



El Gochu Asturcelta: conservación de germoplasma e inseminación artificial en ganaderías

CARLOS O. HIDALGO ORDÓÑEZ. Área de Selección y Reproducción Animal. cohidalgo@serida.org

CAROLINA TAMARGO MIGUEL. Área de Selección y Reproducción Animal. ctamargo@serida.org

ÁNGEL FERNÁNDEZ GARCÍA. Área de Selección y Reproducción Animal.

M^º JOSÉ MERINO HERNANTES. Área de Selección y Reproducción Animal.

JUAN MENÉNDEZ. Asociación de Criadores de Gochu Astur-Celta (ACGA)

En los últimos años se asiste en España a una rápida pérdida y desaparición de razas de ganado autóctonas, al ser desplazadas por razas de mayor producción. Las primeras, aunque poco competitivas en producción intensiva, constituyen una importante reserva de variabilidad genética, que sería totalmente irrecuperable en caso de desaparición.

Introducción

Según la FAO (Interlaken, 2007), al menos una raza de ganado doméstico ha desaparecido cada mes desde hace 7 años, y en torno al 20 por ciento de las razas ganaderas se encuentran en este momento en peligro de extinción.

Por todo ello, existe la obligación de conservar ese patrimonio con todas las herramientas disponibles. Una vez identificados y caracterizados los recursos genéticos de un país y de una región concreta, se pueden conservar *in situ* o *ex situ*. Los métodos *in situ* mantienen a los animales en el hábitat donde están adaptados, mientras que los métodos *ex situ* sacan los recursos genéticos animales de su medio ambiente tradicional. La conservación *ex situ* incluye la recogida y congelación de semen, óvulos o embriones, mediante la instauración de Bancos de Recursos Zoogenéticos (BRZ). Éstos, además, pueden resultar de gran



Recipiente criogénico en el CBA (Deva) de almacenamiento de las dosis del Banco de Recursos Zoogenéticos de raza Gochu Asturcelta.



ayuda en los programas de cruzamiento, incrementando el tamaño efectivo de las poblaciones, ya que los individuos representados actúan como miembros adicionales de las mismas por tiempo indefinido, suponiendo, junto con la aplicación de las tecnologías reproductivas (inseminación artificial, transferencia de embriones, fertilización *in vitro*, etc.), una contribución importante en la conservación.

Los BRZ tienen gran importancia en la recuperación de las razas y líneas abandonadas. Por otra parte, el almacenamiento de gametos, embriones y tejidos, reduce el coste de la conservación *in situ* y garantiza su mantenimiento en casos de una epidemia, por el riesgo creciente de epizootias o enfermedades emergentes que obliguen a su sacrificio.

Existen razones diversas (económicas, sociales, políticas, religiosas, etc.) por las que determinadas especies han de ser incluidas en un BRZ y estos motivos para su inclusión, son a menudo, interdependientes. Pero independientemente de lo que lleve a la instauración de un banco de estas características, hay que tener claro que, mientras que las razones del almacenamiento pueden cambiar con el tiempo, los productos almacenados no se alteran, por lo que un BRZ tiene un enorme potencial para múltiples aplicaciones, incluso no previstas en el momento de su creación.

Actualmente, en el Principado de Asturias, el Área de Selección y Reproducción Animal del Centro de Biotecnología Animal del SERIDA en Deva, trabaja en la creación de un banco de germoplasma (semen y embriones) de las razas autóctonas en peligro de extinción, que son la vaca Asturiana de la Montaña o Casina, la oveja Xalda, la cabra Bermeya, el poni Asturcón y el "Gochu Asturcelta". En dicho trabajo participa la Dirección General de Ganadería de la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos, involucrando también a las Asociaciones de Criadores (ASEAMO, de la Asturiana de la Montaña; ACOXA, de la oveja Xalda; ACRIBER, de la cabra Bermeya; ACPRA, del Asturcón y ACGA, del Gochu Astur-celta) para la cesión de animales donantes.

Criopreservación de dosis seminales del Gochu Asturcelta con destino al BRZ

Se describen aquí, en orden cronológico, las diferentes fases que se han ido desarrollando con objeto de recoger semen de los donantes seleccionados, para su posterior congelación e inclusión en el BRZ.

Adiestramiento

Las instalaciones necesarias para el desarrollo de una unidad de recogida seminal del cerdo de raza Gochu Asturcelta se componen de las verraqueras destinadas a los cerdos en fase de entrenamiento, otras destinadas a los cerdos en fase de recogida, una sala de colecta de semen, un área de laboratorio y, por último, un local de almacenamiento de los recipientes criogénicos que contienen el banco de germoplasma.

Los machos seleccionados en base a sus aptitudes morfológicas y genéticas por la Asociación de Criadores del Gochu Astur-Celta (ACGA), llegan al Centro de Biotecnología Animal de Deva y, para su *adaptación*, son alojados en unos parques de tierra, sin someterlos a ningún tipo de manipulación especial. Esta fase abarca desde que los animales ingresan en las instalaciones del Centro hasta que alcanzan la pubertad.

Posteriormente se inicia la *fase de adiestramiento*, conduciéndolos a la sala de recogida, para que se familiaricen con el maniquí (también llamado potro de salto), siendo fundamental que dicha tarea la realice la persona encargada de su cuidado y manejo diario. Un verraco puede comenzar a ser entrenado a partir de los 6-7 meses de edad, no debiendo presentar inconveniente alguno para su entrenamiento, aquellos verracos adultos que ya hayan sido usados en monta natural.

El potro debe estar impregnado de olores que estimulen la libido del animal, rociándose para ello con orina de cerda en celo, semen o esmegma de otro



macho, existiendo en el mercado nebulizadores de feromonas de cerda. El operario debe realizar movimientos de vaivén con el maniquí para, posteriormente, mantenerlo inmóvil, representando la inmovilización de la cerda en celo.

Las sesiones de entrenamiento no deben ser excesivamente largas, con una duración total de unos 15 minutos y carácter diario, si es posible, por la mañana y por la tarde.

La raza Gochu Asturcelta es más rústica, vital y agresiva, que otras razas comerciales, lo que lleva consigo dificultades añadidas en su adiestramiento.

Durante el entrenamiento, las reacciones de los verracos ante el potro deben ser análogas a las que manifiestan frente a las hembras en celo: identificación, olfateos, salivación, golpes de hocico, intentos de monta y salto útil. En ocasiones,

los verracos muestran reacciones contrarias a las citadas, tales como impasibilidad, miedo y agresividad, no siempre fáciles de modificar y corregir. Los signos que motivan el salto no son específicos y la inmovilidad del objeto presentado constituye el factor que desencadena la respuesta sexual.

Recogida de semen

La *sala de recogida* debe ser lo suficientemente grande como para permitir la seguridad de la persona encargada de realizarla, así como de fácil limpieza y desinfección, lo que se realizará tras la conclusión de cada jornada de trabajo.

El *material necesario para la recogida* se compone básicamente del potro o maniquí de monta, instalado sobre una alfombra perforada de goma antideslizante. Además, forman parte del equipo básico para la recogida: los termos, para

↓
Semental sobre maniquí de monta.



evitar el choque térmico del semen, que deben estar precalentados, limpios y desinfectados tras cada recogida; los vasos o bolsas para la recogida (también precalentados); las gasas o filtros de papel, para evitar el contacto entre la fracción tapioca y la fracción espermática, lo que causaría una aglutinación de los espermatozoides; los guantes para la recogida, sólo pueden usarse guantes de caucho nitrílico no empolvados, ya que el polvo utilizado puede ser un potente espermicida; un pulverizador que contenga una dilución de clorhexidina para limpiar y desinfectar el pene.

El *proceso de recogida* tiene una duración variable según el tipo de verraco y oscila entre los 5 y 15 minutos. Es muy importante observar bien el semen para

poder definir de forma óptima las diferentes fases:

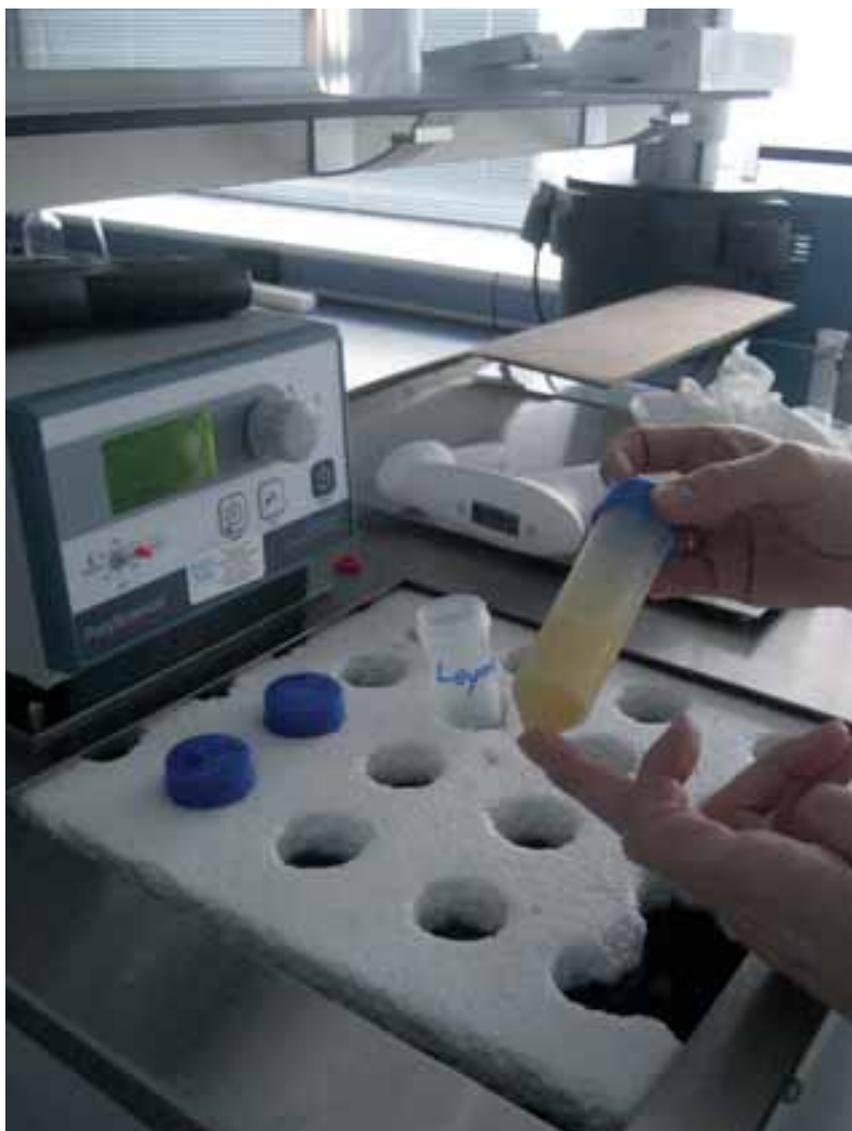
- Fracción pre-espermática: es la primera emisión del eyaculado, de aspecto transparente, muy líquida y de escaso volumen (10-15 ml). Corresponde a un líquido procedente de las glándulas accesorias, a menudo contaminado, ya que enjuaga las vías genitales, en particular en su parte terminal (pene). No se recoge.
- Fracción espermática rica en espermatozoides: es de color blanco y muy densa, de aspecto lechoso. Tiene una alta concentración de espermatozoides, con un volumen que varía entre los 50 y 150 ml, es la que nos interesa recoger para su procesamiento.
- Fracción post-espermática: es pobre en espermatozoides, blanquecina transparente, con grumos gelatinosos (tapioca), con un volumen que puede alcanzar los 200-300 ml y que procede, esencialmente, de la secreción de las glándulas accesorias (próstata, vesículas seminales). Puede estar intercalada con emisiones intermitentes de fracción rica.

En nuestra experiencia, el entrenamiento de los verracos para la obtención de semen con destino al BRZ tuvo un 93,3% de éxito, ya que conseguimos recuperar semen de 14 de los 15 machos que la Asociación de Criadores cedió. Se recogió semen en 267 ocasiones de las 298 sesiones totales (89,5% de éxito en la recogida), procesándose para su congelación cerca del 97% de los eyaculados obtenidos, eliminándose tras su descongelación por no reunir los mínimos requisitos de calidad el 15% de los mismos.

Procesamiento del semen porcino para su congelación

Las características especiales del semen porcino hacen que deban diseñarse protocolos de congelación específicos para esta especie. El éxito en la congelación seminal porcina depende del conocimiento de los factores y sus interacciones, que influyen en la capacidad del es-

↓
Procesamiento del semen para su congelación.



permatozoide para sobrevivir a la congelación y la descongelación. Estos factores pueden clasificarse en dos categorías: factores internos, inherentes a las características de los espermatozoides porcinos y las diferencias entre verracos y eyaculados y por otro lado, factores externos, como la composición del diluyente utilizado, el tipo y la concentración del crioprotector, las tasas de dilución del eyaculado, la velocidad de enfriamiento y el método de congelación y descongelación del semen. Los factores externos pueden ser manipulados o modificados para optimizar los protocolos de congelación, pero los internos, no.

Los diluyentes empleados en los procesos de congelación de semen porcino, están basados en la utilización de la yema de huevo y el glicerol como agentes crioprotectores, una elevada concentración de azúcares y la adición de un detergente (Orvus et Paste). La yema de huevo protege frente al shock por frío a las membranas de los espermatozoides de diferentes especies animales domésticas, pero en el caso del porcino, ocurre en menor medida. Afortunadamente, ese efecto protector puede incrementarse con la adición del mencionado detergente sintético Orvus et Paste (OEP) al diluyente. Hoy en día es conocido como Equex Stem (Nova Chemical, Estados Unidos) o Equex Paste (Minitub, Alemania). Parece que incrementa la función espermática en presencia de la yema de huevo, porque dispersa los conglomerados lipídicos de la misma formados tras la dilución del semen, más que por un efecto directo en la membrana plasmática (Pursel *et al.*, 1975).

Además, aunque se han probado diversos crioprotectores en la formulación de los diluyentes para congelación de semen porcino, el más eficaz sigue siendo el glicerol (Watson, 1995), pero aún usándolo a los niveles adecuados para una criopreservación óptima, los espermatozoides porcinos son más sensibles a él que los de otras especies.

En los últimos años, los protocolos de criopreservación e inseminación han sido mejorados sustancialmente, con el de-

sarrollo de nuevos sistemas de envasado y la optimización de los protocolos de congelación. Esto ha repercutido positivamente en una mejor calidad espermática tras la descongelación. Sin embargo, estos prometedores avances se ven empañados por la existencia de una elevada población de verracos cuyos espermatozoides muestran una permanente mala congelabilidad, que cuestiona su empleo efectivo en cualquier programa de conservación (Medrano *et al.*, 2002).

Una diferencia esencial entre la refrigeración y la congelación es que la mayoría de los eyaculados responden bien a la primera, pero de forma muy variable a la segunda. Esto último, es un hecho constatado en la especie porcina desde hace tiempo (Larsson *et al.*, 1976).

En nuestro trabajo con verracos del Gochu Asturcelta (ver tabla 1), los eyaculados se recogieron dos días por semana, con un descanso de tres entre ambos, mediante el método de la mano enguantada. Las fracciones ricas en espermatozoides se diluyeron (1:1, v / v) en Beltsville Thawing Solution (BTS) (Pursel y Johnson, 1975). Tras la recogida, se determinaron las características seminales (concentración espermática, motilidad subjetiva y objetiva, integridad del acrosoma y morfología espermática), mediante las técnicas laborales habituales (Martín-Rillo *et al.*, 1996). Se procesaron sólo los eyaculados con más de un 75 % de espermatozoides móviles progresivos y más de un 80 % de espermatozoides con los acrosomas normales.

Inmediatamente tras su evaluación, la fracción espermática diluida se enfrió lentamente hasta 17° C en un baño termostático programable durante 240 minutos. A continuación, se procedió a su centrifugación (Megafuge 1.0 R, Heraeus, Alemania) a 2400 × g durante 3 minutos, eliminándose posteriormente el sobrenadante.

El semen se congeló usando una modificación del procedimiento de congelación en pajuelas descrito por Westendorf *et al.* (1975) adaptado a las dosis seminales de 0,5 ml por Thurston *et al.*

→
Tabla 1.-Actividad realizada con destino al Banco de Recursos Zoogenéticos (BRZ) con donantes de raza Gochu Asturcelta.

Semental	Sesiones Totales	Sesiones Efectivas	Lotes Eliminados	Dosis en BRZs
NICER	10	10	1	1716
ARAMO	10	5	0	981
SIERO	5	0	0	0
CANDANU ACGA-092	44	41	2	941
ACGA-097	32	26	5	1367
ACGA-077	39	37	2	1848
ACGA-308	42	34	1	1577
ACGA-393	16	16	0	1753
ARAMO ACGA-073	19	19	0	1482
ACGA-302	15	15	0	1474
ACGA-2049	5	5	0	509
ACGA-0599	5	4	4	0
ACGA-2012	23	23	0	1341
ACGA-3223	15	15	0	1318
ACGA-907	18	17	1	1602
TOTAL	298	267	16	17909

(1999). Tras la centrifugación, los pellets de cada eyaculado se unieron y se diluyeron hasta una concentración de 1.500×10^6 espermatozoides / ml con un diluyente a base de lactosa y yema de huevo (LEY, del inglés lactose-egg yolk; con pH 6,2 y 330 ± 5 mOsmol / kg). Contiene un 80 % (v / v) de una solución de β -lactosa, 20 % (v / v) de yema de huevo y 100 mg / ml de sulfato de kanamicina. Tras un enfriamiento programado hasta 5° C durante 120 minutos, los espermatozoides diluidos se resuspendieron hasta una concentración final de 1.000×10^6 células / ml con un diluyente a base de LEY, glicerol y Orvus es Paste (LEYGO; con pH 6,2 y 1650 ± 15 mOsmol / kg). Contiene un 92,5 % (v / v) de LEY, 6% (v / v) de glicerol y 1,5% (v / v) de Equex STM (equivalente a Orvus es Paste; Graham *et al.*, 1971).

El semen diluido se envasó en las dosis seminales (0,5 ml; IMV Technologies, L'Aigle, Francia) a 5° C. La congelación se llevó a cabo en un biocongelador programable (Minidigitcool, IMV Technologies, L'Aigle, Francia) con descensos programados de temperatura de 5 a -8°

C a 20° C / minuto, de -8 a -120° C a 69° C / minuto y, finalmente, de -120° C a -140° C a 20° C / minuto (Purdy, 2008). Tras su congelación, quedaron almacenadas en nitrógeno líquido.

Para su descongelación, las dosis seminales se introdujeron en un baño de recirculación a 50° C durante 12 segundos (Thilmant, 1998) y se diluyeron en BTS a 37° C (1:1, vol / vol) para su valoración.

Producción de dosis seminales refrigeradas y/o congeladas/descongeladas para inseminación artificial

El semen de ocho de los verracos seleccionados para formar parte del BRZ ha sido utilizado mediante inseminación artificial, suministrándose dosis seminales refrigeradas a diferentes granjas, por petición de la Asociación de Criadores, para aprovechar la variabilidad genética que aportan los donantes. Por otra parte, con el objetivo de comprobar la eficacia y, fiabilidad del banco de germoplasma,

se realizaron inseminaciones experimentales con semen congelado / descongelado.

Hay dos factores principales que afectan la función espermática: la temperatura a la que se recoge el semen y se almacena tras su dilución y las condiciones del medio donde se diluye. Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, que suministra los nutrientes necesarios para mantener una elevada actividad metabólica, necesaria para el proceso de transporte espermático a través del tracto genital femenino. Pero, en el eyaculado, esta actividad sólo puede mantenerse durante un periodo muy limitado de tiempo. Para poder conservar los espermatozoides durante periodos más prolongados, es necesario que se reduzca su actividad metabólica, mediante la dilución en un medio adecuado y la reducción de la temperatura.

Se entiende por diluyente la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado para producir las dosis seminales, debiendo preservar las características funcionales de las células espermáticas y manteniendo el nivel de fertilidad adecuado. Para llevar a cabo su misión, el diluyente debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico del espermatozoide (glucosa), la protección frente al shock térmico por frío (albúmina sérica bovina, BSA), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS y HEPES), la presión osmótica (sales como NaCl y KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (antibióticos).

Las características peculiares que presenta el espermatozoide porcino hace que sea muy sensible al shock por frío (Pursel *et al.*, 1973), debido a la composición lipídica de su membrana. En la práctica, dicha susceptibilidad supone que las muestras deban ser conservadas a 15 -17° C, pues una reducción en la temperatura de almacenamiento limita la viabilidad de las muestras seminales (Paulenz *et al.*, 2000). La conservación a esta temperatura limita la capacidad de almacenamiento, ya que no disminuye el metabolismo celular y no se pueden controlar las condiciones microbiológicas con la misma efectividad que a 5° C.



El enfriamiento rápido del semen desde la temperatura corporal a la que se eyacula hasta temperaturas inferiores a 15° C da lugar a una pérdida en la viabilidad espermática. Sin embargo, cuando las muestras seminales se mantienen durante varias horas por encima de 15° C, los espermatozoides adquieren una resistencia gradual al shock por frío.

↑
Inseminación artificial.

Con las dosis refrigeradas producidas en el CBA de Deva, destinadas a ganaderías de socios de ACGA de diferentes concejos del Principado, hasta el momento, han nacido 126 lechones en 16 partos.

La mejor prueba de la fiabilidad de las dosis seminales que han entrado a formar parte del BRZ, además de todas las determinaciones de calidad que se les realizan en el laboratorio, es comprobar su capacidad para gestar hembras. Para ello, dos hembras inscritas en el Libro Genealógico del Gochu Asturcelta se inseminaron con semen descongelado del BRZ, quedando ambas preñadas, con el nacimiento de 15 lechones. En este caso se utilizó semen de un ejemplar de enorme interés genético e imposibilitado para la monta natural, de modo que, la única forma de aportar a la raza su variabilidad genética pasaba por el uso de la inseminación artificial.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al personal de campo actualmente adscrito al SERIDA de Deva, por la tarea tan eficiente que desempeñaron y a la Asociación de Criadores del Gochu Astur-Celta, sin la cual no hubiera sido posible realizar este trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por la Consejería de Agroganadería y Recursos Autóctonos y por el proyecto INIA RZ2010-00010-00-00

Bibliografía

- GRAHAM E. F., RAJAMANNAN A. H. J., SCHMEHL M. K. L., MAKI-LAURILA M. y BOWER R. E. 1971. Preliminary report on procedure and rationale for freezing boar spermatozoa. *AI Digest.*;19: 12-14.
- LARSSON K. y EINARSSON S. 1976. Fertility of deep frozen boar spermatozoa: influence of thawing diluents and of boars. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 17: 43-62.
- MARTÍN-RILLO, S., GARCÍA ARTIGA E. M. y DE ALBA, C. 1996. Boar semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*, 31:519-526.
- MEDRANO A., WATSON P. F., HOLT W. V. 2002: Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*, 123: 315-322.
- PAULENZ H., KOMISRUJ E., HOFMO P. O. 2000. Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 35, 83-85.
- PURDY P. H. 2008. Ubiquitination and its influence in boar sperm physiology and cryopreservation. *Theriogenology*, 70: 818-826.
- PURSEL V. G., JOHNSON L. A., SCHULMAN L. L. 1973. Fertilizing capacity of boar semen stored at 15°C *Journal of Animal Science*, 37: 532-535.
- PURSEL V. G. y JOHNSON L. A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of Animal Science*, 40: 99-102.
- THILMANT, T. 1998. Cryopreservation of boar semen in 0.5 ml french straws. 10th Meeting of A.I., Bruges, Belgium, pp 1-15.
- THURSTON L. M., WATSON P. F., HOLT W. V. 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm sub-populations objectively assessed by a novel automated sperm morphology analysis system. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117:271-280.
- WATSON, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 871-891.
- WESTENDORF, P., RICHTER, L. y TREU, H. 1975. Zur tiefgefrierung von ebersperma laborund besamungsergebnisse mit dem hulsenberger pailletten-verfahren. *Dtsch. Tierarztl. schr.*, 82: 261-300. ■



Primeros lechones nacidos por I.A. con dosis seminales descongeladas del BRZ.

