

Alejandro Córdova Izquierdo, M. Silvia Córdova Jiménez, C. Alejandro Córdova Jiménez, José Pérez  
Gutiérrez, Santiago Martín Rillo

Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante in vitro de los  
espermatozoides

Ciencia Ergo Sum, vol. 12, núm. 3, noviembre-febrero, 2005, pp. 271-274,

Universidad Autónoma del Estado de México

México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10412306>



*Ciencia Ergo Sum,*

ISSN (Versión impresa): 1405-0269

[ciencia.ergosum@yahoo.com.mx](mailto:ciencia.ergosum@yahoo.com.mx)

Universidad Autónoma del Estado de México

México

¿Cómo citar?

Fascículo completo

Más información del artículo

Página de la revista

[www.redalyc.org](http://www.redalyc.org)

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides

Alejandro Córdova Izquierdo\*, M. Silvia Córdova Jiménez\*, C. Alejandro Córdova Jiménez\*, José Pérez Gutiérrez\*\* y Santiago Martín Rillo\*\*†

Recepción: 13 de enero de 2005

Aceptación: 17 de mayo de 2005

\*Departamento de Producción Agrícola y Animal. Ecodesarrollo de la Producción Animal, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calz. del Hueso 1100, col. Villa Quietud, C.P. 04960, México, D.F.

Correo electrónico: aci57@prodigy.net.mx

\*\*Departamento de Medicina y Sanidad.

Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid. 28040. Madrid, España.

**Resumen.** Se valoró la capacidad fecundante *in vitro* de los espermatozoides de verraco congelados en pajillas de 0.5 y 5 ml. Los mejores resultados de fecundación *in vitro* (FIV) monospermica se obtuvieron con los espermatozoides congelados-descongelados en pajillas de 5 ml. Sin embargo, no se encontró diferencia ( $P > 0.05$ ) entre los dos tipos de envases utilizados en cuanto a los porcentajes de polispermia y penetración. Estos resultados son prometedores para el uso futuro del semen de verraco congelado-descongelado en la inseminación artificial.

**Palabras clave:** semen, verraco, congelación, capacidad de fecundación *in vitro*.

## Freezing of Boar Semen in Two Types of Straw, and Sperm *In Vitro* Fertilizing Capacity

**Abstract.** The *in vitro* fertilizing capacity of frozen sperm in 0.5 and 5 ml straws was assessed. The best results for monospermic *in vitro* fertilizing were obtained from frozen-thawed sperm in 5 ml straws. However, no difference was seen between the two types of containers, regarding the polyspermy and penetration percentages. This are promising results for future usage of frozen-thawed boar semen in artificial insemination.

**Key words:** semen, boar, freezing, *in vitro* fertilizing capacity.

## Introducción

La utilización práctica de semen congelado de verraco es aún reducida (Córdova, 2002; Peláez *et al.*, 2002a; Córdova *et al.*, 2004). Su uso se ha limitado principalmente por la baja supervivencia espermática (30-40%) y a una fertilidad menor, comparadas con lo que se ha obtenido con la utilización de semen fresco (Gilmore *et al.*, 1998; Peláez *et al.*, 2002a).

Con la congelación del semen de verraco podría disponerse de mejores opciones para el mejoramiento del mane-

jo reproductivo en la especie porcina. La tecnología de la congelación del semen de verraco representa una alternativa, entre cuyas cualidades se encuentran: a) establecimiento de bancos de semen congelado de razas o líneas con características zootécnicas de importancia económica, que garanticen la disponibilidad de material germinal en el momento que se requiera, b) disponer de material germinal de machos probados genéticamente, aun cuando el animal ya no exista, c) superar ciertas restricciones intencionales de transporte de animales vivos, por el problema de transmisión de enfermedades, y d) superar las limitantes de tiempo

de viabilidad del semen fresco diluido (Peláez *et al.*, 2002b; Roca *et al.*, 2002).

Se han realizado muchos intentos para entender y evitar las condiciones perjudiciales potenciales durante la criopreservación reduciendo la cantidad total de hielo formado o evitando su formación. Una hipótesis implícita es que las condiciones que conducen a la formación de hielo en el interior de la célula es inevitablemente letal; por lo tanto, la congelación exitosa debe evitar esas condiciones. Esto ha resultado de la falta de información sobre los mecanismos por los cuales se forma hielo en las células vivas y la naturaleza de su daño (Muldrew y McGann, 1990; Córdova *et al.*, 2002; Peláez *et al.*, 2002c).

La forma de almacenamiento de los espermatozoides en congelación se conoce como geometría de congelación. Se cree que influye en la transferencia de la temperatura y la viabilidad espermática durante el proceso de congelación-descongelación (Weitze *et al.*, 1988; Peláez *et al.*, 2002c). Las pajillas más utilizadas son las de 5 ml; sin embargo, presentan cierto problema criobiológico, tales como la velocidad de enfriamiento y descongelación, las cuales pueden variar a través de la pajilla misma, entre la parte periférica y central (Bwanga, 1990; Hofmo y Amlid, 1991; Peláez *et al.*, 2002c).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la congelación-descongelación del semen de verraco en pajillas de 0.5 y 5 ml sobre la capacidad de fecundación *in vitro* (FIV) de los espermatozoides.

## 1. Material y métodos

Todos los medios utilizados en la capacitación, maduración *in vitro* de los ovocitos y FIV fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St, Louis, Missouri. El semen se extrajo de tres machos diferentes. Solamente se consideraron muestras de eyaculados con motilidad en fresco mayores de 80% y 4 de calidad en el movimiento, y 80% de integridad acrosomal (NAR).

Las variables de estudio se evaluaron por triplicado con el siguiente procedimiento:

### 1.1. Análisis del semen

El semen fue evaluado inmediatamente después de la recolección del eyaculado. El volumen se midió con una probeta graduada en ml. La motilidad se analizó colocando una gota de la muestra sobre un portaobjetos previamente calentado en una platina térmica, cuya temperatura fue de 42°C con un cubreobjeto, y se observó al microscopio a 20 y 40X. Los resultados se expresaron en porcentaje, de 0 a 100.

La concentración de espermatozoides/ml se analizó con una cámara de Bürker según el método mencionado por Martín Rillo (1989); para ello se tomó una muestra de semen de 1 ml y se diluyó en 100 ml de una solución formolada al 3%.

El porcentaje de acrosomas normales (NAR), se analizó mediante la técnica indicada por Martín Rillo *et al.* (1996). En una gota de semen diluido en 1 ml de solución de citrato de formol al 3%, los espermatozoides fueron observados al microscopio con el objetivo de inmersión, 100X, se analizaron 100 espermatozoides por muestra. Solamente se utilizaron las muestras cuya motilidad en fresco fue mayor a 80% y 70-80% de NAR.

### 1.2. Calidad de movimiento espermático

La calidad del movimiento espermático fue evaluado según la escala siguiente:

0. No se observa ningún movimiento espermático.
1. Existe movimiento pero no es progresivo.
2. Movimientos progresivos en un número bajo de espermatozoides y el resto con 3 movimientos anormales.
3. Movimientos progresivos.
4. Movimientos progresivos y rápidos.
5. Movimientos muy rápidos.

### 1.3. Congelación del semen

La congelación del semen se realizó con base en el método descrito por Westendorf *et al.* (1975), en pajillas de 0.5 y 5 ml.

### 1.4. Descongelación del semen

Las pajillas de 0.5 se descongelaron en baño María a 42°C durante 12 segundos, y las de 5 ml a 50°C durante 40 segundos. Después de la descongelación, se analizó la motilidad y NAR.

### 1.5. Capacitación *in vitro* de los espermatozoides

La capacitación espermática se realizó en medio de capacitación *in vitro* TALP-hepes (Córdova *et al.*, 1997). El semen fue centrifugado a 500g durante 10 minutos para retirar el plasma seminal en el fresco y los componentes de congelación en el descongelado. Los espermatozoides procedentes de semen fresco y descongelado se capacitaron en 2.5 y 1.5 horas respectivamente.

### 1.6. Transporte de ovarios y obtención de ovocitos

Los ovarios para la obtención de ovocitos se transportaron al laboratorio en un termo con 200 ml de suero fisiológico estéril a una temperatura de 35°C (Abeydeera y

Day, 1997a y b) con 50 mg/ $\mu$ l de sulfato de gentamicina (Córdova *et al.*, 1997) en un tiempo de 1 a 1.5 hora. Los ovarios fueron lavados dos veces con suero fisiológico estéril. Los ovocitos fueron recolectados de folículos de 3-6 mm de diámetro por aspiración, mediante una jeringa estéril de 5 ml y una aguja de 18GX de acuerdo con Ka *et al.* (1997). El líquido folicular se depositó en tubos de centrifuga de punta cónica y se dejó en reposo durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante con pipeta Pasteur y el paquete de ovocitos se resuspendió en medio TCM 199. La suspensión de ovocitos se colocó en caja de petri y se observó al microscopio estereoscópico para su recolección y selección. Se colocaron en placas estériles de cuatro pocillos para lavarlos, en gotas de 250 ml medio TCM 199.

### 1.7. Maduración in vitro de los ovocitos

Los ovocitos seleccionados se colocaron en placas estériles de cuatro pocillos con 100 ml de medio TCM-199 enriquecido con 2 UI/ml de pergonal (FSH y LH, Serono México) y 1  $\mu$ l de  $\beta$ -estradiol a 38° en condiciones de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> durante 44 horas.

### 1.8. Fecundación in vitro

Los ovocitos libres de células del cúmulo se depositaron en placas estériles de cuatro pocillos con gotas de 100  $\mu$ l de medio TCN-199 enriquecido con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1mg/ml de glucosa, 0.25mM de piruvato de sodio, 10 $\mu$ g/ml de gentamicina y 1 $\mu$ g/ml de  $\beta$ -estradiol ajustado a una presión osmótica de 280 a 290 mOsm/kg, inmersos en aceite mineral. Se incubaron a 38°C en condiciones de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se coincubaron con los espermatozoides a una concentración de 5 x 10<sup>4</sup> espermatozoides/ml, se colocaron de 30-40 ovocitos por placa (Córdova *et al.*, 1997) durante 12 horas (Abeydeera y Day, 1997a y b).

### 1.9. Fijación y tinción de los ovocitos

Los ovocitos fueron fijados en metanol y ácido acético a la proporción de 3:1 durante 24 horas (Abeydeera y Day, 1997a y b).

### 1.10. Valoración de la fecundación in vitro

Los ovocitos fueron teñidos con orceína acética al 2% y se evaluaron monospermicos, plispermicos y penetrados, considerando la formación de pronúcleo.

**Cuadro 1. Medias y errores estándar de las variables estudiadas.**

Variable	N	Semen fresco	Semen descong. 0.5 ml	Semen descong. 5 ml
Monospermia	9	80.68 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	66.89 $\pm$ 0.90 <sup>b</sup>	69.33 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>
Polispermia	9	11.51 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	10.49 $\pm$ 0.34 <sup>a, b</sup>	9.74 $\pm$ 0.33 <sup>b</sup>
Penetración	9	92.19 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	77.38 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	79.07 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup> Los valores dentro de la misma fila con la misma letra significa que no existe diferencia significativa (P>0.05).

### 1.11. Análisis estadístico

Los datos fueron tratados mediante análisis de varianza para medidas repetidas y *test* de comparaciones múltiples, con el uso del software SAS (sistema de análisis estadístico) (SAS/STAT, 1997). Se consideró diferencia significativa para una probabilidad P<0.05. Para preservar el nivel de significación general en los *tests* de comparaciones múltiples, se penalizó el nivel de significación de cada *test* individual dividiéndolo por el número de comparaciones realizadas.

## 2. Resultados

El cuadro 1 presenta los resultados obtenidos de monospermia (FIV), polispermia y penetración.

## 3. Discusión

En este trabajo se aprecia el efecto de la congelación del semen de verraco en pajillas de 0.5 y 5 ml sobre la capacidad de FIV de los espermatozoides, donde la penetración espermática, la polispermia, la motilidad y NAR se reducen de igual manera. Sin embargo, se afectan más los porcentajes de monospermia con semen procedente de pajillas de 0.5 ml.

Por otro lado, se observa que el semen congelado en pajillas de 5 ml afecta menos las características de FIV de los espermatozoides que el almacenado en pajillas de 0.5 ml, datos que concuerdan con los reportados por Torreta *et al.* (1996).

En años recientes, se ha indagado la posibilidad de congelar el semen de verraco en bolsas de plástico de pared delgada con volumen de 5 ml, lo cual pretende superar los problemas criobiológicos y prácticos existentes con los envases hasta la fecha utilizados (Rodríguez Martínez *et al.*, 1996; Peláez *et al.*, 2002a). No obstante, aunque su uso puede ser factible, todavía presentan problemas de almacenamiento y descongelación.

Los mejores resultados de FIV monospermica se obtuvieron con los espermatozoides congelados-descongelados en pajillas de 5 ml. Estos datos contrastan con los obtenidos por Rodríguez Martínez *et al.* (1996), quienes

indicaron que los volúmenes más pequeños son mejores en cuanto a la supervivencia de los espermatozoides descongelados. Sin embargo, en este trabajo no se encontró diferencia entre los dos tipos de pajillas para polispermia y penetración.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo de FIV monospermica son prometedores para el uso futuro la inseminación artificial de la especie porcina con semen congelado-descongelado en pajillas de 5 ml.

## Bibliografía

- Abeydeera, L. R. y B. N. Day  
 \_\_\_\_\_ (1997a). "Fertilization and Subsequent Development *in Vitro* of Pig Oocytes Inseminated in a Modified Tris-Buffered Medium with Frozen-Thawed Ejaculated Spermatozoa", *Biol. Reprod.* 57: 729-734.
- \_\_\_\_\_ (1997b). "In vitro Penetration of Pig Oocytes in a Modified Tris-Buffered Medium: Effect of BSA, Caffeine and Calcium", *Theriogenology*. 48: 537-544.
- Bwanga, C.O. (1990). *Cryopreservation of Boar Semen. Studies on Freezing, Packaging and Fertilizing Capacity*. Tesis. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine. Uppsala, Suecia.
- Córdova, A.  
 \_\_\_\_\_ (2002). "Biotecnología de la reproducción en la especie porcina: papel de la criopreservación espermática", *Porci. Aula Veterinaria. Monografía de actualidad. Tratado de gando porcino*. 72: 11-20.
- \_\_\_\_\_; J. F. Pérez; B. Lleo; C. García; A. Álvarez; D. Volodymyr y S. Martín (2002). "In Vitro Fertilizing Capacity and Chromatin Condensation of Deep Frozen Boar Semen Packaged in 0.5 and 5 ml Straws", *Theriogenology*. 57: 2119-2128.
- \_\_\_\_\_; Y. Ducolomb; Y. Jiménez; E. Casas; E. Bonilla y M. Betancourt (1997). "In Vitro Fertilizing Capacity of Frozen-Thawed Boar Semen", *Theriogenology*. 47: 1309-1317.
- \_\_\_\_\_; J. F. Pérez y S. Martín (2004). "Fases previas y postcongelación del semen de verraco en pajillas de 5 ml y capacidad de fecundación de los espermatozoides", *Universidad y Ciencia*. 20 (40): 23-29.
- Gilmore, J.; A. J. Liu; A. T. Peter y J. K. Critser (1998). "Determination of Plasma Membrane Characteristics of Boar Spermatozoa and their Relevance to Cryopreservatin", *Biol. Reprod.* 58: 28-36.
- Hofmo, P. O. y T. Almid (1991). "Recent Development in Freezing of Boar Semen with Special Emphasis on Cryoprotectants", *Reprod. Dom. Anim. Suppl.* 1: 111-122.
- Ka, H-H.; K. Sawai y W-H.Wang (1997). "Amino Acids in Maturation Medium and Presence of Cumulus Cells at Fertilization Promote Male Pronuclear Formation in Porcine Oocytes Matured and Penetrated *in Vitro*", en K. S. y K. Niwa, *Biol. Reprod.* 57: 1478-1483.
- Martín, S.  
 \_\_\_\_\_ (1989). *Aportación al estudio de la congelación del semen de verraco*. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, España.
- \_\_\_\_\_; E. Martínez; C. García y C. de Alaba (1996). "Boar Semen evaluation in Practise", *Reprod. Dom. Anim.* 35: 519-526.
- Muldrew, K. y L. E. MacGann (1990). "Mechanisms of Intracellular Ice Formation", *Biohys. J.* 57: 525-532.
- Peláez, J.  
 \_\_\_\_\_; J. C. Domínguez; F. J. Peña; B. Alegre; A. Ferraras y P. Robles (2002a). "Tecnología de la criopreservación espermática en la especie porcina", *Porci. Aula Veterinaria. Monografía de actualidad. Tratado de gando porcino*. 72: 37-48.
- \_\_\_\_\_; J. C. Domínguez; F. J. Peña; B. Alegre; A. Córdova; A. Ferraras y P. Robles (2002b). "Utilización de esperma congelado en la inseminación artificial del ganado porcino", *Porci. Aula Veterinaria. Monografía de actualidad. Tratado de ganado porcino*. 72: 49-60.
- \_\_\_\_\_; J. C. Domínguez; F. J. Peña; B. Alegre; A. Ferraras y P. Robles (2002c). "Conceptos básicos en criobiología del espermatozoide", *Porci. Aula Veterinaria. Monografía de actualidad. Tratado de ganado porcino*. 72: 23-36.
- Roca, J.; G. Carvajal; T. Cremales; J. M. Vázquez; X. Lucas y E. Martínez (2002). "Estrategias para mejorar la viabilidad, fertilidad y prolificidad de los espermatozoides criopreservados de porcino", *Porci. Aula Veterinaria. Monografía de actualidad. Tratado de ganado porcino*. 72: 61-75.
- Rodríguez, H.; B. Eriksson y N. Lundeheim (1996). "Freezing Boar Semen in Flat Plastic Bags Membrane Integrity and Fertility", *Reprod. Dom. Anim.* 31: 161-168.
- SAS/STAT (1997). *User's guide, version 6*. SAS Institute Inc., SAS Campus Drive, Cary, Carolina del Norte.
- Torreta, M. E.; C. A. Wevar; O. D. Forchetti y S. Ferrero (1996). "Calidad espermática *in vitro* del semen porcino congelado en macropajuelas, micropajuelas y pastillas", *Avances en Producción Animal* 21: 185-189.
- Weitze, K. F.; D. Rath y H. Leps (1988). "Influence of Volumen/Syrface Ratio of Plastic Packages upon Freeze Thaw and Fertility of Boar Semen", *11th Int. Cong. Anim. Reprod. and AI*, Dublin, Irlanda. vol. 3: 312.
- Westendorf, P.; L. Richter y H. Treu (1975). "Zur Tiergefrierung von Ebersperma. Laborund Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberg Pailletten-Verfahren", *Dtsch. Tieraerztl. Wochenschr.* 82: 261.