

Adición de plasma seminal para la mejora del semen criopreservado de porcino

El intento de mejorar los resultados obtenidos con semen criopreservado en la inseminación artificial del ganado porcino ha llevado a la investigación de numerosas estrategias con más o menos fortuna. La estrategia de añadir plasma seminal a los medios de descongelación mejora notablemente la calidad seminal en el tiempo de incubación y equipara los resultados de fecundidad a los obtenidos con semen refrigerado.



J.C. Domínguez y colaboradores.
Facultad Veterinaria de León.

La inseminación artificial (IA) es, posiblemente, la técnica de reproducción asistida que más impacto ha tenido sobre la producción animal en los últimos cincuenta o sesenta años, llegando, en el sector porcino, a presentar una amplia aplicación en todo el mundo.

La utilización de semen refrigerado (15-20°C) copa más del 99% de las inseminaciones artificiales realizadas en el mundo, quedando relegada la utilización de semen congelado/descongelado, bien a labores de investigación, o bien a la incorporación de nuevo material genético de alto valor a núcleos de selección, por lo que en la producción comercial porcina no se están aprovechando las grandes ventajas que la criopreservación seminal puede aportar, como el mayor control sanitario de las dosis o la gran disponibilidad espacio/temporal del material seminal.

La inseminación con semen criopreservado tiene un rendimiento reproductivo inferior al obtenido con semen refrigerado, tanto en el porcentaje de partos como en el tamaño de la camada, en torno a dos o tres lechones menos, y es que los espermatozoides de porcino presentan una mayor susceptibilidad a la criopreservación que la mayoría de las especies domésticas. De hecho, solo se observan porcentajes aceptables de fecundidad cuando la inseminación se realiza en el intervalo de 4 horas antes de la ovulación.

Se cree que el daño sufrido por el proceso de criopreservación podría inducir un efecto en los espermatozoides similar a la capacitación o al envejecimiento pre-

maturo, asociado a un incremento de la fragmentación del ADN.

Factores que limitan el uso de semen congelado

Aunque el daño infringido por el proceso de criopreservación puede considerarse la principal causa del bajo rendimiento reproductivo, existen otros factores que también limitan considerablemente la utilización del semen congelado:

- El requerimiento de un mayor número de espermatozoides por dosis de inseminación (5-6 millones de espermatozoides) en comparación con el fresco/refrigerado (2-3 millones de espermatozoides).
- El elevado coste del proceso, ya que implica la adquisición de un equipamiento de laboratorio mucho más caro y una formación complementaria del personal.
- La carencia de análisis de laboratorio que determinen de una forma precisa la calidad seminal, lo cual es un obstáculo a la hora de relacionar la viabilidad *in vitro* con la fecundidad *in vivo*.
- El momento crítico de la inseminación, puesto que el rango fértil de los espermatozoides descongelados es considerablemente menor que en el semen fresco/refrigerado.
- La gran variación existente entre razas y entre verracos en relación con la supervivencia espermática al proceso.

Todos estos inconvenientes son los que han hecho que hoy en día la utilización de semen congelado/descongelado en el ganado porcino se haya reducido, aparte de su uso en investigación, a la producción en pureza en las granjas de selección genética, puesto que en este

caso los rendimientos reproductivos, aunque no dejan de ser importantes, son secundarios con respecto a la consecución del objetivo primario, que es la mejora genética de los animales de explotación o la introducción en otros países de nuevas líneas selectas de bisabuelos/as y abuelos/as.

Situación actual de esta técnica

Desde el inicio de las primeras experiencias con esta técnica en 1956, son muchos los avances conseguidos a fecha de hoy para aumentar su rentabilidad. Uno de ellos sería la utilización de un catéter especial que permite depositar el material seminal más allá del cuello uterino, con lo que se minimizan algunos de los inconvenientes, ya que además de incrementar los porcentajes de fecundidad (76-80%) y prolificidad (9,3-9,5 lechones por camada), se consigue reducir el número de espermatozoides necesarios para llevar a cabo la inseminación (con el consiguiente aumento del número de dosis producidas lo que conlleva a una disminución del coste).

Otra de las líneas de investigación desarrolladas trata de buscar una mejor sincronización del momento de la ovulación con la llegada de los espermatozoides descongelados al oviducto, dada la reducida vida fértil que éstos presentan.

Últimamente también se ha centrado la atención en los fenómenos relacionados con las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* –ROS–), que causan parte de las alteraciones estructurales y funcionales que sufre el espermatozoide porcino durante los procesos de congelación y descongelación. En este sentido, se han venido utilizando en los diluyentes de congelación enzimas o sustancias antioxidantes con el fin de proteger, en cierto modo, a las estructuras espermáticas de su efecto nocivo, consiguiendo con ello no sólo los resultados de motilidad e integridad de las membranas acrosómica y plasmática, sino también la capacidad fecundante en pruebas de fecundación *in vitro*.

Estrategias para mejorar los resultados reproductivos utilizando semen criopreservado

Son muchos los trabajos que han intentado dar solución a este problema de bajo rendimiento reproductivo cuando se uti-



Imagen 1. El verraco representa no solamente la línea de mejora genética en el ganado porcino, sino también el 50% de la fecundidad de las explotaciones.

El daño sufrido por la criopreservación podría inducir un efecto en los espermatozoides similar al envejecimiento prematuro

liza semen criopreservado de porcino y se ha intentado estudiar y actuar sobre los factores externos que afectan a la supervivencia y al mantenimiento de la capacidad fecundante de los espermatozoides tras el proceso de congelación, lográndose avances muy significativos:

- Actuaciones sobre la curva de congelación.
- Determinación de las condiciones óptimas para la descongelación.
- Modificación de la composición de los diluyentes (fundamentalmente mediante la incorporación de sustancias con carácter antioxidante).
- Modificación de los envases de congelación.
- Elección del lugar de la aplicación de la dosis seminal.
- Adición de plasma seminal.

Suplementación con plasma seminal

Con el fin de mejorar el rendimiento reproductivo del semen congelado de verraco realizamos un trabajo de investigación para examinar el efecto de la suplementación del semen congelado/descongelado con distintas concentraciones de plasma seminal, sobre la calidad espermática y la fecundidad en la cerda mediante inseminación artificial cervical.

En la primera parte de este trabajo se observó que el aumento de la concentración de plasma seminal provocaba un aumento significativo de la viabilidad y movilidad espermática. En la segunda parte, se constató que la inseminación de cerdas con semen criopreservado redujo el porcentaje de gestación y el tamaño de la camada, sin >>>

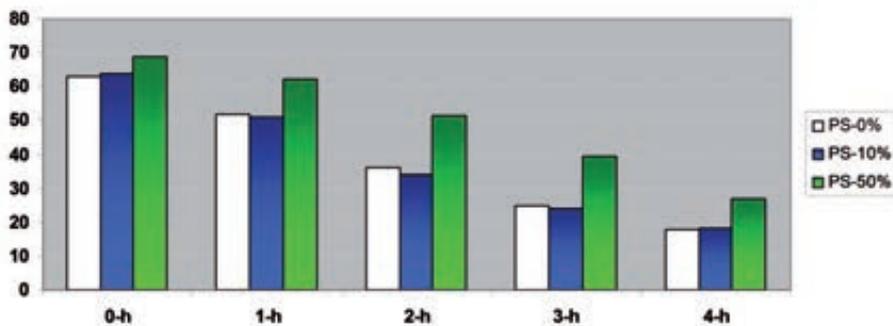


Figura 1. Efecto de la incubación del semen congelado/descongelado de verraco durante 4 horas en un medio suplementado con 0, 10 o 50% de plasma seminal sobre la integridad de la membrana plasmática (% vitalidad).

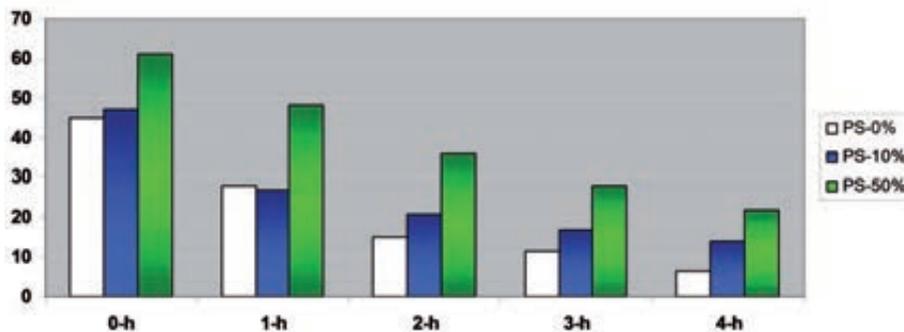


Figura 2. Efecto de la incubación del semen congelado/descongelado de verraco durante 4 horas en un medio suplementado con 0, 10 o 50% de plasma seminal sobre la movilidad espermática (% movilidad).

embargo este efecto no se observó cuando el semen congelado/descongelado fue suplementado con un 50% de plasma seminal.

Efecto de la suplementación con plasma seminal sobre la calidad espermática

Como hemos comentado, se cree que el daño sufrido por el proceso de criopreservación podría inducir un efecto en los espermatozoides similar a la capacitación o al envejecimiento prematuro. Estos espermatozoides capacitados no forman un reservorio espermático funcional, por tanto, el control de estos procesos representa un punto de interés para la mejora de la fecundidad asociada al uso de semen porcino criopreservado.

Se ha demostrado mediante métodos de tinción, que la incubación en un medio suplementado con un 10% de plasma seminal, tanto con semen refrigerado como con semen congelado/des-

congelado, puede prevenir, y posiblemente revertir, la crio-capacitación.

Nuestra aportación

Basándonos en estos estudios, formulamos la hipótesis de que el aumento de la concentración de plasma seminal usado en la reconstitución de semen congelado/descongelado mejoraría la fecundidad de la cerda utilizando inseminación artificial cervical.

Para evaluar esta hipótesis se utilizaron tres concentraciones de plasma seminal (0, 10 y 50%), para las valoraciones *in vitro* de la viabilidad y movilidad espermática, y se seleccionaron cinco verracos en base a su fertilidad y calidad espermática como donantes de semen. Semanalmente se realizó una extracción seminal a cada uno de ellos.

Posteriormente, se procedió a la valoración seminal, utilizando únicamente eyaculados con al menos un 80% de espermatozoides móviles, un 75% de espermatozoides morfológicamente nor-

males y un 95% de acrosomas normales, para la criopreservación seminal, donde se utilizaron dos eyaculados de cada uno de los verracos.

Al descongelar las pajuelas en el diluyente de descongelación (dos pajuelas en 40 ml de diluyente comercial BTS) se añadió 0, 10 o 50 % de plasma seminal (que había sido apartado en la recogida del semen). Posteriormente el semen se mantuvo a 38°C durante 4 horas, analizándose cada hora la viabilidad de los espermatozoides (porcentaje de vivos/muertos) y su movilidad.

Viabilidad espermática

El porcentaje de espermatozoides vivos disminuyó progresivamente durante el periodo de incubación de 4 horas, sin embargo, en el caso del espermatozoides incubado en un 50% de plasma seminal, el porcentaje de espermatozoides vivos fue superior (en todos los tiempos de valoración) en comparación con los espermatozoides que se incubaron en un 0 o 10% de plasma seminal.

Movilidad espermática

El porcentaje de movilidad de los espermatozoides disminuyó progresivamente durante el periodo de incubación de 4 horas, sin embargo, la movilidad de los espermatozoides incubados con un 50% de plasma seminal fue significativamente superior en todos los puntos de valoración en comparación con las poblaciones de espermatozoides incubados con 0 o 10% de plasma seminal.

Efecto de la suplementación con plasma seminal sobre la fecundidad de la cerda

La respuesta a la suplementación de semen de verraco con plasma seminal ha demostrado ser impredecible cuando se ha estudiado la repercusión sobre la fecundidad de la hembra. Según algunos autores, cuando el semen de verraco se suplementa con 0 o 10 % de plasma seminal y se insemina entre 2 y 12 horas antes del momento previsto de la ovulación, no se observan diferencias en la fecundidad de la cerda, mientras que otros autores demuestran una mejora de la misma.

Es posible que el efecto beneficioso del plasma seminal sobre la fecundidad no solo dependa del porcentaje de >>



Al inseminar una cerda ...
dar en el blanco no es fácil

La clave es el momento en que ocurre la ovulación
Para ello, **Veterelin** ayuda a dar en el blanco.....

Inducción de la ovulación tras la sincronización del celo con un análogo de progesterona (altrenogest) para realizar la inseminación artificial. La administración debe realizarse a las 115 - 120 horas tras el fin de la sincronización con progestágenos. La **única inseminación artificial** se debe realizar a las 30- 33 horas de la administración de **Veterelin**



Veterelin

Buserelina

**0,004 mg/ml. Solución inyectable
para bovino, equino, porcino y conejos**

Veterelin 0,004 mg/ml solución inyectable para bovino, equino, porcino y conejos. Composición por ml: buserelina 0,004 mg (equivalente a 0,0042 mg de acetato de buserelina).
Indicaciones de uso: Bovinos (vacas): inducción de la ovulación o ovulación retardada; tratamiento del anestro; tratamiento de quistes foliculares con o sin signos de ninformanía; incremento del índice de fecundidad en la inseminación artificial después de la sincronización del celo con un análogo de pgf2a; Yeguas: tratamiento de quistes foliculares con o sin signos de ninformanía; inducción de la ovulación y consecuentemente sincronización de la ovulación justo antes de la monta; Conejos: mejora el índice de fecundidad e inducción de la ovulación en la inseminación post parto; Porcino (reproductora nulíparas): inducción de la ovulación tras la sincronización del celo con un análogo de progesterona (altrenogest) para realizar la inseminación artificial. Posología y forma de administración: en bovino, equino y conejos es preferible la vía intramuscular (im). También puede emplearse vía intravenosa (iv) ó subcutánea (sc). En cerdos es preferible usar vía intramuscular (im). También se puede emplear vía intravenosa (iv). Vacas: tratamiento de anestro; inducción de ovulación; tratamiento de quiste foliculares: 20 µg/animal (5 ml/animal). Ovulación retardada; incremento del índice de fecundidad en la inseminación artificial después de la sincronización del celo con un análogo de pgf2a: 10 µg/animal (2,5 ml/animal). Para la sincronización del celo para inseminación fijada al día 10, el producto debe ser administrado del siguiente modo: administración de buserelina (día 0), seguida de administración de pgf2a después de 7 días (día 7) y segunda administración de buserelina después de 9 días (día 9). Yeguas: tratamiento de quistes foliculares con o sin signos de ninformanía; inducción de la ovulación y consecuentemente sincronización de la ovulación justo antes de la monta: 40 µg/animal (10 ml/animal). Cerdas: inducción de la ovulación tras la sincronización del celo con un análogo de progesterona (altrenogest) para realizar la inseminación artificial. La administración debe realizarse a las 115-120 horas tras el fin de la sincronización con progestágenos. La única inseminación artificial se debe realizar a las 30 - 33 horas de la administración de VETERELIN: 10 µg/animal (2,5 ml/animal). Conejos: mejora el índice de fecundidad; inducción de la ovulación en la inseminación post parto: 0,8 µg/animal (0,2 ml/animal). Tiempos de espera: carne: 0 días; leche: 0 días. Titular de la autorización de comercialización: Laboratorios Calier, s.a. c/ Barcelonès, 26 (El Ramassar) Les Franqueses del Vallès (Barcelona). reg nº Z317-Esp. Medicamento sujeto a prescripción veterinaria



Imagen 2. Fracción "rica" del eyaculado utilizada en la inseminación artificial.

Cuadro 1. Resultados de fecundidad y prolificidad con semen refrigerado, criopreservado y adicionado con 50% de plasma seminal en el momento de la descongelación, y un control de inseminadas con semen criopreservado sin adición de plasma seminal.

	Semen refrigerado	Semen criopreservado + 50% plasma seminal	Semen criopreservado
Nº cerdas	30	26	26
Gestación (%)	86,7 ^a	80,8 ^{ab}	65,4 ^b
Partos (%)	83,3	69,2	65,4
Tamaño camada	11,2 ± 0,4 ^c	12,5 ± 0,5 ^c	9,8 ± 0,5 ^d

Con diferente superíndice diferencias estadísticamente significativas (P ≤ 0,05).

suplementación o de la viabilidad y movilidad de los espermatozoides, sino también del lugar de deposición de los espermatozoides en la hembra. Recientemente se ha observado que la inseminación artificial postcervical mejora los resultados de fecundidad del semen descongelado comparado con la cervical.

Nuestra aportación

Para la valoración de este hallazgo de laboratorio se estudió su repercusión sobre la fecundidad de la cerda inseminada con semen criopreservado y suplementado con plasma seminal al 50%, ya que ésta es la concentración que mejora significativamente la vitalidad y movilidad espermática como hemos visto anteriormente. Los datos obtenidos se compararon con la fecundidad alcanzada con semen refrigerado y semen

criopreservado sin añadir plasma después de la descongelación.

Para ello se inseminaron 82 cerdas, las cuales recibieron un tratamiento de sincronización del celo y ovulación mediante una inyección de 900 unidades internacionales (UI) de gonadotropina coriónica equina (eCG) en el momento del destete, seguida de 750 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG) a las 80 horas.

Posteriormente se realizaron dos inseminaciones artificiales cervicales estándar a modo tradicional, a las 36 y 42 horas después de la inyección de hCG y todas las cerdas fueron asignadas aleatoriamente por número de parto en tres grupos dependiendo del tipo de inseminación realizada (el semen y el plasma seminal procedían de un *pool* de los mismos verracos utilizados en el experimento anterior):

- Inseminación artificial cervical con semen refrigerado (3×10^9 espermatozoides).
- Inseminación artificial cervical con semen criopreservado (5×10^9 espermatozoides).
- Inseminación artificial cervical con semen criopreservado (5×10^9 espermatozoides), suplementado con un 50% de plasma seminal.

Posteriormente, se valoró el estado de gestación mediante ecografía a tiempo real a los veintiocho días después de la inseminación dejando llevar a término la gestación.

Porcentaje de gestaciones, partos y tamaño de camada

La inseminación artificial cervical con semen criopreservado provocó una reducción de la fecundidad (porcentaje de gestaciones y porcentaje partos) y de la prolificidad (tamaño de camada), respectivamente, sin embargo, este efecto no se observó cuando el semen descongelado se suplementó con un 50% de plasma seminal. Por otro lado, no hubo efecto del tratamiento sobre el porcentaje de partos.

Podemos concluir afirmando que:

- La adición de un 50% de plasma seminal a los medios de dilución de los espermatozoides para su descongelación mejora significativamente la viabilidad y movilidad espermática, prolongando la vida útil de los espermatozoides con la consiguiente mejora en la fecundidad de la cerda.
- La posibilidad de mejorar los resultados de fecundidad y prolificidad con semen criopreservado a través de diversas estrategias, como la adición de plasma seminal tras la descongelación, podrá incrementar el uso de semen congelado en el ganado porcino, mejorando su disponibilidad en el espacio y en el tiempo. ■

*Colaboradores: B. Alegre ¹; J.C. García ¹; M. Abad ¹; R. Kirkwood ²; D. Martín ¹; R. Manjarín³; C. Gómez¹. Facultad Veterinaria de León (España) ¹; Facultad Veterinaria de Adelaida (Australia) ²; Facultad Veterinaria de Michigan (EEUU) ³.

Para solicitar la bibliografía disponible contacte con: mundoganadero@eumedia.es

Y... ¿POR QUÉ HYPOR?

DESCÚBRALO EN NUESTRO STAND EN FIGAN 2015,
PABELLÓN 6, CALLES C-D. STANDS 7-10