



Evaluación *in vitro* de la viabilidad del semen porcino hasta 120 horas de almacenamiento en refrigeración¹

Orlando Díaz², H. Mesa², Germán Gómez², Francisco Javier Henao³

²Departamento de Sistemas de Producción, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

³Instituto de Biotecnología Agropecuaria, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

fhenao@ucaldas.edu.co

(Recibido: 5 febrero, 2008; aprobado: 1 mayo, 2008)

RESUMEN: El objetivo del presente estudio fue evaluar los cambios de pH, morfología, integridad acrosomal y supervivencia espermática, de semen diluido en BTS y refrigerado de 11 verracos (siete línea paterna y cuatro línea materna), cada 24 horas, desde 0 h (momento de recepción) hasta 120 h, tres veces con intervalos de un mes. Los análisis estadísticos se realizaron usando PROC GLM, MIXED y GENMOD de SAS (SAS Inst. Cary, NC), por medio de un modelo mixto para evaluar el efecto del tiempo de almacenamiento (TA) y de línea, sobre las variables evaluadas. Se utilizó la prueba de χ^2 para evaluar el efecto TA sobre células de descamación y aglutinación. A las 120 h, los espermatozoides con acrosoma normal disminuyeron; la línea materna tuvo 24,3% menos probabilidades de presentar aglutinación espermática. No se encontró efecto significativo de línea y TA sobre: morfología, pH, supervivencia espermática y presencia de células de descamación. Se concluyó que el semen porcino diluido en BTS, con 3×10^9 espermatozoides y refrigerado, mantiene características indicativas de viabilidad hasta las 120 h de almacenamiento. La evaluación seminal *in vitro* es una herramienta que ofrece la posibilidad de utilizar dosis seminales que potencialmente son desperdiciadas.

Palabras clave: calidad espermática, almacenamiento de semen, porcinos

In vitro evaluation of the viability of boar semen until 120 hours of refrigeration

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the changes in pH, morphology, acrosomal integrity and sperm survival, of BTS diluted and refrigerated semen of 11 boars (seven paternal and four maternal line), every 24 hours, from 0 h (reception time) until 120 h, three times at monthly intervals. Statistical analysis were carried out with PROC GLM, MIXED and GENMOD of SAS using a mixed model to evaluate the effects of storage time (TA) and genetic line, on the evaluated variables. A χ^2 test was used to evaluate TA effect on detritus and agglutination cells. At 120 h, the sperm cells with normal acrosome diminished; the maternal line has 24.3% less probabilities of showing sperm agglutination. No significant effect of line and TA was identified on morphology, pH, sperm survival and detritus cell presence. It was concluded that boar semen diluted in BTS, with 3×10^9 spermatozoa and stored at 17°C, maintains indicative viability characteristics up to 120 h of storage. *In vitro* semen evaluation is a tool that offers the chance of using seminal doses otherwise wasted.

Key words: acrosomal, spermatic quality, boar, swine

¹ Contribución del grupo de investigación SALUD PRODUCTIVA VETERINARIA.

Introducción

En agosto de 2005, la Asociación Colombiana de Porcicultores (ACP) calculó el costo de mantener un verraco en \$704.000. Granjas donde utilizan más verracos de los necesarios, reducirían costos al optimizar el uso del semen de unos pocos machos. Para la ACP el promedio del costo de producción de una camada de 6 lechones destetos fue \$140.000 y el costo promedio de una camada de 10 fue \$97.000. Estas cifras ilustran la importancia de alcanzar altos tamaños de camada.

Gadea et al. (2004) mostraron que dosis seminales con un alto porcentaje de células normales resultan en mayor fertilidad. Sin embargo, una tasa de concepción alta y un tamaño y viabilidad de camada igualmente altos dependen de muchas variables que son afectadas por el estado fisiológico de machos y hembras (Sutkevičienė & Ūilinskas, 2004). Algunas investigaciones ilustran la importancia de la calidad espermática por su relación con el tamaño de camada y tasa de partos (Braundmeier et al., 2004; Gadea et al., 2004; Ardón et al., 2005) e indicadores sensibles de competitividad en la industria porcina (Tess et al., 1983; Legault et al., 1983). La evaluación seminal como herramienta de análisis facilita la optimización de los verracos, al reducir su número necesario, y da un valor comercial a dosis seminales que podrían ser desperdiciadas. El objetivo de esta investigación fue determinar por medio de pruebas *in vitro* la viabilidad del semen porcino diluido refrigerado y generar información para disminuir los costos de producción, lo que debe resultar en el mejoramiento de la rentabilidad.

Materiales y Métodos

General: Se analizaron muestras de semen de 11 verracos (siete de línea paterna y cuatro de línea materna) con edades entre los dos y los cinco años, pertenecientes al Centro de Inseminación de CERCAFÉ, ubicado en la vereda La Floresta, municipio de Chinchiná, departamento de Caldas, a una altura de 1.378 m.s.n.m. y con una

temperatura entre 17 y 24°C. Los verracos fueron alimentados con concentrado con 16% de proteína, 3% de grasa, 8% de fibra, 9% de cenizas y 13% de humedad (1 kg, dos veces al día), y agua a voluntad, alojados en corrales individuales de 2,5 por 3,0 m, inmunizados semestralmente contra Parvovirus, Leptospirosis, Erisipela, Peste Porcina Clásica y Fiebre Aftosa, y desparasitados cada tres meses con ivermectina. Los eyaculados se colectaron entre las 04:00 y 06:00 horas por la técnica de la mano enguantada, se envasaron en dosis con 3×10^9 espermatozoides diluidos en BTS para un volumen final de 80 a 100 ml. Las muestras fueron recibidas en el laboratorio en condiciones consideradas representativas de la llegada a granja.

Evaluación de muestras de semen: En el momento de llegada al laboratorio (0 h), a cada muestra se le evaluó la temperatura para luego almacenarla a 17°C en una nevera exclusiva para muestras de semen. A partir de las 0 h, a cada submuestra se le evaluó el pH, la morfología, la integridad acrosomal y la supervivencia espermática cada 24 h hasta las 120 h; cada evaluación se repitió tres veces con intervalo de un mes.

Concentración: En la cámara de Bürker, con cinco μl de una dilución 1:200 (cinco μl semen y 995 μl de solución salina formulada) en un microscopio Nikon YS2 de luz a 400X de aumento, se contaron los espermatozoides en 40 cuadros y el resultado se multiplicó $\times 2 \times 10^7$ (millones/ml).

Morfología: Se clasificaron 300 espermatozoides fijados con solución salina formulada, en un microscopio de contraste de fases Jenamed 2 a 400X de aumento. Se determinó el porcentaje de espermatozoides normales, con defectos de cabeza (suelta, macrocabeza, microcabeza, piriforme), tracto intermedio (doble, excéntrico, lazo, engrosado), cola (látigo, ovillo, lazo, escalera), gota citoplásmica (proximal, distal), y el grado de aglutinación espermática y células de descamación se calificó con cero a tres cruces (cero = ausencia), según lo aplicado por Gadea et al. (2004).

Integridad acrosomal: Se clasificaron 200 espermatozoides (en dos conteos independientes de 100) fijados con glutaraldehído (al 2% en BTS), en microscopio de contraste de fases a 1000X de aumento. Se determinó el porcentaje de espermatozoides con acrosoma tipo NAR (Cresta Apical Normal), DAR (Cresta Apical Dañada), MAR (Cresta Apical Perdida) y LAC (Capuchón Acrosomal Suelto), con base en la clasificación de Pursel et al. (1972a).

Supervivencia: Sobre una placa se mezcló semen y Eosina-Nigrosina a partes iguales para realizar un extendido y dejarlo secar a temperatura ambiente. En un microscopio de luz a 400X de aumento se clasificaron 100 espermatozoides determinando como vivos los que permanecieron translúcidos, según lo aplicado por Gadea et al. (2004).

Procedimientos estadísticos: Se utilizaron los PROC GLM, MIXED y GENMOD de SAS (SAS Inst. Cary, NC). Un modelo mixto para medidas repetidas en el tiempo se usó para evaluar el efecto de tiempo de almacenamiento y efecto de línea (paterna y materna) sobre: morfología, integridad acrosomal, supervivencia y pH. Los resultados se presentan como medias de mínimos cuadrados \pm error estándar y las comparaciones múltiples se realizaron usando el ajuste de Tukey-Kramer. El efecto de tiempo de almacenamiento sobre la variable presencia de células de descamación y de aglutinación se evaluó mediante prueba de χ^2 .

Resultados y Discusión

La fuente de variación mes fue considerada como bloque para todos los análisis. El tiempo de almacenamiento afectó significativamente la proporción de espermatozoides con acrosoma tipo NAR, DAR y LAC ($P < 0,05$). En 0 h, el promedio de espermatozoides con acrosoma tipo NAR fue $91,3 \pm 2,3\%$ y disminuyó a $86,7 \pm 2,3\%$ en 96 h y a $85,8 \pm 3,4\%$ en 120 h ($P < 0,01$; Figura 1). Los espermatozoides con acrosoma tipo DAR aumentaron significativamente entre 0 h y 120

h ($3,85 \pm 0,58$ vs. $6,4 \pm 0,67\%$, respectivamente; $P < 0,01$, Figura 2). El tiempo de almacenamiento no afectó los espermatozoides con acrosoma tipo LAC en 0 h, 24 h, 48 h, 72 h y 120 h ($1,25 \pm 0,96$; $2,86 \pm 0,96$; $2,95 \pm 0,96$; $2,59 \pm 0,96$ y $3,07 \pm 1,04\%$, respectivamente) pero en 96 h ($3,3 \pm 0,96\%$) fue superior a 0 h ($P < 0,05$, Figura 3). La variable línea no fue significativa para la integridad acrosomal ($P > 0,05$).

Estos resultados ilustraron un deterioro en el tiempo de almacenamiento en refrigeración, lo que concuerda con los estudios de Pursel et al. (1972a; 1972b). Estos autores concluyeron que el frío provoca un deterioro progresivo del acrosoma, ya que el espermatozoide porcino es particularmente diferente al de otras especies por poseer una susceptibilidad extrema al frío. Johnson et al. (2000) concluyeron que la temperatura y el medio de suspensión son dos elementos importantes que se deben tener en cuenta para tomar decisiones en el almacenamiento de semen porcino en diluyente líquido para su posterior utilización. El estado de normalidad acrosomal es muy importante a la hora de fertilizar el ovocito, ya que en él se encuentran elementos indispensables para la penetración en la zona pelúcida (Polakoski & McRorie, 1973) y los promedios mínimos encontrados en este estudio (Figura 1) son muy superiores a los mínimos recomendados (mayor a 49%) para su utilización (Rozeboom, 2000).

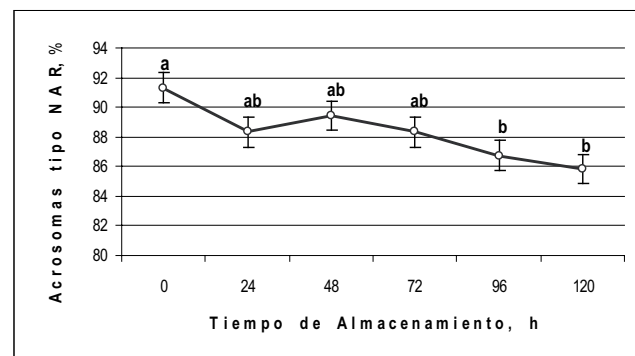


Figura 1. Proporción de espermatozoides con cresta apical normal (NAR) durante el almacenamiento en refrigeración. *Percentage of sperm with normal apical ridge (NAR) during the store in refrigeration.*

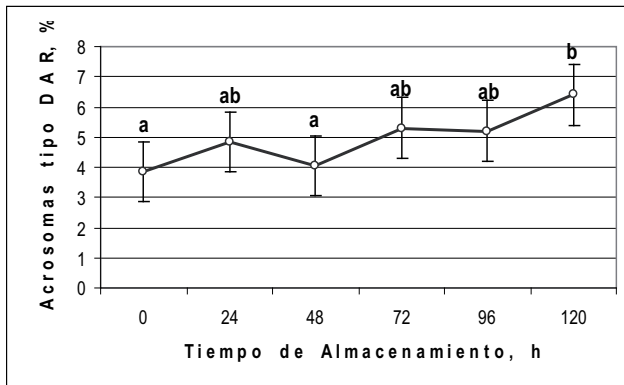


Figura 2. Proporción de espermatozoides con cresta apical dañada (DAR) durante el almacenamiento en refrigeración. *Percentage of sperm with damaged apical ridge (DAR) during the store in refrigeration.*

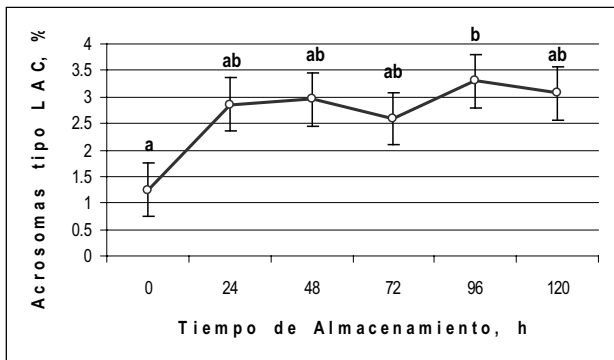


Figura 3. Proporción de espermatozoides con capuchón acrosomal suelto (LAC) durante el tiempo de almacenamiento en refrigeración. *Percentage of sperm with loose acrosomal cap (LAC) during the store in refrigeration.*

Los verracos de línea materna presentaron 24,3% menos probabilidades de aglutinación que la línea paterna ($P < 0,01$). La causa de este hallazgo no es clara pero pueden presumirse dos posibilidades: 1) los machos de línea materna poseen mayor heterosis (Johnson, 1981), en consideración a que son el producto del apareamiento de dos razas puras, mientras que los de línea paterna son el producto de animales presumiblemente puros; 2) los operarios modifican el proceso de colección sin supervisión. Estos procedimientos requieren ser realizados por operarios técnicamente capacitados (Althouse & Lu, 2005). La aglutinación espermática es un factor limitante de la motilidad y puede ser inducida por: acción del cAMP (adenosin monofosfato cíclico) sobre la concentración externa de Ca^{2+} (Harayama et al., 2003), presencia de plasma seminal (Schmidt

& Kamp, 2004) o contaminación bacteriana, fúngica o presencia de esteroides (Berger et al., 1989; Briz et al., 1995; Flowers, 2004). En este último caso hay un daño adicional del acrosoma espermático. Determinar exactamente la causa de aglutinación no fue un objetivo de este trabajo, pero da pautas para adelantar trabajos de mayor envergadura.

En este estudio no se encontró efecto del tiempo de almacenamiento sobre acrosoma tipo MAR, pH, supervivencia, presentación de aglutinación o células de descamación, ni morfología de cabeza, tracto intermedio o cola ($P > 0,05$). Los resultados de pH y supervivencia concordaron con los resultados presentados por Vyt et al. (2004).

La proporción de espermatozoides anormales es especialmente relevante debido a las consecuencias económicas negativas reflejadas en la alta tasa de retorno al celo y en el reducido tamaño de camadas (Sutkevičienė & Ūtilinskas, 2004). Flowers (2002) demostró que dosis seminales con normalidad morfológica de 91%, con 3×10^9 espermatozoides, resultan en un tamaño de camada entre 10,2 y 11,5 lechones, y entre 9,1 y 10,1 lechones con dosis de 2×10^9 . El número de espermatozoides porcinos viables inoculados como dosis seminal, debe garantizar una adecuada acción de éstos en el oviducto, que penetren la zona pelúcida de los ovocitos y lleven a cabo fecundaciones efectivas (Flowers, 2002; Braundmeier et al., 2004; Ardón et al., 2005). La morfología del espermatozoide es un indicador de la espermatogénesis, y las alteraciones espermáticas en este proceso se pueden presentar por factores genéticos (Schlecht, 2004) o, principalmente, por alta frecuencia de colección (Briz et al., 1996).

En este estudio no se confrontaron los resultados encontrados *in vitro* con el desempeño reproductivo de los mismos machos en la granja. Sin embargo, los resultados proporcionan una aproximación a la calidad biológica que el material seminal posee a las 120 h de colectado, diluido en BTS y refrigerado a 17°C.

Conclusiones

El semen porcino diluido en BTS y almacenado en refrigeración por 120 h, mantiene los valores iniciales de integridad acrosomal, morfología, supervivencia y pH en condiciones aceptables. Los cambios estructurales de las células espermáticas en el tiempo de almacenamiento proveen información sustancial para tomar decisiones en el uso o descarte de material seminal almacenado en refrigeración, y un control periódico sobre los verracos facilitará la optimización o el descarte de animales sobresalientes o ineficientes, respectivamente. El efecto del control de la calidad seminal en porcinos debe ser el mejoramiento de la productividad. Confrontar la calidad del material seminal *in vitro* con los resultados de fertilidad en campo es un reto que los porcicultores colombianos deben afrontar para mejorar los indicadores productivos.

Referencias bibliográficas

- Althouse, G.C.; Lu, K.G. Bacteriospermia in extended porcine semen. **Theriogenology**, v.63, p.573-584, 2005.
- Ardón, F.; Evert, M.; Beyerbach, M.; et al. Accessory sperm: a biomonitor of boar sperm fertilization capacity. **Theriogenology**, v.63, p.1891-1901, 2005.
- Asociación Colombiana de Porcicultores-Fondo Nacional de la Porcicultura. **Costos de producción para diferentes etapas en explotaciones porcinas**, p.1-7, 2005. Disponible en: <<http://www.porcinoscolombia.org.co>> Accesado en: 31/03/2006.
- Berger, T.; Turner, K.O.; Meizel, S.; et al. Zona pellucida-induced acrosoma reaction in boar sperm. **Biology of Reproduction**, v.40, p.525-530, 1989.
- Braundmeier, A.G.; Demers, J.M.; Shanks, R.D.; et al. The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. **Journal of Animal Science**, v.82, p.452-458, 2004.
- Briz, M.D.; Bonet, S.; Pinart, B.; et al. Comparative study of boar sperm coming from the caput, corpus and cauda regions of the epididymis. **Journal of Andrology**, v.16, p.175-188, 1995.
- Briz, M.D.; Bonet, S.; Pinart, B.; et al. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. **Animal Reproduction Science**, v.43, p.221-239, 1996.
- Flowers, W.L. Increasing fertilization rate of boars: Influence of number and quality of spermatozoa inseminated. **Journal of Animal Science**, v.80, p.E47-E53 (E. Suppl. 1), 2002.
- Flowers, W.L. Detailed description of sperm motility/morphology and causes of abnormalities. Paper presented at **Midwest Boar Stud Conference II**. St. Louis, MO. p.15-22, 2004.
- Gadea, J.; Sellés, E.; Marco, M.A. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.303-308, 2004.
- Harayama, K.; Okada, K.; Miyake, M. Involvement of cytoplasmic free calcium in boar sperm: head-to-head agglutination induced by a cell-permeable cyclic adenosine monophosphate analog. **Journal of Andrology**, v.24, p.91-99, 2003.
- Johnson, R.K. Crossbreeding in swine: Experimental results. **Journal of Animal Science**, v.52, p.906-923, 1981.
- Johnson, L.A.; Weitze, K.F.; Fisher, P.; et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.
- Legault, C. Breeding for larger litters in swine. **Pork Industry Conference**, Urbana, IL. p.1-26, 1983.
- Polakoski, K.L.; McRorie, R.A. Boar acrosin. II classification, inhibition and specificity studies of a proteinase from sperm acrosome. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, p.8183-8188, 1973.
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Rampacek, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v.34, p.278-283, 1972a.
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Schulman, L.L. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.35, p.580-584, 1972b.
- Rozeboom, K.J. Evaluating of boar semen quality. **Animal Science Facts**. Publication number ANS 00-812S. Extension Swine Husbandry. College of Agriculture & Life Sciences. North Carolina State University. p.1-8, 2000. Disponible en: <<http://mark.asci.ncsu.edu/Publications/factsheets/812s.htm>> Accesado en: 18/06/2004.
- Schlecht, U.; Demougin, P.; Koch, R.; et al. Expression profiling of mammalian male meiosis and gametogenesis identifies novel candidate genes for roles in the regulation of fertility. **Molecular Biology of the cell**, v.15, p.1031-1043, 2004.

- Schmidt, H.; Kamp, G. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. **Reproduction**, v.128, p.171-179, 2004.
- Sutkevičienė, N.; Ūilinskas, H. Sperm morphology and fertility in artificial insemination boar. **Veterinaija ir Zootechnika**, v.26, p.11-13, 2004.
- Tess, M.W.; Bennett, G.L.; Dickerson, G.E. Simulation of genetic changes in life cycle efficiency of pork production. II. Effects of components on efficiency. **Journal of Animal Science**, v.56, p.354-368, 1983.
- Vyt, P.; Maes, D.; Dejonckheere, E.; et al. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.39, p.1-8, 2004.