

## COMUNICACIÓN

# ESTUDIOS PRELIMINARES EN LA CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES PORCINOS DE RAZA CHATO MURCIANO\*

## PRELIMINARY RESULTS ON THE CRIOPRESERVATION OF CHATO MURCIANO BOAR SPERM\*

Peinado, B.<sup>1</sup>, A. Poto<sup>1</sup>, J. Gadea<sup>2</sup> y S. Ruíz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo Agroalimentario. La Alberca. 30150 Murcia. España.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Animal (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad de Murcia. 30071 Murcia. España.

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Porcino. Semen congelado. Calidad seminal.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Pig. Frozen sperm. Semen quality.

### RESUMEN

La aplicación de la técnica de crioconservación espermática podría ayudar a la conservación del material genético durante largos periodos de tiempo. En este trabajo se han realizado una serie de estudios preliminares sobre la posibilidades de crioconservación de los eyaculados de verracos de la raza porcina autóctona Chato Murciano, que en la actualidad se encuentra en peligro de extinción.

A partir de los eyaculados, obtenidos con frecuencia semanal, las dosis seminales fueron sometidas a congelación (Westendorf *et al.*, 1975), envasadas en maxipajuelas de 5 ml y posteriormente almacenadas en nitrógeno líquido. La evaluación de las muestras se realizó tras la descongelación de las mismas, analizándose los siguientes parámetros: motilidad y calidad de movimiento, integridad estructural de membrana (tinción eosina/nigrosina), estado del acrosoma e integridad funcional de membrana (test

diacetato de carboxifluoresceína). Los resultados obtenidos muestran que se deben seguir haciendo estudios para intentar mejorar la calidad del semen congelado descongelado para que esta técnica pueda ser utilizada como una herramienta útil en los planes de recuperación y de conservación de especies y razas.

### SUMMARY

The use of sperm cryoconservation technique would help to the preservation of genetic material for long term. This work was carried out in order to develop preliminary studies regarding boar sperm cryoconservation in the autochthonous pig breed Chato Murciano nearly extincted at present.

The seminal doses were obtained from ejaculates of these boars and criopreserved weekly (Westendorf *et al.*, 1975), the sperm was stored in liquid nitrogen in maxi-straws. Post-thawing semen analyses were carried out on every sample, and the parameters studied were: sperm motility, quality of movement, normal apical

\*Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT). Proyecto AGF96-1069.

ridge (NAR), viability with eosin-nigrosin stain and functional membrane integrity (with carboxyfluorescein diacetate, DCF). The results showed that further studies are needed to improve the quality of frozen-thawed sperm to make this technique a useful tool in the field of breed and species preservation.

## INTRODUCCIÓN

Con los nuevos planteamientos industriales y los cambios producidos en la alimentación y forma de vida rural surgidos en la mitad de la década de los 60, la raza porcina Chato Murciano fue literalmente barrida del panorama ganadero de la Región de Murcia (Herranz, 1987). En la actualidad existen escasos ejemplares (siete machos, doce hembras y varios lechones) distribuidos principalmente en dos núcleos de la región (el Centro de Capacitación Agraria de Lorca y en la pedanía murciana de Beniaján), además de otros dos machos y tres hembras recientemente localizados en núcleos aislados.

El interés que hoy día puede tener la recuperación de esta raza radica no sólo en la conservación del patrimonio genético regional sino también en algunas peculiaridades de la misma que la hacen atractiva. Por una parte, se ha comprobado la mayor resistencia que presentan estos animales a enfermedades como la rinitis o la neumonía enzoótica, que causan numerosas pérdidas económicas al cabo del año en las diferentes explotaciones, junto con una perfecta aclimatación a las duras condiciones estivales del sureste español que las razas comúnmente explotadas soportan con gran dificultad.

Por otro lado, la comercialización de su carne podría presentar posibilidades en el mercado debido a sus características organolépticas específicas. Este hecho, unido a su gran poder transformador de subproductos de la huerta en carne (pueden alcanzar los 220 kg de peso en adultos), tipifican a los *Chatos murcianos* como un producto regional de especial valor.

Entre las posibles pautas a seguir para la recuperación de esta raza se encuentra la creación de un banco de semen congelado que garantice en todo momento la disponibilidad de gametos masculinos para fecundar a las hembras de esta raza. Al margen de las ventajas que ofrece la crioconservación de semen por sí misma en cualquier explotación porcina (Bwanga, 1991), en el caso del *Chato murciano*, en grave riesgo de extinción, la posibilidad de contar siempre con espermatozoides de los escasos ejemplares que quedan garantizaría la viabilidad de cualquier plan de recuperación ante eventuales contratiempos como la enfermedad o la muerte de algún reproductor.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### RECOGIDA DE SEMEN Y CONGELACIÓN

Se ha trabajado con 3 verracos de raza Chato-Murciano y 1 verraco de raza Blanco Belga ubicados en el Centro de Capacitación y Experiencias Agrarias de Lorca (Murcia). La obtención de semen se realizó con una frecuencia semanal mediante método manual. Del eyaculado solamente se utilizó para su procesado la fracción rica en espermatozoides.

## CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL CERDO CHATO-MURCIANO

La técnica empleada para la congelación de las muestras seminales (Westendorf *et al.*, 1975) consiste en la recogida del semen sobre termo atemperado (37°C) con 100 ml de diluyente comercial y descenso térmico de 37°C a 23°C en un periodo de 1 h, cuando la temperatura alcanza 32°C se completa la dilución seminal hasta el grado 1:2. Previamente, se realiza el estudio de la calidad y concentración espermática, calculándose el número de dosis a  $5 \times 10^9$  espermatozoides. A continuación, las muestras se centrifugan (800g 10 min, 15°C) y se resuspende el sedimento, hasta 3 ml/dosis, con el diluyente nº 1 (lactosa 11 p.100, yema de huevo 20 p.100 y OEP 0,3 p.100). Se hace descender la temperatura de 23 a 15°C en 1 h y se equilibran las muestras a 15°C durante 2,5 h con un nuevo descenso térmico de 15°C a 5°C en 30 min. Finalmente, se completa hasta 5 ml/dosis, a 5°C, con diluyente nº 2 (lactosa 11 p.100, yema de huevo 20 p.100, OEP 0,3 p.100 y glicerol 2 p.100). El proceso termina con el envasado de las dosis seminales en maxipajuelas de 5 ml, exposición a vapores de nitrógeno líquido (3-5 cm de altura) durante 20 min, congelación y conservación en tanque de nitrógeno líquido.

### DESCONGELACIÓN Y EVALUACIÓN DEL SEMEN

Las pajuelas de semen congelado fueron introducidas, para proceder a su descongelación, en baño atemperado a 42°C durante 45 segundos. Posteriormente, se diluyeron 1:20 en un diluyente comercial para la evaluación de la calidad seminal.

La motilidad se evaluó mediante la

observación en un microscopio de campo claro a 100 aumentos de una doble muestra de 10 ml de semen depositado sobre un portaobjetos precalentado en una placa termostaticada a 39°C. Se valoró el porcentaje de espermatozoides con movimiento (0-100) y el tipo de movimiento rectilíneo, progresivo y rápido de 0 a 5.

El estado del acrosoma de las células espermáticas se analizó en una muestra fijada, para lo que se diluyó un volumen de 250 µl de semen en 1 ml de una solución al 2 p.100 de glutaraldehído en PBS. Se observó una muestra de 10 µl en un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos con objetivo de inmersión. Se visualizaron al menos 200 espermatozoides, clasificando como acrosomas normales aquellos que presentaban espermatozoides con bordes apicales bien definidos y nítidos en forma de semiluna oscura (Pursel y Johnson, 1974). Los resultados se expresaron en porcentaje de acrosomas normales.

Se estimó la vitalidad espermática mediante la tinción de eosina-nigrosina (EN) descrita por Eliasson y Treichl (1971). Una muestra de semen y un volumen igual de una solución de eosina-nigrosina (5 p.100 (p/v) de eosina amarilla, 10 p.100 (p/v) de nigrosina en solución salina) fueron depositados sobre un portaobjetos, se homogeneizó la mezcla y se prepararon extensiones en capa fina. Tras el secado al aire de la extensión, se examinaron bajo microscopía de campo claro a 400 aumentos al menos 200 células, diferenciando aquellas que estaban parcial o totalmente teñidas de las que no habían permitido el paso del colorante. El resultado se expresó como el

**Tabla I.** Rendimiento en el procesado de congelación de las dosis seminales. (Effectiveness of boar freezing technique).

Verraco	Recogidas número	Congelaciones número	Dosis totales	Rendimiento Dosis/congelación
BB	20	17	163	9,59
CH215	29	22	167	7,59
CH222	28	17	87	5,12
CHVIEJO	22	15	129	8,60

porcentaje de espermatozoides no teñidos.

Mediante la técnica de diacetato de carboxifluoresceína (DCF) se estimó la integridad funcional de las membranas espermáticas. A 1 ml de semen diluido con una concentración de 107 espermatozoides/ml se le añadieron 20  $\mu$ l de una solución de diacetato de carboxifluoresceína (0,46 mg/ml en dimetil sulfóxido) y 10  $\mu$ l de una solución stock de formaldehído (12,5  $\mu$ l de formaldehído al 37 p.100 en 1 ml de agua), de acuerdo a la técnica descrita por Harrison y Vickers (1990). La suspensión se incubó 10 minutos a una temperatura de 37°C para posteriormente tomar una muestra de 5  $\mu$ l que se observó bajo microscopía de fluorescencia a 400 aumentos con un filtro G-2A, con excitación a 580 nm. Se visualizaron al menos 200 espermatozoides y se clasificaron como espermatozoides funcionales aquellos que presentaron fluorescencia intensa verde en toda su extensión y como espermatozoides alterados, aquellos que no presentaron fluorescencia o únicamente lo hicieron de manera parcial. Los resultados se expresan en porcentaje de espermatozoides clasi-

ficados como intactos.

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de calidad seminal se expresaron como la media  $\pm$  sem. Éstos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía, considerando como efecto principal el verraco. Los valores porcentuales fueron previamente transformados.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **tabla I** se muestran los resultados obtenidos en el proceso de congelación de las muestras seminales. El reproductor CH222 presenta un menor rendimiento que el resto de machos, ya que en varios días fue desechado por presentar un porcentaje elevado de morfoanomalías espermáticas.

La producción de espermatozoides y en consecuencia el número de dosis seminales que pueden obtenerse a partir de un eyaculado está influenciada por un gran número de factores ambientales como la estación, la alimentación, el ritmo de recogida y, del mismo modo, por grandes diferencias

## CRIOCONSERVACIÓN DE ESPERMATOZOIDES DEL CERDO CHATO-MURCIANO

**Tabla II.** Resultados de la evaluación de semen congelado/descongelado (media  $\pm$  sem). (Frozen-thawed semen evaluation (mean  $\pm$  sem)).

Verraco	Nº	Motilidad (p.100)	Calidad de movimiento (0-5)	Tinción vital (Eosina/Nigrosina) (p.100)	Estado acrosoma (NAR) (p.100)	Test DCF (p.100)
BB	24	46,74 $\pm$ 1,28	3,24 $\pm$ 0,1	54,22 $\pm$ 1,77	40,65 $\pm$ 3,36	32,12 $\pm$ 2,09
CH215	20	40,28 $\pm$ 2,73	3,05 $\pm$ 0,12	45,89 $\pm$ 2,82	39,35 $\pm$ 5,42	24,0 $\pm$ 4,02
CH222	4	37,5 $\pm$ 3,23	3,25 $\pm$ 0,32	46,75 $\pm$ 5,02	39,25 $\pm$ 10,6	25,4 $\pm$ 3,42
CHVIEJO	10	42,5 $\pm$ 3,18	3,0 $\pm$ 0,13	46,30 $\pm$ 3,8	46,1 $\pm$ 6,14	29,75 $\pm$ 5,45

individuales, de tal manera que las diferencias raciales tienen una importancia relativamente menor como se muestra en nuestros resultados mostrados en la **tabla I**.

En la **tabla II** se exponen los resultados obtenidos para la calidad seminal postdescongelación pudiéndose observar como los individuos de raza Chato Murciano alcanzan valores ligeramente inferiores al verraco Blanco Belga, sin que en ningún caso las diferencias alcancen niveles de significación estadística.

La motilidad en todos los machos estudiados está próxima al 40 p.100, muy inferior a los valores medios de semen fresco ( $\pm$ 70-80). Sin embargo la calidad del movimiento se mantiene en unos niveles aceptables (3-3,25) lo que indica que aunque el proceso de congelación daña a un número considerable de células espermáticas, las que consiguen sobrevivir mantienen una funcionalidad similar a la del semen fresco (Gadea, 1997). Los resultados obtenidos mediante el test DCF son inferiores a los de tinción vital valorada con la tinción de eosina-nigrosina (EN), ya que en el primer

caso además de medir la integridad estructural de la membrana se mide también la funcionalidad de la misma (Harrison y Vickers, 1990).

La utilización de la técnica de congelación basada en la utilización de yema de huevo y glicerol descrita por Westendorf *et al.* (1975) no ha sido substancialmente mejorada hasta el momento por ninguna otra. Sin embargo, es posible que ciertas modificaciones puedan mejorar ligeramente los resultados como son las curvas de congelación-descongelación, tipo de envasado, ensayo de nuevos crioprotectores, etc. (Almlid y Johnson, 1988)

Las posibilidades de congelación de semen de raza Chato Murciano permite disponer de gametos conservados durante largos periodos de tiempo y el máximo aprovechamiento de estos animales de excepcional valor genético, lo que puede ir acompañado de otras técnicas de reproducción asistida como el control de la ovulación, la transferencia de ovocitos y embriones, las técnicas de maduración y fecundación *in vitro*, etc. (Gadea *et al.*, 1997; Rath y Niemann, 1997).

BIBLIOGRAFÍA

- Aimlid, T. and L.A. Johnson. 1988. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperatura of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J. Anim. Sci.*, 66: 2899-2905.
- Bwanga, C.O. 1991. Cryopreservation of boar semen. A literatura review. *Acta Vet. Scand.*, 32: 431-453.
- Eliasson, R. and L. Treichi. 1971. Supravital staining of human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 22: 134-137.
- Gadea J. 1997. Predicción de la fertilidad *in vivo* de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Gadea, J., S. Ruíz, P. Coy, A. Poto, B. Peinado, R. Romar, I. Campos y O. Zubillaga. 1997. Fecundación *in vitro* con semen congelado en la especie porcina. 1 Congreso SERGA. Córdoba.
- Harrison, R.A.P. and S.E. Vickers. 1990. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 88: 343-352.
- Herranz, J. 1987. Elogio y reivindicación del cerdo. Ed. CajaMurcia.
- Pursel, V.G. and L.A. Johnson. 1974. Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*, 1: 638-641.
- Rath, D. and H. Niemann. 1997. *In vitro* fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen-thawed epididymal semen obtained from identical boars. *Theriogenology*. 47: 785-793.
- Westendorf, P., L. Ritcher and H. Treu. 1975. Deep freezing of boar semen. Insemination experiments using the *Hulserberger pailleten* technique. *Dtsch. tierarztl. Wochenschr.*, 82: 261-300.