

Biotecnología de la Reproducción Porcina: Estado actual y futuro de las técnicas de análisis seminal

Sergi Bonet, María Dolores Briz, Elisabeth Pinart, Silvia Sancho, Eva Bussalleu, Marc Yeste, Isabel Casas Estela García, Anna Fàbrega y Eva Torner.

*TechnoSperm. Centro de I+D+i en Biotecnología de la Reproducción Porcina. Universidad de Girona.
www.technosperm.com*

La biotecnología de la reproducción porcina incluye el conjunto de técnicas derivadas de la biología celular y molecular destinadas a garantizar la bioseguridad y la trazabilidad reproductivas, incrementar el rendimiento reproductivo y asegurar la reproducción asistida (Bonet et al, 2006).

Entre las técnicas más utilizadas en biotecnología de la reproducción porcina destacan:

- La inseminación artificial (IA) (convencional, postcervical e intrauterina).
- La fecundación *in vitro* (FIV).
- La inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).
- La vitrificación embrionaria.
- La transferencia embrionaria (TE) no quirúrgica.
- La filtración seminal.
- La refrigeración y criopreservación de espermatozoides.
- El sexaje de espermatozoides y de embriones.
- La clonación reproductiva o terapéutica.
- La transgénesis.

Para el correcto desarrollo de dichas técnicas es preciso previamente llevar a cabo un exhaustivo análisis de la calidad seminal. A continuación, se detallan el conjunto de metodologías que llevamos a cabo en nuestro Centro de I+D+i (TechnoSperm) para determinar la calidad seminal y diagnosticar sus patologías.

La calidad espermática de los eyaculados o de las dosis seminales

Incluye los siguientes parámetros: concentración, motilidad, morfología, viabilidad espermática e integridad de membranas, del ADN y de proteínas celulares o plasmáticas.

La concentración, motilidad y morfología espermáticas se determinan mediante una Cámara de Makler, un microscopio óptico dotado de contraste de fases, una cámara digital y un programa informático de análisis seminal (CASA, Computer Assisted Semen Analysis, o ISAS, Integrated Semen Analysis System). Para estudios que requieren mayor detalle de la morfología espermática puede recurrirse a la microscopía de contraste interferencial de Nomarski y a la microscopía electrónica de barrido o de transmisión (Bonet et al. 2000).

La viabilidad espermática e integridad de membranas suele determinarse mediante la tinción específica con fluorocromos y el em-

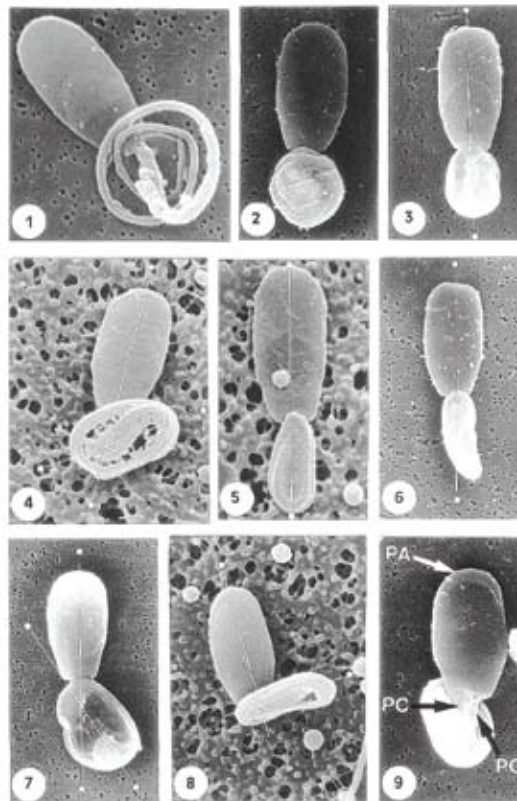


Fig. 1. Imagen al microscopio electrónico de barrido de espermatozoides aberrantes con la cola enrollada. Apréciense las distintas intensidades de enrollamiento y su disposición con respecto a la cabeza del espermatozoide (Bonet et al, 2000).

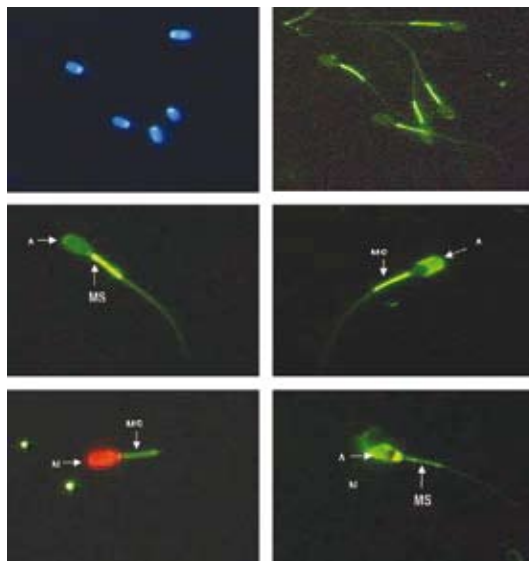


Fig. 2. Integridad de membranas. Múltiple marcaje con fluorocromos y examen al microscopio óptico de fluorescencia. Bis-benzamida: ADN (Azul: células viables). Ioduro de Propidio: ADN (Rojo: células no viables). Mitotracker Green FM: Vaina mitocondrial (Verde intenso: integridad). Alexa Fluor 488: Acrosoma (Verde débil: intacto) (Bussalleu et al. 2005).

pleo de un microscopio de fluorescencia o de un citómetro de flujo (Bussalleu et al, 2005).

La integridad de las membranas plasmáticas y acrosomales también puede determinarse mediante el test ORT (Osmotic Resistance Test) o el HOST (Hypoosmotic Swelling Test) y se basa en el sometimiento de los espermatozoides a soluciones salinas hiposmóticas y su posterior estudio al microscopio óptico de contraste de fases.

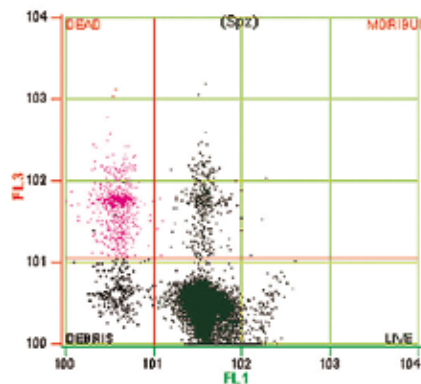


Fig. 3: Viabilidad espermática. Doble marcaje con fluorocromos y examen con el Citómetro de flujo. Yoduro de Propidio (IP) (Rojo/espermatozoides no viables) – SYBR-14 (Verde/espermatozoides viables). (Bonet et al., 2008).



Fig. 4. HOST (Test de Endosmosis). H+: espermatozoide con hinchamiento. H-: espermatozoide sin hinchamiento. El hinchamiento demuestra la correcta funcionalidad de las membranas al retener agua para equilibrar la presión osmótica del medio. (Bonet et al, 2008).

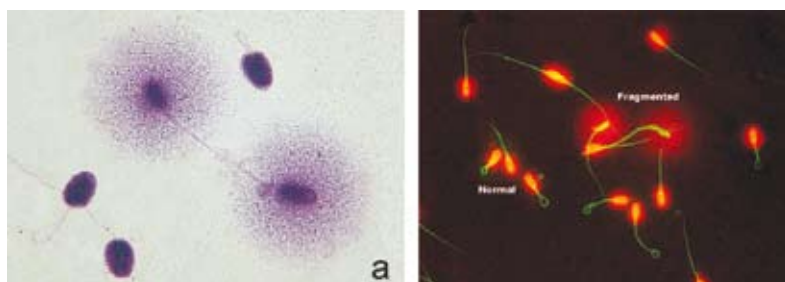


Fig.5. Determinación del Índice de Fragmentación del ADN (DFI) mediante lisis ácida y posterior tinción con Wright (izquierda) o CCF-RG Fluorochrome (García et al., 2006).

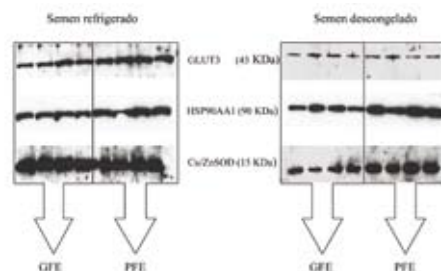


Fig.6. Western blotting de las proteínas GLUT-3, HSP90AA1 y SOD a partir de lisados celulares de espermatozoides procedentes de eyaculados "buenos y malos" congeladores. (Casas et al, 2009)

Es una técnica especialmente usada para predecir la resistencia osmótica de las membranas celulares a los cambios osmóticos que se sucederán a lo largo de los procesos de congelación y descongelación (Bonet et al, 2008).

La integridad del ADN puede determinarse fácilmente con el Test SCD (Sperm Chromatin Dispersion) basada en la lisis de las proteínas asociadas al ADN con una solución ácida y posterior tinción Wright o con un colorante fluorescente (Bonet et al, 2006).

La integridad de proteínas celulares o plasmáticas es fundamental para determinar la funcionalidad de los espermatozoides. Requiere, previamente, de la correcta extracción y solubilización de proteínas celulares, mediante lisis mecánica (sonicación) y lavado con detergentes no iónicos (Tritón X-100) o iónicos (dodecil sulfato sódico, SDS). Tras la transferencia de la muestra biológica del gel a una membrana (*blotting*), se procede al reconocimiento inmunológico de las proteínas (*immunoblotting*). El *Western blotting* se basa en el reconocimiento específico de determinadas proteínas mediante el sistema: antígeno-anticuerpo primario- anticuerpo secundario unido a peroxidasa y adición de un sustrato quimioluminiscente tras la acción de la peroxidasa. La luz emitida es cuantificable y se correlaciona con la cantidad de proteína estudiada. Así por ejemplo, tras el estudio de las HSP90AA1 y SOD, se ha podido determinar que su presencia en espermatozoides es distinta entre eyaculados "buenos y malos" congeladores de semen (Casas et al., 2009). En este sentido, la HSP90AA1 y la SOD pueden ser utilizadas como "marcadores moleculares" de congelabilidad.

La calidad del plasma seminal se determina mediante el análisis de algunos marcadores de la funcionalidad de las glándulas sexuales accesorias: vesículas seminales (fructosa y prostaglandinas), próstata (ácido cítrico, calcio y zinc) y epidídimo (alfa-glucosidasa). El importante papel del conducto epididimario en el complejo proceso de maduración espermática ha hecho que, recientemente, se estudie con mayor detalle los procesos de secreción y absorción de algunos metabolitos (carnitina, glutamato, inositol, etc.) a lo largo de sus regiones (caput, corpus y cauda) y subregiones (R1 a R6). Tras la determinación de la concentración de dichos metabolitos ("marcadores moleculares" de la

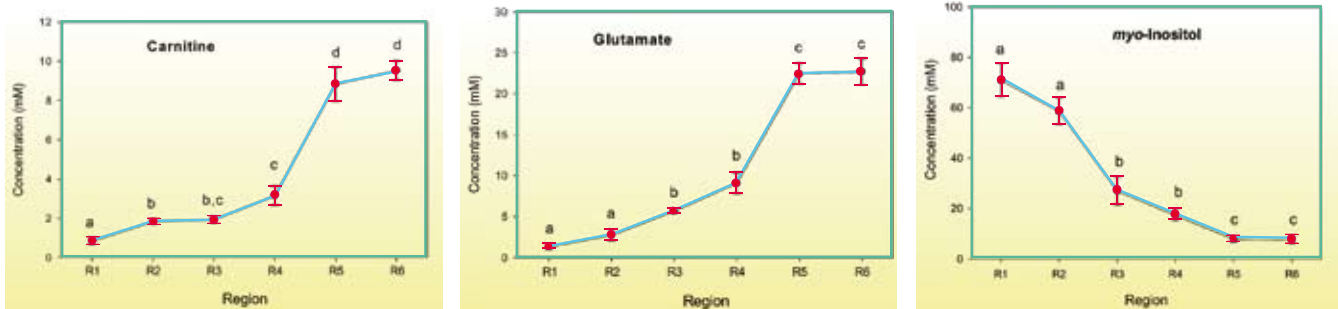


Fig.7. Gráficas que muestran las variaciones en la concentración de Carnitina, Glutamato e Inositol en el fluido epididimario a lo largo de sus 6 subregiones (Pruneda et al., 2006, 2007).

funcionalidad del epidídimo) en el plasma seminal del eyaculado podemos establecer el grado de consecución de la maduración espermática (Pruneda et al., 2006, 2007). La maduración espermática es fundamental para asegurar la aptitud fecundante de los espermatozoides. De otra parte, la mejora que han experimentado, recientemente, los diluyentes de refrigeración de larga duración ha tenido mucho que ver con la adición de metabolitos típicamente de origen epididimario (Yeste et al., 2008).

El estado sanitario del semen se determina mediante la aplicación de la PCR y PCR-RT. La detección de virus (Aujeszky, PRRS, etc.) y de bacterias (Escherichia, Brucella, etc.) en el semen mediante PCR es más fiable y rápido que con otras pruebas más convencionales (cultivos, serología, etc.). (Bussalleu et al., 2009)

El análisis exhaustivo de la calidad seminal es fundamental para la práctica rutinaria y la innovación de cualquier técnica derivada de la biotecnología reproductiva. A lo largo de este artículo hemos dado varios ejemplos de ello (“marcadores moleculares” de la funcionalidad epididimaria, “marcadores moleculares” de congelabilidad, “aditivos moleculares” para el diseño de diluyentes de refrigeración de larga duración, seguridad sanitaria, etc.). A continuación y título de ejemplo, abordaremos su importancia en la mejora reciente de dos técnicas de amplia aplicación en la biotecnología reproductiva porcina: la Inseminación Artificial Postcervical y la Criopreservación Espermática.

La Inseminación Artificial (IA) en porcino puede practicarse depositando el contenido de las dosis seminales en el cérvix (IA convencional o cervical o SAI) o en el útero (IA intrauterina). Esta última modalidad presenta dos variantes: la IA postcervical (PCAI) cuando la dosis semi-



Fig 8. PCR para PRRSV (amplificación de la región de interés de ORF 7). (Bussalleu et al. 2009).

Tabla 1. Resultados obtenidos tras la utilización del catéter para PCAI con semen descongelado (Casas et al, 2009a).

Resultados obtenidos tras el uso del catéter para PCAI con semen descongelado			
a) 21 cerdas inseminadas por grupo			
b) Doble inseminación			
c) PCAI con semen refrigerado en dosis de 30 ml y 1×10^9 espermatozoides por dosis			
d) PCAI con semen descongelado en dosis de 30 ml (15 pajuelas de 0.5 ml + 22.5 ml BTS) y 7.5×10^9 espermatozoides por dosis			
	Semen refrigerado	Semen descongelado (buen congelador)	Semen descongelado (mal congelador)
Motilidad espermática progresiva	67%	52%	5%
Viabilidad espermática	90%	46%	21%
Cerdas preñadas	17	16	5
Partos	17	14	5
Tamaño camada	10.5	9.5	10.5

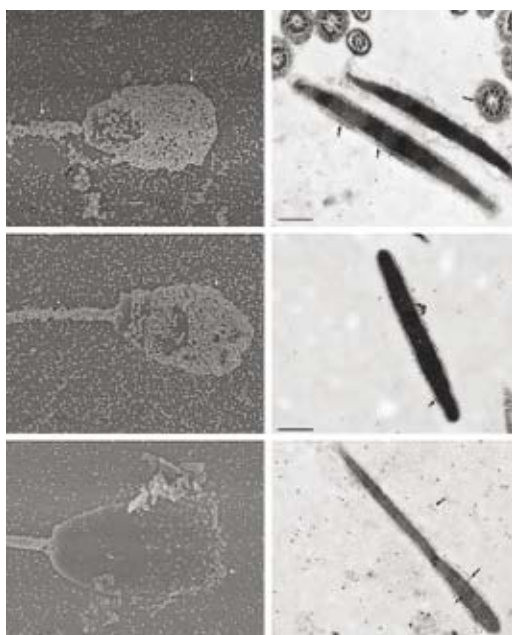


Fig.10. Inmunoglobul para GLUT-3 para SEM (izquierda) y TEM (derecha). Imagen superior: Semen fresco; Imagen media: semen refrigerado a 5°C; Imagen inferior: semen descongelado (Sancho et al, 2007).

nal se deposita inmediatamente tras el cérvix y la IA intrauterina profunda (DUI) cuando la dosis seminal se deposita en la cavidad de los cuernos uterinos. Los catéteres utilizados en cada una de estas modalidades varían en longitud y diámetro dependiendo del tipo de IA que se practique y requieren de personal más preparado cuanto más profundidad alcanza la deposición de la dosis seminal. Por lo general, la IA Convencional (SAI) y la IA PostCervical (PCAI) suelen ser utilizadas para dosis seminales refrigeradas, y la IA Intrauterina Profunda (DUI) se reserva para dosis seminales criopreservadas o sexadas.

Recientemente se va extendiendo el uso de IA PostCervical, tanto en dosis seminales refrigeradas como descongeladas, por las ventajas que ofrece con respecto a la IA Convencional e Intrauterina Profunda, respectivamente. Con semen refrigerado, la PCAI, en comparación con la SAI, permite reducir el volumen de la dosis seminal de los 80 ml a los 30 ml y el número de espermatozoides por dosis de 3×10^9 a 1×10^9 . Con este sistema de IA, de fácil manejo, se reducen costes, se obtienen más dosis seminales por eyaculado y se mantienen los valores de fertilidad y prolificidad. Dada la complejidad del recorrido de los cuernos uterinos, la práctica de la DUI para semen descongelado o sexado requiere de una correcta formación práctica en el

manejo del catéter con el fin de evitar heridas en el útero y pequeñas hemorragias internas. Tradicionalmente, para una DUI bastan con 3-4 pajuelas de 0.5ml y con 0.5×10^9 espermatozoides por pajuela, es decir con dosis seminales de 1.5-2 ml con $1.5-2 \times 10^9$ espermatozoides. Actualmente se están llevando a cabo PCAI con semen descongelado utilizando 15 pajuelas con unos buenos resultados de fertilidad y prolificidad (Casas et al., 2009a).

Utilizando únicamente eyaculados “buenos congeladores” y, ajustando mejor el volumen y concentración de las dosis para PCAI, estamos muy cerca de obtener los mismos resultados que con semen refrigerado y PCAI. Sin lugar a dudas, este hecho, representa un gran avance en el uso rutinario del semen criopreservado tanto para las explotaciones de selección y multiplicación porcina (uso de reservas del patrimonio genético y exportación e importación de dosis seminales) como para los bancos de germoplasma.

La criopreservación espermática en porcino está especialmente indicada para la exportación/importación de semen y para la creación de bancos de germoplasma (reserva de patrimonio genético). La membrana del espermatozoide de porcino es menos resistente a la congelación/descongelación que en otras especies, fundamentalmente, debido a su mayor riqueza en fosfolípidos insaturados. La técnica de criopreservación se ha mejorado mucho en los últimos años permitiendo obtener unos buenos resultados en términos de calidad espermática del semen descongelado. Sin embargo, dicha calidad varía mucho entre verracos e incluso entre eyaculados. Actualmente se está investigando en la detección de “indicadores de congelabilidad” que nos permitan distinguir, antes de congelar, entre verracos/eyaculados “buenos y malos congeladores”. Se ha podido determinar que a lo largo del proceso de congelación/descongelación, el espermatozoide de verraco experimenta cambios en la distribución y presencia de algunos transportadores de membrana, como el GLUT-3, o de proteínas de la familia de las Hsp (Hsp90), de algunos enzimas (SOD, superóxido dismutasa) y de protaminas asociadas al ADN (Sancho et al, 2007; Flores et al. 2008).

A lo largo del proceso de congelación/descongelación se produce una pérdida de los transportadores de glucosa (GLUT-3), hecho que

explica la escasa supervivencia de los espermatozoides descongelados (unas 4 horas, aproximadamente). Como ya ha sido indicado anteriormente, la HSP90AA1 y la SOD son buenos “marcadores moleculares” de congelabilidad y, en este sentido, su presencia en semen refrigerado permite distinguir “a priori” entre eyaculados “buenos y malos congeladores”. Actualmente la investigación se está dirigiendo hacia la determinación de “indicadores de congelabilidad”, no moleculares, que permitan un análisis más rutinario en las explotaciones porcinas y en los centros de inseminación. Se trata de parámetros relacionados con la calidad del movimiento espermático. En este sentido, recientemente se ha demostrado que los eyaculados que congelan “bien” presentan unos coeficientes de Linearidad y de Rectitud en la trayectoria de sus espermatozoides, a los 30 minutos a 5°C, significativamente mejores que los que congelan “mal” (Casas et al., 2009b).

Tabla 2. Indicadores de congelabilidad: Linearidad y Rectitud en la motilidad espermática de eyaculados “Buenos y malos congeladores” (Casas et al, 2009b).

Linearidad y Rectitud para eyaculados “buenos y malos congeladores” (tomados a 5°C a los 30 minutos)		
	Buenos congeladores	Malos congeladores
LIN (%)	42.58 +/- 1.12	37.39 +/- 1.51
STR (%)	62.60 +/- 0.87	57.69 +/- 1.19

LIN=VSL/VCL (Linealidad de la trayectoria)
 STR = VSL/VAP (Rectitud de la trayectoria)
 VCL (Velocidad curvilínea).
 VSL (Velocidad lineal).

Los recientes avances en las técnicas de análisis de la calidad espermática han permitido, a su vez, importantes innovaciones en la biotecnología reproductiva en porcino. La investigación en este campo producirá, en pocos años, muy importantes avances en la aplicación de técnicas reproductivas como la criopreservación espermática, la vitrificación embrinaria, la transferencia embrionaria, el sexaje de embriones y de espermatozoides, y la transgénesis.

Bibliografía

Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, et al. 2008. Biotecnología reproductiva en porcino: estat actual i reptes de futur. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 59: 141-150.

Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, et al. 2000. Morfología Espermática en Porcino (Morphology of Boar Spermatozoa / Morfologia Espermàtica en Porcí). Ed. Institut d'Estudis Catalans. ISBN: 84-7283-533-2. 242 pp. Barcelona.

Bonet S, Martínez E, Rodríguez-Gil JE y Barrera X. 2006. Manual de Técnicas de Reproducción asistida en Porcino. Ed. Universidad de Girona y Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. ISBN 84-8458-241-8. 306 pp. Girona.

Bussaleu E, Glaría I, Pinart E, Andrés DF, et al. 2009. A PCR technique to detect the PRRSV virus in blood and semen samples in boar. 13th Annual Conference of the ESDAR. *Reproduction in Domestic Animals*, 44 (3): 98. Ghent (Belgium).

Bussalleu E, Pinart E, Yeste M, Briz M, et al. 2005. Development of a protocol for multiple staining with fluorochromes to assess the functional status of boar spermatozoa. *Microscopy Research and Technique*, 63: 277-283.

Casas I, Sancho S, Ballester J, Briz M, et al. 2009. Differential expression of GLUT3 and two stress-linked proteins in refrigerated boar semen is related with the ejaculate resistance to cryopreservation. *Theriogenology* (enviado).

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, et al. 2009a. Fertility alter post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Animal Reproduction Science* (doi: 10.1016/j.anireprosci.2009.06.003).

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, et al. 2009b. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology* (doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.07.001).

Flores E, Cifuentes D, Fernández-Novell JM, Medrano A, et al. 2008. Freezing/thawing induces alterations in the protamine-1/DNA overwall structure in boar sperm. *Theriogenology*, 69(9): 1083-1094.

García P, Pérez B y Gosálvez J. 2006. Estudio del nivel de fragmentación del ADN en semen de verraco. Pp: 125-132. En: **Bonet, S.**; Martínez, E.; Rodríguez-Gil, J.E and Barrera, X. 2006.

Manual de Técnicas de Reproducción asistida en Porcino. Ed. Universidad de Girona y Red Temática Nacional de reproducción Porcina. ISBN 84-8458-241-8. 306 pp. Girona.

Pruneda A, Pinart E, Bonet S, Yeung CH, et al. 2006. Study of the polyol pathway in the porcine epididymis. *Molecular Reproduction and Development*, 73: 859-865.

Pruneda A, Yeung CH, Bonet S, Pinart E, et al. 2007. Concentrations of carnitine, glutamate, myo-inositol and sorbitol in epididymal fluid and spermatozoa from boars: comparison of two different semen collection frequencies. *Animal Reproduction Science*, 97: 344-355.

Sancho S, Casas I, Rodríguez-Gil JE, Ekwall H, et al. 2007. Effects of cryopreservation on semen quality and the expression of membrane hexose transporters in the spermatozoa of Iberian pigs. *Reproduction*, 134: 111-121.

Yeste M, Briz M, Pinart E, Sancho N, et al. 2008. Boar spermatozoa and prostaglandin F2alpha Quality of boar sperm after addition of prostaglandin F2alpha to the short-term extender over cooling time. *Animal Reproduction Science*, 108 (1-2): 180-195.