

## **EL USO DE LA FECUNDACIÓN IN VITRO PARA LA EVALUACIÓN DE LOS SISTEMAS DE CONGELACIÓN DE SEMEN PORCINO**

J. Gadea, S. Ruiz, E. Sellés, R. Romar, C. Matás, P. Coy, A. Poto\* y B. Peinado\*

Departamento de Biología Animal (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria.

Universidad de Murcia. Fax: 968 364147 e-mail: [jgadea@um.es](mailto:jgadea@um.es)

\*Centro de Investigación y Desarrollo Agrario y Agroalimentario (CIDA). La Alberca (Murcia)

### **INTRODUCCIÓN**

Después de 30 años de investigación en los sistemas de congelación del semen porcino, los resultados de fertilidad obtenidos mediante inseminación artificial con semen congelado aún no son suficientemente satisfactorios como para que su uso comercial se haya generalizado. En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar la fertilidad del semen congelado (revisado por Holt, 2000). Las vías de mejora han ido dirigidas a optimizar los sistemas de congelación para obtener una calidad seminal aceptable tras la descongelación (nuevos procedimientos de congelación, diluyentes, aditivos, envases, etc.) y a una mejora en la sincronización entre el momento de la inseminación y el de la ovulación. Otro factor muy importante es la evaluación de la calidad del semen descongelado mediante diferentes métodos de análisis in vitro (Woelders, 1990). De todas las técnicas utilizadas, las que mejor predicen la capacidad fecundante son aquellas que estudian la interacción entre los gametos (Larsson y Rodríguez-Martínez, 2000).

En la especie porcina se han utilizado diversos sistemas de fecundación in vitro que permiten predecir la capacidad fecundante del semen refrigerado con una elevada precisión (Ivanova y Mollova, 1993; Xu et al., 1998; Gadea et al., 1998a; Gadea y Matás, 2000). Sin embargo, se dispone de escasa información acerca del semen congelado (Wang et al., 1991; Gadea et al., 1998b; Eriksson, 2000).

El objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de penetración in vitro y la de fecundación in vivo que presenta el semen congelado de la especie porcina y la relación que existe entre ambas.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Los eyaculados obtenidos de tres verracos de fertilidad probada fueron congelados mediante el método descrito por Westendorf et al. (1975), basado en la utilización de un medio con lactosa y yema de huevo. El semen fue envasado en pajuelas de 0.5 ml con una concentración final de  $1 \times 10^9$  espermatozoides/ml, 3% de glicerol y 0.5% de Orvus et Paste. El proceso de descongelación se realizó mediante inmersión en un baño a 50°C durante 12 segundos y posterior dilución en BTS a 37°C. La evaluación de la calidad seminal se realizó midiendo los parámetros de motilidad, motilidad progresiva (0-5), estado del acrosoma (NAR), y la integridad de membrana mediante la tinción con eosina-nigrosina (EN) y los fluorocromos diacetato de carboxifluoresceína y yoduro de propidio (DCF).

#### **Fecundación in vitro (FIV)**

Los ovocitos fueron obtenidos a partir de ovarios de cerdas prepúberes sacrificadas en el matadero y fueron sometidos a un proceso de maduración in vitro (MIV) durante 44 horas en medio Waymouth MB 725/1 suplementado (Yoshida et al., 1992; Coy et al., 1999). Tras la MIV, se coincubaron los espermatozoides descongelados ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/ml) con 20 ovocitos por placa de 2 ml de medio TCM199 (Coy et al., 1999). Tras 18 h de cultivo, los ovocitos se fijaron y tiñeron con lacmoid para determinar la tasa de penetración (%PEN), número medio de espermatozoides por ovocito (E/O), tasa de monospermia (% MON) y tasa de formación del pronúcleo masculino (% PNM).

## Inseminación artificial

Con el mismo semen congelado que se utilizó en la fecundación in vitro, se inseminaron un total de 24 cerdas multíparas con doble inseminación a las 12 y 24 horas tras la detección del celo. Las dosis seminales se prepararon con semen descongelado en BTS con  $5 \times 10^9$  espermatozoides en un volumen de 80 ml. La fertilidad y el tamaño de camada (número de lechones totales, LNT) fue calculado para cada eyaculado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al estudiar las diferencias entre la capacidad de congelación de los diferentes machos, encontramos que el semen congelado de los machos A y B resultó tener un mayor número de células con membrana estructural y funcionalmente íntegras (EN y DCF) y también tener una mayor capacidad de penetración in vitro que el macho C (Tablas 1 y 2). Estos resultados confirman por una parte las diferencias en la capacidad de congelación que presentan los diferentes verracos (Medrano y Holt, 1998; Gadea et al., 1998c) y por otra parte ponen de manifiesto la mayor capacidad discriminante que presenta la fecundación in vitro frente a los parámetros que habitualmente se utilizan para medir la calidad seminal (motilidad y acrosomas) (Gadea et al., 1998a).

Tabla 1. Parámetros seminales del semen congelado (media  $\pm$ SEM) procedentes de 9 eyaculados (Macho A= 2, B= 4 y C= 3)

Macho	Motilidad	Motilidad Progresiva	EN	NAR	DCF
A	62.00 $\pm$ 2.00	3.95 $\pm$ 0.05	72.50 $\pm$ 2.88 <sup>a</sup>	42.50 $\pm$ 3.49	69.75 $\pm$ 3.17 <sup>a</sup>
B	64.20 $\pm$ 1.72	3.88 $\pm$ 0.05	67.63 $\pm$ 1.21 <sup>a</sup>	39.21 $\pm$ 1.56	55.14 $\pm$ 4.35 <sup>a</sup>
C	61.56 $\pm$ 2.45	3.78 $\pm$ 0.09	58.33 $\pm$ 2.17 <sup>b</sup>	39.50 $\pm$ 2.14	49.83 $\pm$ 4.82 <sup>b</sup>
Fuentes de variación	Motilidad	Motilidad Progresiva	EN	NAR	DCF
Macho	0.593	0.315	<0.001	0.591	0.036

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices en la columna indican valores significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

Los resultados obtenidos en fecundación in vitro son consistentes con los obtenidos en la fertilidad in vivo. Se detectó una marcada tendencia ( $p=0.066$ ) para el efecto del macho sobre la fertilidad obtenida, probablemente debido a las limitaciones del ensayo de campo (Tabla 2), así como se detectaron correlaciones significativas entre la fertilidad y la tasa de penetración, monospermia y formación de pronúcleo (Tabla 3). De igual modo en un trabajo previo con un mayor número de cerdas inseminadas se encontró una relación significativa entre la capacidad de penetración in vitro y la fertilidad in vivo al utilizar semen refrigerado (Gadea et al., 1998a). Sin embargo, en este caso no se encontró relación entre los resultados de la FIV con el tamaño de camada (Tablas 2 y 3).

Los resultados totales de fertilidad obtenidos en la prueba de campo (total 70.83 %, 17/24) serían lo suficientemente eficientes como para su aplicación comercial, en especial para los machos A y B (80 y 84.62 % respectivamente), y son comparables a los obtenidos por otros autores en los últimos años (Almlid y Hofmo, 1996; Bertani et al., 1997; Erikson, 2000). De manera que el semen congelado podría ser un complemento a la inseminación artificial con semen refrigerado, permitiendo el transporte de material a larga distancia, así como su utilización para crear bancos de germoplasma de razas en peligro de extinción o de animales genéticamente valiosos.

En conclusión, la congelación del semen porcino está alcanzando niveles que permiten su uso con fines específicos y los sistemas FIV pueden ser una buena herramienta para evaluar la calidad del semen porcino congelado como medida previa a su uso comercial, para verificar la calidad de los bancos de semen y para testar nuevos métodos de congelación.

Tabla 2. Resultados del sistema FIV y fertilidad in vivo con el uso de semen congelado (media  $\pm$  SEM).

Macho	N. de ovocitos	% PEN	E/O*	% MON*	%PNM*	% Fertilidad	LNT
A	148	72.30 $\pm$ 3.69 <sup>a</sup>	3.04 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	42.99 $\pm$ 4.81 <sup>a</sup>	86.92 $\pm$ 3.28	80(4/5)	11.5 $\pm$ 1.19
B	329	67.17 $\pm$ 2.59 <sup>a</sup>	2.22 $\pm$ 0.11 <sup>b</sup>	40.72 $\pm$ 3.31 <sup>a</sup>	87.33 $\pm$ 2.24	84.62(11/13)	9.18 $\pm$ 1.54
C	212	44.34 $\pm$ 3.42 <sup>b</sup>	1.66 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	61.70 $\pm$ 5.04 <sup>b</sup>	82.98 $\pm$ 3.90	33.33(2/6)	6 $\pm$ 0

  

Fuentes de variación	% PEN	S/O*	% MON*	%MPN*	Fertilidad	LNT
Macho	<0.001	<0.001	0.002	0.577	0.066	0.380

\* Basado en ovocitos penetrados

<sup>a,b</sup> Diferentes superíndices en la columna indican valores significativamente diferentes ( $p < 0.05$ )

Tabla 3. Regresión lineal entre los parámetros de FIV, la fertilidad y el tamaño de camada.

	Fertilidad		Tamaño de la camada	
	Coefficiente de correlación (r)	Significación (p)	Coefficiente de correlación (r)	Significación (p)
% PEN	0.801	0.009	0.529	0.143
E/O	0.553	0.122	0.178	0.647
%MON	-0.680	0.044	-0.132	0.736
%PNM	0.689	0.040	0.192	0.621

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almlid y Hofmo (1996) *Reprod. Dom. Anim.* 31, 169-173.
- Bertani et al. (1997) *Theriogenology* 48, 933-45.
- Coy et al. (1999) *Theriogenology* 51, 799-812.
- Eriksson (2000) Tesis Doctoral. Universidad de Uppsala. Suecia.
- Gadea et al. (1998a) *Anim. Reprod. Sci.* 54, 95-108.
- Gadea et al. (1998b) *Arch. Zootec.* 47, 299-304.
- Gadea et al. (1998c) I Simposio Int. Biotec. Aplic. *Reprod. Anim. Argentina.* pp 128-133.
- Gadea y Matás (2000) *Theriogenology* 54, 1343-1357.
- Holt (2000) *Anim. Reprod. Sci.* 62, 3-22.
- Ivanova y Mollova (1993) *Theriogenology* 40, 397-410.
- Larsson y Rodríguez-Martínez (2000) *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 327-336.
- Medrano y Holt (1998) *Arch. Zootec.* 47, 319-327.
- Wang et al. (1991) *J. Reprod. Fertil.* 93, 491-496.
- Westendorf et al. (1975) *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 82, 261-267.
- Woelders (1990) 2<sup>d</sup> Intl. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Beltsville, MD, pp. 145-164.
- Xu et al. (1998) *J. Anim. Sci.* 76, 3079-3089.
- Yoshida et al. (1992) *Mol. Reprod. Dev.* 31, 68-71.

Este trabajo ha sido financiado por INFO-Programa Séneca, Fondos FEDER (1FD97-0501) y PROFIT (FIT-010000-2000-76).