



Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas

Swine semen cryopreservation: challenges and perspectives

S. Williams

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Correspondencia: swilliams@fev.unlp.edu.ar

Palabras-clave: criopreservación semen, verraco.

Keywords: boar, cryopreservation, semen.

Introducción

La criopreservación espermática es una biotecnología de gran trascendencia ya que tiene un papel relevante en la conservación y difusión de recursos genéticos.

La gran desventaja de la inseminación artificial con semen refrigerado (IAR) respecto a la inseminación artificial con semen congelado (IAC) es la limitación de la conservación de las dosis, siendo que en la primera se pueden mantener de 2 a 8 días. Esto lleva a que los centros de inseminación deban ofrecer una producción y reparto de dosis refrigeradas muy agilizado; logrando un menor rendimiento en la utilización de los animales más selectos, debido a una limitación en el transporte de las dosis a grandes distancias, y una pérdida de un 10 a un 30% de dosis seminales por caducidad.

En el caso del semen congelado, su conservación podría ser permanente, permitiendo el intercambio de material genético a larga distancia y durante un período muy largo (años). Además, este período de tiempo puede ser crucial para efectuar un control sanitario o genético del semen antes de su uso.

La congelación permite la creación de bancos de semen; de interés evidente en el caso de la preservación de razas en peligro de extinción y de grandes posibilidades para la conservación de líneas o extirpes de especial interés. Esto es importante desde el punto de vista comercial para asegurar la conservación de líneas genéticas valiosas ante posibles situaciones desfavorables (epizootia, incapacidad para recogida, infertilidad/subfertilidad por altas temperaturas).

A nivel práctico permite introducir material genético de gran valor sin los riesgos derivados de la introducción de animales al establecimiento.

Los beneficios del uso de semen congelado son:

1. Una racionalización económica del eyaculado.
2. Realizar la recogida del semen solo en las épocas reproductivas más favorables.
3. El comercio internacional de dosis.
4. Mejor aprovechamiento de los verracos élite.
5. Mayor uniformidad de los animales producidos.
6. Suministro de material genético a granjas con dificultades de abastecimiento de semen fresco/refrigerado.

Como desventajas se pueden citar:

1. La reducida fertilidad y prolificidad de los espermatozoides criopreservados debido a los cambios estructurales y funcionales que sufren los espermatozoides durante el proceso de criopreservación.
2. La disminución de la funcionalidad que dichos espermatozoides tienen en el tracto genital de las cerdas.
3. Las peculiares características anatómicas del aparato genital de la hembra que dificulta a los espermatozoides el poder llegar al oviducto.
4. La mala calidad de los embriones producidos que condicionan su posterior viabilidad.

Las particularidades que tiene el espermatozoide del porcino hacen que sea muy sensible al choque por frío, que produce una alteración de funcionalidad de la membrana espermática y la viabilidad celular se ve comprometida. Esto provoca un acortamiento de la sobrevida del mismo y por ende de su período fértil. Se dice que sufren una precapacitación con disminución de su vida útil en el tracto genital de las hembras. A esto se le suma la característica de las hembras porcinas de tener un celo muy largo, con un período prolongado de ovulaciones en comparación con otras especies, dificultando más la fecundación y prolificidad logradas con semen congelado.

Uno de los problemas a solucionar es el mayor costo que presentan las muestras seminales congeladas, esto se debe a:

- El número de espermatozoides por dosis es sensiblemente mayor en el caso de semen congelado frente al refrigerado para asegurar unos buenos resultados reproductivos ($5-6 \times 10^9$ esp. vs. $2-3 \times 10^9$ esp. respectivamente). Así de un solo eyaculado se pueden producir la mitad de dosis inseminantes.
- La producción de las dosis es más costosa en tiempo y materiales, requiere en equipamiento sofisticado y oneroso.
- El mantenimiento de las dosis en tanques de nitrógeno líquido es costoso.
- Requiere una adaptación de los productores a una nueva técnica y capacitación del personal para el manejo de semen congelado.



Efecto de la criopreservación sobre la funcionalidad y estructura espermática

El proceso de la criopreservación incluye una serie de pasos, que producen alteraciones estructurales de las membranas, alteración de la motilidad, modificación del medio interno, efecto sobre el citoesqueleto y efectos sobre el núcleo:

1. Alteración estructural de las membranas (plasmática, acrosómica y mitocondrial): se produce una pérdida de enzimas intracelulares y trastornos en el balance iónico, un detrimento de la permeabilidad selectiva del plasmalema y trastornos en el metabolismo aeróbico y glucólisis anaeróbica, comprometiendo todas aquellas funciones celulares energético-dependientes como la motilidad.
Se produce pérdida de enzimas responsables de la metabolización de los ROS (radicales del stress oxidativo) y la disminución de los compuestos antioxidantes en el medio extracelular tras la dilución y/o centrifugación previa a la congelación.
Las diferencias en la composición química de la membrana espermática podrían explicar la variabilidad individual al congelado-descongelado.
2. Modificación del medio interno: alteraciones en el balance iónico de sodio, zinc, calcio que se acumulan en el espacio intracelular, y del potasio y magnesio que salen masivamente de la célula. Esto se debe a que las proteínas de la membrana que funcionan como bomba de iones disminuyen su actividad con el descenso de temperatura.
3. Efecto sobre el citoesqueleto: se afecta su función estabilizadora del plasmalema, debido al comportamiento de despolimerización y repolimerización dependientes de la temperatura.
4. Efectos sobre el núcleo: supercondensación de la cromatina nuclear con incremento en la fragmentación del ADN del núcleo de los espermatozoides porcinos tras el proceso de congelación-descongelación.

Echegaray, afirma que para congelar semen de verraco es absolutamente necesario realizar una selección previa de los animales que se van a utilizar: 1. Selección de los verracos por buena calidad seminal (motilidad superior al 80%, vigor mayor a 4, y 80% de acrosomas normales), 2. Selección de verracos por buena congelabilidad, considerándose como un mínimo exigible que las dosis descongeladas de los mismos presenten al menos un 35% de motilidad individual.

Diferentes métodos para la evaluación de la integridad del acrosoma en semen diluido

Para evaluar la fertilidad potencial de un verraco, el análisis mínimo necesario para evaluar la calidad del semen comprende el análisis de la concentración, motilidad y morfología; como estos parámetros tienen limitaciones, otros análisis incluyen la evaluación de la membrana de espermatozoides y la integridad de la acrosoma, que es esencial para la fecundación de ovocitos. Es importante determinar la capacidad de diferentes métodos para evaluar la integridad del acrosoma (Williams et al., 2009a).

La evaluación mediante el uso de microscopio de contraste de fase distingue acrosomas intactos y dañados, pero no el grado de daño. El Pisum sativum aglutinina es una aglutinina de arveja comestible que se une gliconjugados del acrosoma; tiene afinidad para los residuos de α -D-glucosil y α -D-mannosyl terminales de glicoproteínas y se une específicamente a la α -manosido de azúcar que se encuentra en el contenido acrosomal. El fluorocromo PSA tiñe los acrosomas dañados con un color amarillo-verdoso, y permite la diferenciación entre espermatozoides intactos y espermatozoides sin acrosoma, con acrosoma dañado y con el acrosoma presente sólo en la región ecuatorial. Basado en nuestros resultados, la técnica PSA mostró que este procedimiento tiene una mayor capacidad para detectar grados de acrosoma dañado.

Medición de parámetros de calidad seminal según etapas durante el proceso de criopreservación

Desde los primeros estudios sobre la conservación del semen, se ha comprobado que el espermatozoide del cerdo tiene mayor sobrevivencia a la conservación al estado líquido y refrigerado (15°C) que a la preservación por congelación. Con el descenso de la temperatura, hay una inevitable reducción de la proporción de espermatozoides que mantiene la normal integridad de membrana, su ultraestructura y la composición bioquímica. El proceso de congelación de semen porcino, comprende una serie de etapas que responden a las características propias de la especie. Nuestro objetivo ha sido analizar las variaciones de la calidad espermática de muestras de semen porcino, en respuesta a las etapas durante la congelación (Williams et al., 2009b).

Las variaciones en la motilidad y el vigor se estudiaron en semen: 1) fresco, 2) a 23°C; 3) a 15°C, 4) previo al enfriamiento (a 5°C, una vez diluido en medio comercial, Boarciphos A, IMV®) y 5) una vez finalizado el enfriamiento y antes de la congelación (previa dilución con medio comercial Boarciphos B, IMV®). La vitalidad y la integridad del acrosoma fueron analizados en fresco, y a los 23°C y 15°C. Todas las muestras fueron descongeladas y analizadas, previa dilución en medios comerciales de descongelación. Los datos obtenidos, se utilizaron para confeccionar curvas y demostrar las variaciones de la calidad de semen durante el proceso de la criopreservación.

En la Fig. 1 puede observarse como desciende la calidad del movimiento y el vigor de todas las muestras durante las diferentes etapas, previas a la congelación. La motilidad muestra una disminución del 13%



(de 76 a 69%), luego del primer descenso térmico a 23°C, sin embargo, se mantiene estable, hasta luego del enfriamiento. La curva de vigor muestra una variación similar, observándose un descenso al principio, pero estabilizándose durante el proceso. Sin embargo, la calidad del semen desciende marcadamente luego de la descongelación, observándose que la motilidad disminuye casi un 25%, siendo más marcada el descenso en el vigor (96%). El efecto deletéreo de la congelación-descongelación puede observarse sobre la vitalidad y la integridad del acrosoma (Fig. 2) disminuyendo un 34 y 26%, respectivamente, luego de la descongelación. El mayor daño se produciría con el descenso de las temperaturas, posiblemente por cambios en la estructura lipídica de la membrana plasmática de la célula espermática (Maxwell y Johnson, 1997; Watson, 2000) Asimismo, la cristalización del agua del medio e intracelular durante la congelación, provoca daños irreversibles, puestos de manifiesto en la disminución de los parámetros estudiados (Courtens y Paquignon, 1985).

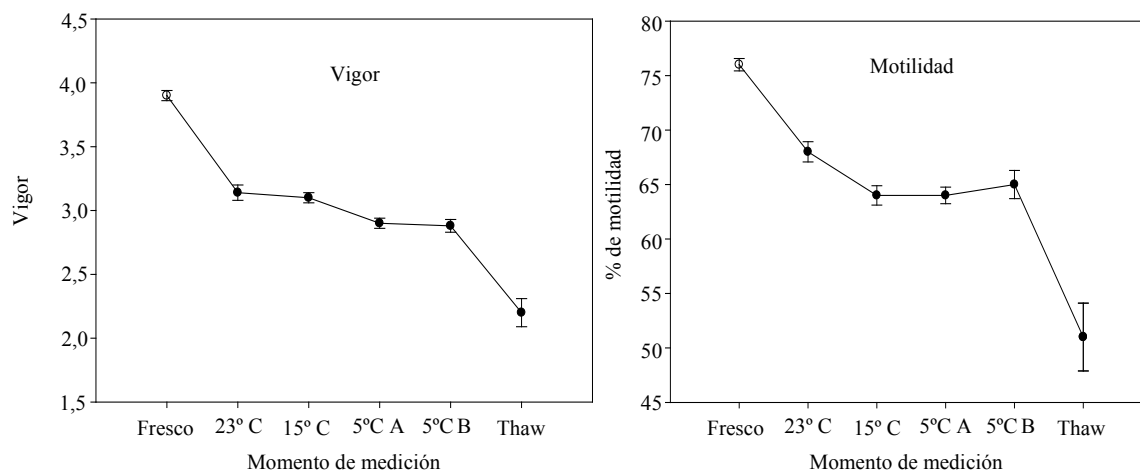


Figura 1. Variaciones de la motilidad y del vigor para semen porcino, según etapas del proceso de criopreservación.

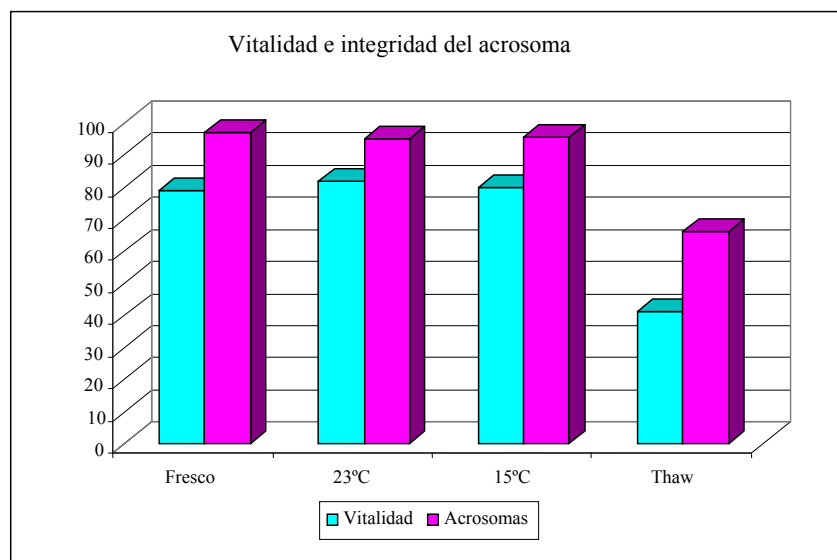


Figura 2. Variaciones de la vitalidad y la integridad del acrosoma para semen porcino, según etapas del proceso de criopreservación.

Variaciones individuales en el perfil de ácidos grasos de espermatozoides porcinos

En los organismos aeróbicos el oxígeno es esencial para la vida, pero puede ser tóxico cuando se presentan situaciones desfavorables en las cuales hay una producción exagerada de especies reactivas del oxígeno (Hicks, 2001). Las membranas de los espermatozoides son ricas en ácidos grasos polinosaturados y son sensibles al daño oxidativo mediado por el proceso de peroxidación lipídica (Sheweita et al., 2005). La peroxidación lipídica es causa potencial de infertilidad en machos de numerosas especies. Los niveles en los cuales los espermatozoides pierden movilidad in vitro se correlacionan con la tasa de peroxidación lipídica que

sufren. Los espermatozoides porcinos son muy sensibles al proceso de congelación-descongelación (Watson, 1995), por lo cual es importante determinar el perfil de ácidos grasos y la susceptibilidad a la peroxidación lipídica en muestras de semen porcino al estado fresco (Marmunti et al., 2009).

Las variaciones individuales en el perfil de ácidos grasos observadas en las muestras analizadas podrían influir en la supervivencia del semen porcino de diferentes individuos al proceso de congelación-descongelación. Se considera que la composición química de la membrana plasmática del espermatozoide es responsable de la susceptibilidad al congelado entre especies (Parks y Lynch, 1992) Sin embargo diferencias intra especies podrían contribuir a la variabilidad individual (Medrano y Holt, 1998).

Nuestros resultados indican que el semen porcino contiene grandes cantidades de ácidos grasos no saturados, los cuales fueron vulnerables a la peroxidación lipídica. La alteración en la composición de los mismos sería la base común de diferentes procesos degenerativos.

Efecto antioxidante de lycopersicum esculentum en ensayos con semen porcino

Los antioxidantes son sustancias que cuando se encuentran presentes en bajas concentraciones respecto a los sustratos oxidables, retrasan o anulan la oxidación de dicho sustrato (Faudale et al., 2008) Existen evidencias de que los carotenoides podrían actuar como antioxidantes para la prevención de muchas enfermedades. El licopeno se halla casi exclusivamente en el tomate y sus productos. Se trabajó con muestras de semen porcino durante las diferentes etapas del proceso de criopreservación: 1) a 15°C, 2) 15°C + medio Boarciphos A (previo al enfriamiento), 3) a 5°C + medio Boarciphos A y 4) a 5°C + medio Boarciphos A + B (Prenna et al., 2012a).

Los valores de emisión lumínica de las diferentes etapas del proceso de criopreservación (Figura 3) fueron estadísticamente significativos cuando se compararon las muestras controles con las que contenían ascorbato. Comparando los valores de la emisión lumínica de las muestras con ascorbato, se observó que en presencia del antioxidante los valores fueron más bajos. Durante el proceso de peroxidación lipídica, se observó que el porcentaje de ácidos grasos (AG) no saturados de las muestras tratadas con ascorbato (31,3%) disminuyó significativamente con respecto a los controles (53,73%). El porcentaje de AG no saturados de las muestras con el antioxidante fue de aproximadamente 62,03% siendo este valor similar al de las muestras controles (Prenna et al., 2012a).

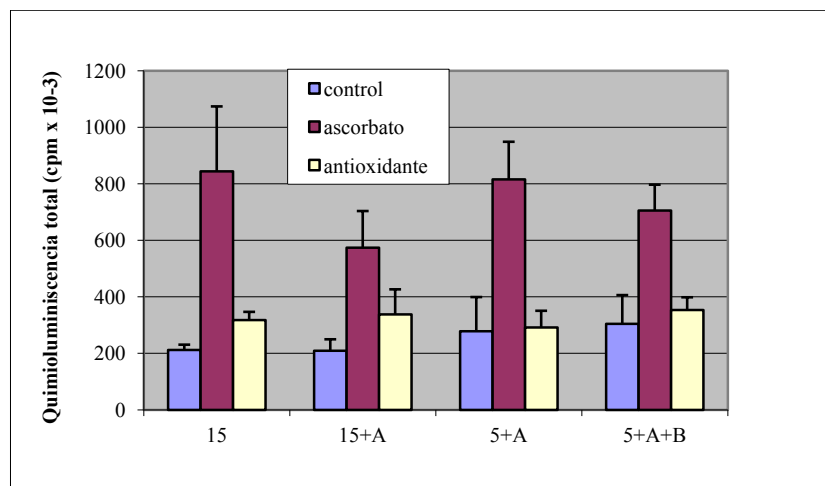


Figura 3. Valores de emisión lumínica de las diferentes etapas del proceso de criopreservación.

Los antioxidantes previenen la lipoperoxidación utilizando diferentes mecanismos. El licopeno posee una elevada capacidad in vitro para ligarse al oxígeno singulete. Nuestros resultados indican que la lipoperoxidación podría ser uno de los mecanismos bioquímicos responsables de los cambios fisiológicos durante la criopreservación. El licopeno ejerció un efecto protector ya que los principales AG no saturados no fueron afectados por el proceso de lipoperoxidación.

Criopreservación de semen porcino utilizando distintas concentraciones de glicerol y dodecil sulfato de sodio

Durante el proceso de congelación, con el descenso de la temperatura, hay una inevitable reducción de la proporción de espermatozoides que mantiene la normal integridad de membrana, su ultraestructura y la composición bioquímica, siendo el espermatozoide del cerdo el de mayor susceptibilidad respecto a otras



especies. Para disminuir estas alteraciones, se utiliza el glicerol como crioprotector más un agente surfactante como el dodecil sulfato de sodio (SDS: por sus siglas en inglés) con un efecto beneficioso al producir la solubilización de las membranas y sus componentes (Peña et al., 1998). Se analizaron distintas concentraciones de glicerol y de SDS para evaluar el impacto en la calidad espermática durante el proceso de congelación-descongelación (Miglio et al., 2012).

Luego del enfriamiento a 5°C, cada eyaculado fue dividido en 4 alícuotas y diluidas en medios con diferente concentración de glicerol y SDS: I) 4% de glicerol y 1% de SDS; II) 4% de glicerol y 0,5 % de SDS; III) 2% de glicerol y 1% de SDS y IV) 2% de glicerol y 0,5% de SDS. Durante el proceso de congelación, se tomaron muestras para contrastar la calidad seminal: 1) diluido a 23°C; 2) a 15°C, 3) a 15°C, diluido en medio comercial A (20% de yema de huevo); 4) 5°C con medio A; 5) al finalizar el enfriamiento a 5°C y con el agregado del medio comercial B (yema de huevo, y glicerol+SDS en sus diferentes concentraciones) y 6) descongelado diluido en medio comercial de descongelación. Se evaluaron en cada etapa motilidad (0-100%), vigor (escala 0-5), vitalidad (tinción vital de eosina-nigrosina) e integridad del acrosoma (tinción fluorescente de pisum sativum agglutinin). Se calcularon los índices de congelabilidad (coeficiente entre el valor de la muestra descongelada/valor en cada paso del proceso, para cada uno de los parámetros), y la comparación entre los medios I; II; III y IV se realizó por análisis de varianza (procedimiento CATMOD de SAS®, 2002).

Comparando los distintos valores de calidad evaluados, con los medios con glicerol al 4% (I y II) se obtienen valores aceptables en todos los parámetros estudiados, resultados similares a los obtenidos por Corcuera et al. (2007), quienes compararon distintas concentraciones de glicerol en el medio de congelación. Con respecto a la concentración de SDS, los mejores resultados se obtuvieron con la menor concentración, resultando la mejor combinación la de 4% de glicerol y 0,5% de SDS, coincidente con la utilizada por Córdoba-Izquierdo et al. (2006).

Si bien sólo el medio IV mostró diferencias significativas en motilidad, considerando en conjunto los demás parámetros (vitalidad y fundamentalmente acrosomía), se puede concluir que el medio II reúne las mejores condiciones de protección a los espermatozoides a la injuria durante el proceso de criopreservación.

Daño ultraestructural en la membrana de espermatozoides porcinos durante el proceso de congelación-descongelación

Las alteraciones del espermatozoide porcino durante el proceso de congelación-descongelación pueden ser diagnosticadas mediante el microscopio óptico, pudiéndose complementar con la microscopía electrónica para evaluar el daño ultraestructural que sufre la célula espermática durante el proceso de congelación. Previo al enfriamiento se prepararon dos alícuotas, las que fueron diluidas con diferentes volúmenes de los diluyentes de enfriamiento, lo cual hizo que la concentración final de cada pajueta (0.5 ml) fuera de 300 ó 750 x 10⁶ espermatozoides (T300 y T750 respectivamente). Se tomaron muestras pos-enfriamiento (5°C) y al momento de la descongelación (T300 y T750), las que fueron centrifugadas y fijadas para ser remitidas al Servicio de Microscopía Electrónica. Se analizaron el grado de deformación de la membrana citoplasmática, a razón de 3 medidas en la cabeza/espermatozoide, expresadas en micras. El promedio de la separación entre membranas fue de 0.05 ± 0,01; 0.28 ± 0,13, y 0.61 ± 0.42 a los 5°C y a la descongelación para T300 y T750, respectivamente, hallándose diferencias estadísticamente significativas (P < 0.01) entre 5°C y T750. De los datos obtenidos se puede concluir que la microscopía electrónica es una herramienta útil para confirmar el daño ultraestructural, y pone en evidencia el efecto deletéreo del aumento del número de espermatozoides por pajueta (Prenna et al., 2012b).

Referencias

- Corcuera BD, Marigorta P, Sagüés A, Saiz-Cidoncha F, Pérez-Gutiérrez JF.** Effect of lactose and glycerol on the motility, normal apical ridge, chromatin condensation and chromatin stability of frozen boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.67, p.1150-1157, 2007.
- Córdoba-Izquierdo A, Oliva JH, Lleó B, García-Artiga C, Corcuera BD, Pérez-Gutiérrez JF.** Effect of different thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. *Anim Reprod Sci*, v.92, p.145-154, 2006.
- Courtens JL, Paquignon M.** Ultrastructure of fresh, frozen and frozen-thawed spermatozoa of the boar. In: *International Conference on Deep Freezing Boar Semen*. Uppsala, 1, 1985, Sweden. *Proceedings...* Uppsala, Sweden: Swedish University of Agriculture Science, 1985. p.61-67.
- Echegaray A.** ¿Para cuando el semen porcino congelado? *Venezuela Porcina*, v.17, n.48, p.3-5, 2001.
- Faudale M, Viladomat F, Bastida J, Poli F, Codina C.** Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J Agric Food Chem*, v.56, p.1912-1920, 2008.
- Hicks JJ.** *Bioquímica*. México, DF: Mc Graw-Hill, 2001. 900p.
- Marmunti M, Gavazza M, Williams S, Gutierrez Am, Piergiacomi V, Palacios A.** Variaciones individuales



en el perfil de ácidos grasos de espermatozoides porcinos. In: Congreso Brasileiro de Veterinarios Especialistas em Suinos (ABRAVES), 14, 2009, Uberlândia, MG, Brasil. Uberlândia: ABRAVES, 2009. p.239-240

Maxwell WMC, Johnson LA. Membrane status of boar after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, v.48, p.209-219, 1997.

Medrano A, Holt WV. Inter-individual boar sperm susceptibility to freezing-thawing protocols. *Arch Zootec*, v.47, p.319-327, 1998.

Miglio, A; Prenna, G; Fernández, V; de la Sota, RL; Williams, S. 2012. Criopreservación de semen porcino utilizando distintas concentraciones de glicerol y dodecil sulfato de sodio. In: Congreso Nacional de Producción Porcina, 9; Congreso de Producción Porcina del Mercosur, 6, 2012, Salta, Argentina. Salta: CNPP, 2012. R2, p.230.

Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-266, 1992.

Peña A, Barrio F, Quintela Arias LA, García Herradón PJ. Effects of sodium dodecyl sulphate on post-thaw dog semen quality during in vitro incubation at 39°C and 22°C. *Reprod Domest Anim*, v.33, p.393-398, 1998.

Prenna G, Gavazza M, Marmunti M, Williams S, Gutierrez Ma, Piergiacomini V, Palacios A. Efecto antioxidante de lycopersicum esculentum en ensayos con semen porcino. In: Congreso Nacional de Producción Porcina, 11; Congreso de Producción Porcina del Mercosur, 6, 2012, Salta, Argentina. Salta: CNPP, 2012a. R3, p.231.

Prenna G, Miglio A, Peralta R, Jurado S, Williams S. Daño ultraestructural en la membrana de espermatozoides porcinos durante el proceso de congelación-descongelación. In: Jornadas Internacional del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), 3, 2012. Buenos Aires: INITRA, 2012b. CDROM.

Sheweita SA, Tilmisany AM, Al-Sawaf H. Mechanism of male infertility: role of antioxidants. *Curr Drug Metab*, v.6, p.495-501, 2005.

Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of the post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, v.7, p.871-891, 1995.

Watson PF. The causes of reduced fertility of cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*, 60/61, p.481-492, 2000.

Williams S, Fernández V, Gabilondo D, Valette E, De La Sota RL. Study of different methods to evaluate acrosome integrity in diluted boar semen. In: International Conference on Pig Reproduction (ICPR), 8, 2009, Banff, AL, Canada. Banff, AL: ICPR, 2009a. p.137.

Williams S, Fernandez V, Iglesias L, Barrales H, Proclemer E, de la Sota RL. Medición de parámetros de calidad seminal según etapas durante el proceso de criopreservación. In: Congreso Brasileiro de Veterinarios Especialistas em Suinos (ABRAVES), 14, 2009, Uberlândia, MG, Brasil. Uberlândia: ABRAVES, 2009b. p.623-624.
