilidad	Móviles (%)	Tinción vital (% viables)	Acrosomas intactos (%)
TIEMPO 0	3,75	57,5%	75,78%	69%
TIEMPO 1	3,5	57,5%		
TIEMPO 2	3,25	51,25%		
TIEMPO 3	3,5	70%		
TIEMPO 4	3,5	67,5%		

tanto afectación funcional espermática (Watson, 1981; Gordon, 1994) resultando en una notable disminución de la calidad seminal posdescongelación. A pesar de la menor calidad con respecto al semen fresco, poder utilizar dosis almacenadas durante años sería muy útil en casos de razas en peligro de extinción, donde se cuenta con un número limitado de ejemplares y la utilización de semen de animales ya fallecidos aumentaría la variabilidad genética. Por tanto, si la calidad de estas muestras tras su descongelación fuera óptima, podrían ser utilizadas en inseminaciones artificiales de hembras de Chato Murciano, ampliando así la diversidad genética intrarracial.

## OBJETIVO

El objetivo del estudio es evaluar la calidad seminal de la raza porcina Chato Murciano conservada durante más de 10 años en nitrógeno líquido (muestras congeladas entre los años 1999 y 2005); comparándola con su calidad presentada tras solo 24 horas de congelación. Consecuentemente, se determinará el estado del banco de germoplasma porcino, comprobando si las técnicas de congelación usadas son efectivas a largo plazo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se descongelaron 18 pajuelas de 0,5 ml, a 56° C durante 12 segundos. Todas habían sido congeladas mediante el protocolo Thilmant (1997). El contenido de la pajuela se depositó en un tubo con 4,5 ml de medio BTS atemperado a 37° C donde se mantuvo las cuatro horas que duró su análisis.

Se valoró de forma subjetiva la movilidad individual y el porcentaje de espermatozoides móviles, observando una muestra de 10 microlitros de la dilución espermática en un microscopio de campo claro a 100 aumentos. A cada muestra se le adjudicó un valor entre 0 (motilidad nula) y 5 (motilidad progresiva muy rápida).

Se evaluó la viabilidad de las muestras mediante tinción vital de eosina-nigrosina contándose, a 400 aumentos, 200 espermatozoides y determinando el porcentaje de espermatozoides viables.

Con microscopio de contraste de fases, a 1000 aumentos se determinó la integridad del acrosoma, contándose 100 espermatozoides y expresándose en porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto. La disolución espermática se preparó con una muestra de semen en una solución al 2% de formaldehído en citrato sódico isotónico.

Estos parámetros fueron evaluados inmediatamente tras la descongelación y cada hora tras la misma, hasta cuatro horas después. Se pretende con esto determinar la resistencia de la muestra en el tiempo (test de termorresistencia).

## RESULTADOS

La *tabla 1* muestra los valores promedio obtenidos respecto a la evaluación de la motilidad individual, el porcentaje de espermatozoides móviles, la tinción vital y el estado del acrosoma en los diferentes tiempos de observación de la muestra.

Estos resultados deben compararse con los que se obtuvieron al descongelar las mismas muestras tan solo 24 horas después de su congelación. El promedio de esos valores se muestra en la *tabla 2*. Para los parámetros tinción vital y acrosomas intactos solo se tienen datos a tiempo 0. >



➤ Los valores promedio obtenidos de cada parámetro fueron sometidos a análisis estadístico para determinar si eran significativamente diferentes entre ellos. Se analizó con el programa *Statgraphics® centurion* mediante la prueba F en la tabla ANOVA que determina si hay diferencias significativas entre las medias,

y con la prueba de Rangos Múltiples, evaluando qué medias son significativamente diferentes de otras. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel del 95% de confianza ( $p < 0,05$ ).

TABLA 3

Comparación de medias tinción vital (% vivos)\*.

	n	Media	Grupos homogéneos
Tiempo 4	18	44,25	X
Tiempo 3	18	51,25	XX
Tiempo 2	18	58,80	XX
Tiempo 1	18	66,25	XX
Tiempo 0	18	73,98	X

TABLA 5

Comparación de medias % de espermatozoides móviles\*.

	n	Media	Grupos homogéneos
Tiempo 4	18	20,0	X
Tiempo 3	18	30,83	X
Tiempo 2	18	38,33	XX
Tiempo 1	18	46,11	XX
Tiempo 0	18	51,66	X

TABLA 4

Comparación de medias acrosomas intactos\*.

	n	Media	Grupos homogéneos
Tiempo 4	18	43,71	X
Tiempo 3	18	48,83	X
Tiempo 2	18	53,0	X
Tiempo 1	18	60,0	XX
Tiempo 0	18	72,67	X

TABLA 6

Comparación de medias de movilidad individual\*.

	n	Media	Grupos homogéneos
Tiempo 4	18	2,79	X
Tiempo 3	18	3,32	X
Tiempo 2	18	3,53	X
Tiempo 1	18	3,66	X
Tiempo 0	18	3,71	X

\* No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's.

Al comparar los valores promedios para la tinción vital obtenemos que no son significativamente diferentes en tiempos consecutivos, pero sí aparecen diferencias cuando transcurre más de una hora entre los análisis. En el caso del estado del acrosoma vemos que no existen diferencias significativas a tiempo 0 con tiempo 1, pero sí con los tiempos 2, 3 y 4. La comparación del porcentaje de espermatozoides móviles no muestra diferencias significativas en tiempos consecutivos, pero sí en tiempos alternos. El valor medio a tiempo 4 es significativamente diferente a todos los demás. En cuanto a la media de movilidad individual obtenemos que no existen diferencias significativas en tiempos consecutivos, pero sí en tiempos alternos. El valor medio a tiempo 4 es significativamente diferente a todos los demás.

En la comparación de estos resultados con los obtenidos al descongelar muestras que solo habían estado congeladas 24 horas obtenemos que, para el dato de la movilidad individual, no existen diferencias significativas entre las medias a tiempos 0, 1, 2 y 3, pero sí de estas con respecto a la media a tiempo 4, siendo superior cuando el tiempo de congelación fue de 24 horas. En cuanto al porcentaje de espermatozoides móviles existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en todos los tiempos, siendo superiores los valores promedio obtenidos tras 24 horas de congelación.

Para la tinción vital, que nos da el porcentaje de espermatozoides viables, solo hay datos a tiempo 0 para las muestras descongeladas tras 24 horas. El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre las medias ( $p = 0,000033$ ), siendo superior la obtenida tras 24 horas poscongelación.

Los acrosomas intactos también tienen valores promedio significativamente distintos, pero en este caso fue superior el obtenido tras años de congelación.

## DISCUSIÓN

Los resultados muestran una buena calidad seminal al descongelar muestras de diferentes ejemplares de cerdos de raza Chato Murciano que han estado conservadas en tanques de nitrógeno líquido durante más de 10 años. A pesar de que existen diferencias significativas en los valores medios correspondientes a los parámetros de porcentaje de espermatozoides móviles y tinción vital, siendo estos superiores en muestras que solo



han estado congeladas 24 horas, los valores obtenidos tras años de congelación, 52% de espermatozoides móviles y un 73.98% de espermatozoides viables a tiempo 0 son adecuados para realizar inseminación artificial a hembras de Chato Murciano. Un semen de buena calidad recientemente descongelado, generalmente tiene entre un 40 a 50% de espermatozoides con motilidad progresiva y un vigor de 3-4. Tras dos horas de incubación, estos valores disminuyen entre un diez a un quince por ciento (*Catena y Cabodevila, 1999*). Estos resultados coinciden con lo encontrado en este estudio. El parámetro del estado del acrosoma resultó ser significativamente superior para las muestras congeladas durante varios años (72.67% de espermatozoides con acrosomas intactos frente al 69% obtenido tras 24 horas de congelación). Sin embargo, en los resultados apreciamos un deterioro más rápido de la calidad seminal a lo largo de las cuatro horas que duró el análisis de muestras, que han permanecido congeladas durante varios años con respecto de aquellas que solo lo estuvieron 24 horas (así se aprecia para los parámetros movilidad individual y porcentaje de espermatozoides móviles, para los que se tienen medidas a lo largo del tiempo). Resultados parecidos en cuanto a la resistencia térmica de las dosis descongeladas fueron encontrados por Galina y Valencia, 2006, quienes publicaron que algunas alteraciones de espermatozoides congelados/descongelados no se hacen evidentes inmediatamente tras la descongelación, pero sí tras un periodo de incubación de dos horas. Este dato debe ser tenido en cuenta a la hora de realizar las inseminaciones tras la descongelación de muestras, ya que si bien la calidad de estas es óptima a tiempo 0; es decir, con la muestra recién descongelada, esta calidad disminuye en el tiempo, aun conservando la muestra a la temperatura y en el medio adecuado, por lo que una inseminación artificial una o dos horas tras la descongelación >



➤ sería menos eficaz, ya que la calidad seminal en esos tiempos ha disminuido hasta niveles menos óptimos.

Destacar también de estos resultados que el tiempo que la muestra ha estado congelada no parece ser un factor determinante para su calidad posdescongelación, encontrándose valores superiores en muestras que han permanecido más años crioconservadas con respecto a muestras que llevaban menos tiempo en el tanque de nitrógeno líquido.

## CONCLUSIONES

La calidad promedio del semen de cerdos de raza Chato Murciano congelado durante más de 10 años es óptima para ser utilizado en inseminaciones artificiales de hembras de la raza.

Esto aumenta el número de ejemplares de los que se dispone material genético para el mantenimiento de la raza y confirma que las técnicas de congelación de semen porcino son efectivas a largo plazo.

La calidad seminal de dosis crioconservadas durante años disminuye en el tiempo más rápidamente de aquellas congeladas solo unas horas, por lo que las inseminaciones deben ser realizadas cuanto antes tras la descongelación.

El tiempo que la muestra permanece crioconservada no es el principal factor de deterioro. ■

## BIBLIOGRAFÍA

- Cabodevila J, Catena M. 2012. Evaluación de semen bovino congelado [www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/evaluacion-semen-bovino-congeleado-t29765.htm](http://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/evaluacion-semen-bovino-congeleado-t29765.htm).
- Catena M, Cabodevila J. 1999. Evaluación de Semen Bovino Congelado. *Taurus* 3:18-31.
- De Leeuw FE, Colenbrander B, Verkleij AJ. The role membrane damage plays in cold shock an freezing injury. IN: Johnson LA, Rath D. eds *Boar Semen Preservation II*. Berlin: Paul Parey Sci Publ; 1991: 95-104.
- Galina C, Valencia J. 2006. Reproducción de animales domésticos. Segunda edición. Editorial Limusa SA de CV México. 215-23.
- Gordon I, Laboratory Production of cattle Embryos. Cambridge: CAB International; 1994:640 pp.
- Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what weak them to survive. *J Androl* 1990; 11:73-88.
- Pursel VG, Johnson LA, Rampacek GB. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J Animal Science*, 34: 278 – 283
- Thilmant, P. 1997. Congelation du sperme de verrat en poilette de 0,5 ml. Resultats sur le terrain. *Ann Med Vet*. 141; 457-62.
- Watson PF. The roles of lipids and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil* 1981:62:483-92.
- Williams S, Fernández V, Gavazza M, Marmunti M, Zeinsteger P, Prenna G. Congelación se semen porcino: resultados y avance de la técnica. *Analecta Vet*. 2015; 3(1): 17-25.