

# ¿Se puede trabajar con el semen congelado de verraco?

P. García-Casado, C. Diaz-Yubero, A. Toledano, y P. Marigorta del Val  
*INIA. Dpto. de Reproducción Animal. Madrid.*

**Ya estamos en el siglo XXI y seguimos a la espera de poder disponer de diferentes bancos de semen de verraco congelado, donde poder elegir las nuevas inyecciones de sangre a las explotaciones y con un mínimo de garantía en cuanto a la capacidad fecundante de las mismas. ¿Realmente no se ha avanzado en la técnica de congelación o es que tan sólo nos fijamos en el semen y no atendemos los otros factores que intervienen en la consecución de los resultados?**

**S**iempre hablamos del semen, de su calidad y de los diferentes pasos de la técnica de congelación de turno, los cuales pueden estar influyendo en la calidad del semen una vez descongelado. Y por supuesto que es fundamental, pero, podemos influir a través del manejo y nutrición de los verracos en la calidad seminal, podemos hacer una fuerte selección de los eyaculados susceptibles de ser congelados y posteriormente, trabajar con la cerda, de la cual en muchos casos ni nos acordamos, manejando el semen congelado como si del refrigerado se tratara, cuando hoy en día todavía no puede ser.

Generalmente, trabajando con el semen refrigerado a 15 °C, se realiza

de forma rutinaria una serie de valoraciones de la calidad seminal, que nos permiten detectar los eyaculados que no alcanzan la calidad suficiente, al presentar un cierto grado de anomalías, bien sea en su tracto intermedio, reflejado en una mala motilidad o calidad de movimiento, bien sea por la presencia de morfoanomalías, las que según el tipo que sean, se procederá a incrementar la concentración de la dosis seminal, o bien a desechar ese eyaculado.

Con el semen congelado, este es sólo el comienzo. Hay que tener en cuenta, que con la conservación por medio de la refrigeración, la gran mayoría de los eyaculados, con un buen equilibrio entre la calidad de sus membranas y el medio plasmático,

pueden aguantar en perfectas condiciones los 15 °C. Sin embargo, para soportar los -196 °C del nitrógeno líquido, se necesita tener unas membranas plasmáticas en muy buen estado y debemos poder detectar, dentro de los buenos, los mejores.

El siguiente punto a tener en cuenta es la cerda. Una vez descongeladas las pajuelas y logrando tener una buena calidad seminal en el laboratorio, no se debe nunca olvidar, que estamos trabajando con células sometidas a condiciones *contra natura* y que sin embargo, exigimos que posteriormente, lleguen a realizar el trabajo más duro que debe hacer una célula, como es conseguir alcanzar el oviducto de la cerda, atravesando y superando todas las barreras defensi-

vas del útero, para posteriormente, esperar al ovocito y lograr en clara lucha entre todos los supervivientes, penetrar y conseguir su fecundación. Es obvio, que cuanto más se facilite este proceso, mejores resultados se pueden esperar. Por este motivo, se deben eliminar todas las posibles dificultades que se pudieran añadir a los espermatozoides, por lo que se debe ajustar todo lo que se pueda el momento de la inseminación con la ovulación, al igual que al empezar a trabajar en un programa de congelación, se deberían utilizar cerdas que no hayan tenido problemas reproductivos y que hayan alcanzado el celo post-desferte en su tiempo normal, sin retrasos, lo que nos daría una idea del estado del endometrio.

Y por último, el sistema de inseminación que se utilice. En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas de inseminación post-cervical, esto es, depositando la dosis seminal, en el cuerpo del útero, lo que facilita el tránsito de los espermatozoides a través del útero, consiguiendo una concentración de espermatozoides muy alta cerca de la unión útero-tubárica, en muy poco tiempo. Esto permite que los espermatozoides descongelados, con un estado de las membranas mucho más delicado que cuando se refrigeran, alcancen en un número elevado, el lugar de fecundación, pudiendo obtener un número mayor de gestaciones, que si se utilizara el catéter tradicional, que deposita el semen en el cervix, con una mayor pérdida de espermatozoides.

## Selección de eyaculados

A lo largo de los años, se ha demostrado en múltiples ocasiones que no todos los verracos son buenos para la congelación, y dentro de los buenos verracos, no todos los eyaculados se comportan igual a la hora de congelarlos y descongelarlos. Por este mo-



Figura 1

### Cuadro I. Niveles mínimos exigidos a un eyaculado, como primer filtro, para congelación.

- Motilidad	≥ 80%
- Concentración	≥ 500 x 10 <sup>9</sup> spz/ml.
Estado de los acrosomas	≥ 90 %
- Morfoanomalías	GCD ≤ 20%
	GCP ≤ 10%
	CL ≤ 10%

tivo, es muy importante, la selección que se haga de los eyaculados. La gran ventaja en este sentido del sistema de producción del ganado porcino es, que la selección genética se realiza por líneas genéticas y no por individuos. Esto nos permite, poder realizar una selección de los individuos con mejor calidad seminal, dentro de la línea genética con la que queremos trabajar.

Los parámetros de cada eyaculado (Figura 1), que deberían ser analizados por todos los centros de inseminación artificial, son:

- Parámetros físicos:
  - ▶ Color.

- ▶ Volumen.
- Contraste seminal:
  - ▶ Motilidad.
  - ▶ Concentración de la fracción espermática del eyaculado.
  - ▶ Contaminación.
  - ▶ Aglutinación.
  - ▶ Estado de la integridad del acrosoma.
  - ▶ Formas anormales.

Los niveles mínimos exigidos a un eyaculado, como primer filtro, para llegar a ser congelado se muestran en el Cuadro I.

Entre los eyaculados que cumplan estas condiciones de calidad, se realizan otra serie de análisis, para selec-

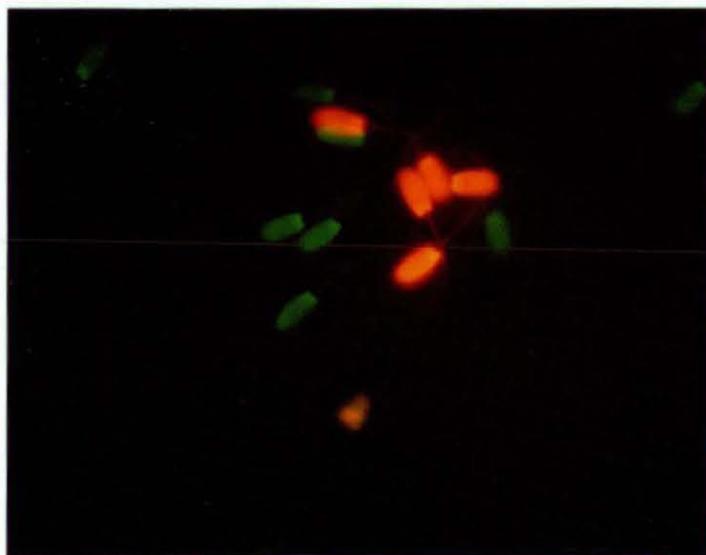


Figura 2

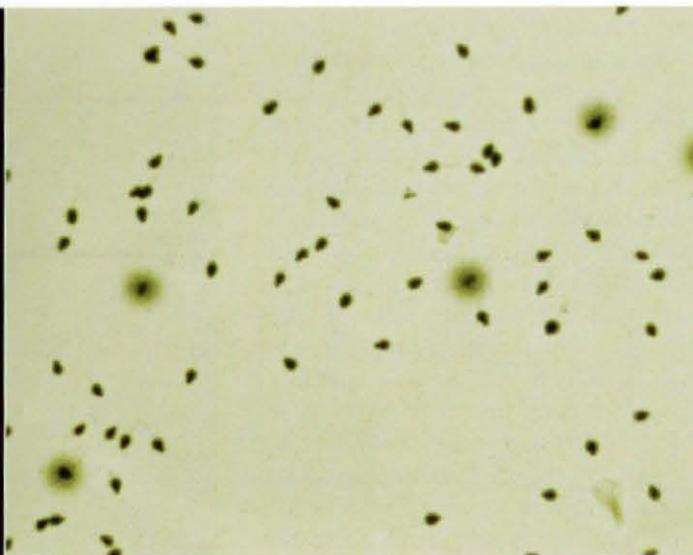


Figura 3

## Cuadro II. Criterios para la selección de los eyaculados de mejor calidad.

HOST corto	≥ 60%
ORT corto	≥ 60%
Vitalidad por SYBR14-IP	≥ 80%
Fraccionamiento del ADN	≤ 5%

cionar los de mejor calidad (**Cuadro II**).

Con las pruebas del HOST corto y del ORT corto, se simplifican las técnicas originales, siendo rápidas y sencillas. Pérez Llano y col. en 1998, redujeron el tiempo de incubación de 30 a 5 minutos disminuyendo la presión osmótica utilizada de 150 a 75 mOsm/kg, obteniendo los mismos resultados. Posteriormente, realizaron pruebas de fertilidad *in vivo* con este HOST corto y obtuvieron una correlación moderada y significativa entre los resultados de HOST corto en semen y la tasa de partos (Pérez Llano y col., 1999; Pérez Llano y col., 2001). Con estos test, se obtiene información tanto del estado de la membrana de la cola, como de la cabeza del espermatozoide, como demostró Pérez Llano y

col. en 2001, al observar que la población de espermatozoides positivos al HOST corto, mostraba un porcentaje de acrosomas normales significativamente mayor que la población de células negativas a la prueba. Es decir, de los eyaculados seleccionados que pasan el primer filtro de pruebas, podemos hacer una segunda selección según la calidad de membrana, determinada por estas pruebas.

Posteriormente, determinaremos la vitalidad por medio de la técnica de fluorescencia del SYBR14 y el yoduro de propidio y por último, se determinará el grado de fraccionamiento del ADN a través de la técnica de Halomax (**Figuras 2 y 3**).

Los últimos trabajos que se están desarrollando en el departamento de Reproducción Animal del INIA, se ba-

san en estudiar los diferentes parámetros bioquímicos que se presentan en el eyaculado, siendo los principales parámetros a analizar:

- Aspartato AminoTransferasa.
- Fosfolípidos en semen.
- Proteínas totales en plasma seminal.
- Proteínas hidroprecipitables.

Con este tipo de análisis, esperamos poder dar un paso más en la selección y predicción de la congelabilidad de cada eyaculado.

## Protocolo de congelación

Actualmente, seguimos el siguiente protocolo de congelación.

Trabajar sólo con la fracción rica del eyaculado. Generalmente unos 100 ml. Diluir con Acromax en una proporción 1:1 y dejar en equilibración a temperatura ambiente (20-22 °C) durante 2 horas. En este periodo de tiempo, se realiza la evaluación de calidad con los primeros parámetros determinantes de la calidad seminal.

Una vez seleccionados los eyaculados, y después de dos horas a temperatura ambiente, se comienza el descen-

so a 15 °C, para alcanzarlos en dos horas. Conociendo la concentración del eyaculado, calcular el número de pajuelas de 0,5 ml, que se pueden obtener con  $0,5 \times 10^9$  spz por pajuela. Posteriormente:

- Centrifugar a 800 x g durante 30 minutos.
- Eliminar el sobrenadante.
- Añadir diluyente de congelación en la proporción adecuada para tener una concentración de  $1 \times 10^9$  spz/ml.
- Introducir en el mismo tubo de centrifugación, dentro de un vaso de precipitados con agua a 15 °C, en la cámara de 5 °C, para alcanzar esta temperatura en dos horas.
- Una vez a 5 °C, añadir el resto de diluyente de congelación con glicerol y envasar en pajuelas de 0,5 ml identificadas.
- Dejar en equilibración durante 90 minutos e introducir en el biocongelador.
- Disparar la curva de congelación desde los 5 °C hasta los -180 °C.
- Introducir las pajuelas, directamente en el contenedor de nitrógeno líquido (**Figura 4**).

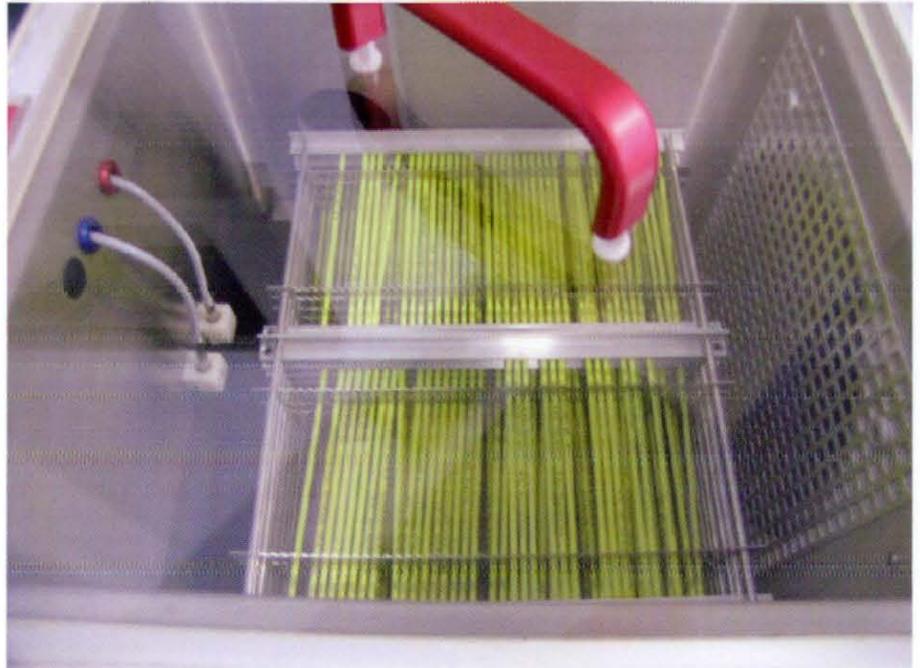


Figura 4

### Descongelación

El protocolo a seguir sería:

- Extraer la pajuela del contenedor y mantenerla en el aire durante 20 segundos.
- Introducir en el baño maría a 55 °C durante 20 segundos.
- Secar la pajuela, cortar los extremos y verter el contenido en 4,5 ml de Acromax a 37 °C.

Una vez seleccionado, congelado y descongelado, se debe tener una buena calidad, determinada por la motilidad y el estado de los acrosomas. Posteriormente, llega la hora de la inseminación y es aquí donde se debe trabajar de forma eficaz, para realizar una buena detección del celo, con el fin de llevar a

Podemos influir a través del manejo y nutrición de los verracos en la calidad seminal, podemos hacer una fuerte selección de los eyaculados susceptibles de ser congelados y posteriormente, trabajar con la cerda

cabo las inseminaciones, lo más próximo posible del comienzo de la ovulación.

### La cerda

Hay numerosos trabajos científicos, en los que se ha hecho un seguimien-

to de la duración de la ovulación, al igual que el momento de su comienzo, respecto al inicio del celo. En una revisión realizada por Flowers y Esbenshade en 1993, describen que el inicio de la ovulación, se produce de media a las 40 horas de haber comenzado el celo, siendo 2 horas la duración media de la misma. En términos

**Cuadro III. Duración del celo y comienzo de la ovulación.**

Días desde el destete	Duración del celo (hora)	Comienzo de la ovulación desde el inicio del celo (horas)
3	61	41
4	53	37
5	49	34
6	38	27

**Cuadro IV. Elección del momento para la primera inseminación.**

Días desde el destete	Primera inseminación
3 y 4	24 horas después de la detección del celo
5 y 6	12 horas después de la detección del celo
7, cerdas repetidas y nulíparas	Inmediatamente después de la detección del celo

“

Se deben eliminar todas las posibles dificultades que se pudieran añadir a los espermatozoides, por lo que se debe ajustar todo lo que se pueda el momento de la inseminación con la ovulación

”

generales, es aceptado, que la ovulación se produce en el último tercio del periodo de celo, al igual que los espermatozoides mantienen su capacidad fecundante en el interior del útero durante 24 horas. Por tanto, si se hace la detección del celo de forma correcta, esto es, dos veces al día, se tendrá un conocimiento más exacto del momento en que ha comenzado el celo y se podrá determinar el momento de comienzo de la ovulación.

Levis, en un amplio estudio con 10.000 cerdas, ha descrito los periodos medios de duración del estro, de-

pendiendo del periodo de tiempo desde que se produce el destete. Se concluyó que en las cerdas que alcanzan el celo a los 3 días desde el destete, la duración del celo es de 61 horas, por tanto, la ovulación comenzará a las 41 horas de haberse iniciado el celo. Las cerdas que salen en celo el día 4 desde el destete, tienen un celo de 53 horas y la ovulación se podrá producir desde las 37 horas del comienzo del celo. Las cerdas que alcanzan el celo el día 5 desde el destete, tienen una duración del celo de 49 horas y por tanto, la ovulación se producirá desde las 34

horas del comienzo del celo y por último, las cerdas que demuestran el celo el día 6 desde el destete, la duración del celo es de 38 horas y la ovulación será desde las 27 horas desde el inicio del celo (**Cuadro III**).

Con estos datos, y reiterando que los espermatozoides pueden mantener su capacidad fecundante en el interior del útero durante 24 horas, debemos observar que si se lleva a cabo la inseminación nada más salir en celo la cerda, en todos los casos mencionados no serviría de nada, ya que la ovulación comenzaría posterior a las 24 horas de duración de la capacidad fecundante de los espermatozoides. Por tanto, las inseminaciones deberían hacerse de la siguiente manera (**Cuadro IV**):

- Cerdas en celo los días 3 y 4 desde el destete, realizar la primera inseminación a las 24 horas de la detección positiva del celo.
- Cerdas en celo los días 5 y 6 desde el destete, realizar la primera inseminación a las 12 horas de la detección positiva del celo.
- Cerdas en celo a partir del día 7 desde el destete, al igual que las cerdas repetidas y las nulíparas, realizar la primera inseminación inmediatamente después de la detección del celo.

La segunda inseminación, se hará siempre a las doce horas de haber hecho la primera. De esta manera, tenemos cubierto un periodo continuado de 36 horas, con el que en la inmensa mayoría de las cerdas se cubrirá todo el periodo de ovulación.

## Sistema de inseminación

Es el último paso para poder obtener buenos resultados trabajando con semen congelado de verraco. En los últimos años se han venido desarrollando los sistemas de inseminación post-cervical. A diferencia del sistema tra-



Figura 5. Catéter post-cervical de membrana.



Figura 6. Catéter tradicional

dicional, el semen se deposita en el cuerpo del útero, con la ventaja de poder evitar el filtro defensivo fisiológico que representa el cervix, pudiendo conseguir una mayor concentración espermática cerca del lugar de fecundación. Esto para el semen congelado y descongelado es muy importante, ya que las membranas de estos espermatozoides están muy delicadas y se facilita el acceso a la unión útero-tubárica.

De entre todos los sistemas post-cervicales, tan sólo hay uno que permite la inseminación sin ningún peligro de provocar ninguna lesión en la cerda, ya que la mayoría de sistemas utilizan una cánula semirígida a través del catéter tradicional, que al ser introducida puede erosionar la mucosa del cervix, además de ser muy difícil su utilización en nulíparas por lo estrecho del canal cervical.

Sin embargo, hace pocos años se ha presentado un nuevo catéter innovador, el cual, en vez de cánula utiliza

una membrana de látex, la cual se presenta adherida al interior del catéter y que se desenvuelve, con la presión ejercida por el propio semen. Al ser una membrana similar a un preservativo, pasa sin ninguna dificultad el cervix, adaptándose perfectamente a éste, incluso de las nulíparas, y por la presión ejercida al apretar la dosis seminal se consigue que el semen penetre en el útero de forma explosiva, lo que permite que se distribuya rápidamente por todo el útero, alcanzando de forma inmediata la unión útero-tubárica. Esto es muy importante de cara al uso del semen congelado, ya que se consigue una alta concentración espermática a nivel de oviducto, en un mínimo periodo de tiempo y sin aumentar las alteraciones a nivel de membrana de los espermatozoides (Figuras 5 y 6).

Si la inseminación se hiciera con un catéter tradicional, el semen, al ser depositado en el cuello del útero, debe de pasar ese filtro fisiológico, para

posteriormente, recorrer con ayuda de las contracciones uterinas, todo el cuerno. Eso significa que para obtener una alta concentración espermática en el oviducto, las dosis congeladas deben de ser de una alta concentración. Sin embargo con el sistema post-cervical, con tan solo 2 a 4 pajuelas de 0,5 ml, con un total de 1 a 2 x 10<sup>9</sup> espermatozoides, se están consiguiendo muy buenos resultados, con una mejor rentabilidad del semen congelado de verraco.

### Agradecimientos

A la empresa Gestión Veterinaria Porcina SL por el suministro del diluyente Acromax para la realización de todos los experimentos de conservación de semen de verraco, llevados a cabo en los últimos años en el laboratorio de Manejo y Control de la Reproducción porcina, del Departamento de Reproducción Animal del INIA.