



## Evaluación de la integridad acrosómica en semen de verraco<sup>1</sup>

ARTÍCULO ORIGINAL

Ricardo Eugenio Osorio-Serna<sup>2</sup>, Juan Felipe Giraldo<sup>2</sup>,  
Henry Mesa<sup>3</sup>, Germán Gómez-Londoño<sup>3</sup>, Francisco Javier Henao-Uribe<sup>4</sup>

<sup>2</sup> Laboratorio de Producción Porcina, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

<sup>3</sup> EPA, Departamento de Sistemas de Producción, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

<sup>4</sup> Instituto de Biotecnología Agropecuaria, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

fhenao@ucaldas.edu.co

(Recibido: 1 noviembre, 2006; aprobado: 30 marzo, 2007)

**RESUMEN:** Se ajustó un protocolo de evaluación de la integridad acrosomal de espermatozoides de verraco en semen fresco fijado con glutaraldehído al 2%, para usarlo en semen diluido a  $3 \times 10^6$  espermatozoides por ml en BSD-Lamons y refrigerado a 17°C. Se usaron 14 machos (3 de línea materna y 11 de línea paterna) muestreados en tres ocasiones para evaluar la integridad acrosomal en semen fresco (F), al llegar al laboratorio (0h), y a las 24, 48 y 72h después. La morfología acrosómica se clasificó en grupos, así: borde apical normal (NAR), borde apical faltante (MAR), borde apical dañado (DAR) y capuchón acrosomal desprendido (LAC). El efecto del tiempo de almacenamiento y de la línea genética se evaluó mediante análisis de varianza, usando un modelo mixto para medidas repetidas en un mismo individuo. En general, se observaron dos patrones de respuesta en la integridad acrosomal. Los resultados de F y 0h no fueron diferentes entre sí, pero fueron diferentes de los resultados a 24, 48 y 72h, los cuales no fueron diferentes entre sí. El porcentaje de NAR fue mayor ( $P < 0,001$ ) en F y 0h (promedio  $96,93 \pm 0,23\%$ ) que en 24, 48 y 72h (promedio  $93,72 \pm 0,49\%$ ), y fue mayor en la línea materna que en la línea paterna ( $95,84 \pm 0,32$  vs.  $94,18 \pm 0,22\%$ , respectivamente;  $P < 0,001$ ). Una técnica para la evaluación de la integridad acrosomal en semen fresco fue adaptada para emplearla en la evaluación de semen diluido, e indicó que puede emplearse para realizar evaluaciones seminales de control de calidad para semen diluido de uso comercial.

**Palabras clave:** acrosoma, evaluación seminal, porcino, reproducción

## Evaluation of acrosomal integrity in boar semen

**ABSTRACT:** A protocol for the evaluation of acrosomal integrity of fresh boar sperm fixed in 2% glutaraldehyde was adjusted for use in sperm diluted at  $3 \times 10^6$  spermatozoa per ml in BSD-Lamons and refrigerated at 17°C. Fourteen sires sampled three times (3 of maternal and 11 of paternal line) were used to evaluate acrosomal integrity in fresh semen (F), at laboratory arrival (0h), and 24, 48, and 72 h later. Acrosomal morphology was classified in the following groups: normal apical ridge (NAR), missing apical ridge (MAR), damaged apical ridge (DAR), and loose acrosomal cap (LAC). The effects of storage time and genetic line were analyzed using ANOVA with a mixed model for repeated measurements in the same individual. In general two response patterns were observed in acrosomal integrity. Results at F and 0h were not different between them, but were different from the results at 24, 48, and 72 h, which were not different among them. The percentage of NAR was higher ( $P < 0.001$ ) in F and 0h (mean  $96.93 \pm 0.23\%$ ) than at 24, 48, and 72 h (mean  $93.72 \pm 0.49\%$ ), and was higher in the maternal than in the paternal line ( $95.84 \pm 0.32$  vs.  $94.18 \pm 0.22\%$ , respectively;  $P < 0,001$ ). A technique for the evaluation of acrosomal integrity in fresh semen was adapted for evaluation of diluted sperm, indicating that it can be used for seminal evaluations for quality control of commercially available diluted semen.

**Key words:** acrosome, seminal evaluation, pig, reproduction

<sup>1</sup> Trabajo realizado por el Grupo de Investigación SALUD PRODUCTIVA VETERINARIA con el apoyo de la Cooperativa de Porcicultores del Eje Cafetero CERCAFÉ.

## Introducción

La probabilidad de predecir la habilidad fertilizante de un eyaculado tendría una alta repercusión económica, porque posibilitaría la selección de los verracos que poseen un buen desempeño reproductivo, medido en términos de fertilidad y prolificidad (Sutkevičienė & Žilinskas, 2004; Gadea, 2005). Las pruebas que se utilizan en el laboratorio están basadas exclusivamente en la evaluación de la estructura celular y no se acompañan de pruebas de campo que permitan respaldar los resultados encontrados, razón por la cual solo permiten una estimación del índice de fertilidad tanto *in vivo* como *in vitro* (Pérez-Llano et al., 2001; Saacke, 2004; Gadea, 2005).

Entre las pruebas de laboratorio disponibles, la prueba de funcionalidad de la membrana espermática es de particular importancia, por ser esta estructura la responsable de los procesos de capacitación, reacción del acrosoma, la unión con el ovocito, algunos procesos metabólicos y el regular intercambio con el medio (Harrison, 1997; Campi et al., 2004). El acrosoma es una vesícula secretoria del espermatozoide que contiene diferentes enzimas, especialmente acrosina, responsables de la digestión del cumulus oophorus y de la zona pelúcida (Polakoski & McRorie, 1973; Aguas & Pinto, 1985). Pursel et al. (1972) clasificaron la morfología del acrosoma en porcinos en cinco tipos: borde apical normal (**NAR**, Normal Apical Ridge), borde apical dañado (**DAR**, Damaged Apical Ridge), borde apical faltante (**MAR**, Missing Apical Ridge), capuchón acrosomal desprendido (**LAC**, Loose Apical Cap) y borde apical normal con partículas (**NAR'**, Normal Apical Ridge with particles).

El objetivo de esta investigación fue ajustar un protocolo de evaluación de la integridad acrosómica usado en semen fresco, para incluirlo dentro del análisis rutinario de semen diluido, refrigerado y transportado que se realiza en el Laboratorio de Producción Porcina de la Universidad de Caldas.

## Materiales y Métodos

Para este estudio se emplearon 14 machos 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 aproximada entre 17 y 24°C. Los verracos fueron alimentados con un concentrado que contenía el 16% de proteína, grasa del 3%, fibra del 8%, ceniza del 9% y humedad del 13% (un kg dos veces al día) y con agua a voluntad. Los animales fueron alojados en corrales individuales de 2,5 x 3,0 m. El plan vacunal del centro de inseminación de CERCAFÉ consiste en la inmunización semestral contra parvovirus, leptospirosis, erisipela, peste porcina clásica y fiebre aftosa. Los machos se vermifugaron cada tres meses con ivermectina.

### Colección de semen

En el centro de inseminación los machos fueron eyaculados cada seis días. La fracción rica del eyaculado fue colectada usando la técnica de la mano enguantada y una muestra de cada macho fue evaluada en tres ocasiones con intervalos de un mes. Uno de los machos se evaluó solo una vez por muerte y otro fue descartado antes de la tercera evaluación.

### Evaluación seminal

El semen fresco (**F**) fue preparado en el laboratorio de CERCAFÉ en dosis comerciales de 100 ml con  $3 \times 10^9$  espermatozoides en diluyente BSD-Lamons, acondicionando la temperatura del diluyente a la del semen. Aproximadamente 10h después, el semen llegó al Laboratorio de Producción Porcina de la Universidad de Caldas y fue refrigerado a 17°C. Estas condiciones se consideraron representativas del estado del semen al momento de su arribo a una granja comercial, lo que fue denominado como el tiempo **0h**. En este momento se evaluó la concentración espermática, con la cámara de Bürker y en un microscopio de

luz (Alphaphot 2; YS2; Nikon) con magnificación de 400X, en una muestra diluida 1:200 en solución salina fisiológica formolada (9 g NaCl + 997 ml agua estéril, destilada y desionizada + 3 ml Formaldehído al 37% J.T. Baker).

La morfología espermática se evaluó con un microscopio de contraste de fases (Zeiss Jenamed 2, Carl Zeiss, Jena), con magnificación de 400X, por conteo de 300 espermatozoides de una muestra de semen diluido 1:1 en solución salina fisiológica formolada al 0,3% en un tubo eppendorff. Una gota de la dilución se depositó en una lámina portaobjetos y se cubrió con una laminilla cubreobjetos; para la evaluación morfológica se tuvieron en cuenta anormalidades en cabeza (suelta, macrocabeza, microcabeza y periforme), tracto intermedio (doble, excéntrico, lazo y engrosado), cola (suelta, látigo, ovillo, lazo y escalera) y la presencia de gotas citoplasmáticas proximales y distales.

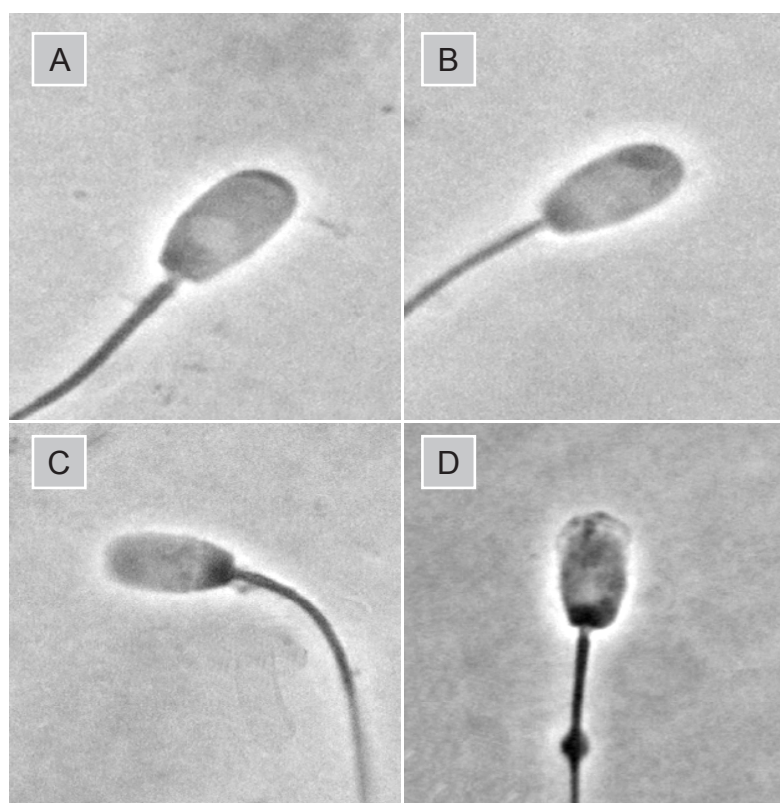
El número de espermatozoides vivos y muertos se determinó mediante la técnica de tinción con eosina-nigrosina por conteo de 100 espermatozoides en un microscopio de luz (Alphaphot 2; YS2; Nikon) con magnificación de 400X, y se clasificaron como vivos los espermatozoides traslúcidos y como muertos los coloreados parcial o totalmente. La funcionalidad de la membrana espermática se determinó mediante la prueba hipoosmótica HOST (Hipoosmotic Swelling Test) en un microscopio de contraste de fases con magnificación de 400X mediante dos conteos de 100 espermatozoides cada uno, que se promediaron; además, se clasificaron como positivos los que mostraron algún grado de enrollamiento del flagelo. El semen se mantuvo en el laboratorio a 17°C y fue evaluado nuevamente a las 24, 48 y 72 horas posteriores al primer conteo, con el fin de determinar el estado del acrosoma.

### **Evaluación de la integridad acrosómica**

Se usó un microscopio de contraste de fases con magnificación de 1000X, una rejilla de contraste (0,95–1,40) y aceite de inmersión (refringencia

1,515). Para la evaluación microscópica de la integridad acrosómica del semen fresco, éste fue diluido 1:9 en el diluyente BSD-Lamons (Lamons, Lleida, España). La muestra fue inmediatamente fijada en una solución de glutaraldehído al 2% (Solución acuosa al 70%; Sigma chem. Co., St. Louis, MO) en diluyente BSD-Lamons. La solución de glutaraldehído al 2% se mantuvo refrigerada a 5°C durante el transcurso de la investigación. El semen así preparado fue posteriormente transportado al Laboratorio de Producción Porcina de la Universidad de Caldas para la evaluación microscópica. El protocolo empleado para la evaluación del semen a las 0, 24, 48 y 72h consistió en la toma de 200 µl de semen diluido depositados en un tubo eppendorff para fijación, mezclados con igual volumen de glutaraldehído al 2%. Se tuvo en cuenta la recomendación de Pursel & Johnson (1974) de usar 10µl del semen fijado para evitar la compresión de la placa y de ubicar la muestra en el centro de una lámina portaobjetos escrupulosamente limpia. Se colocó una laminilla cubreobjetos y se llevó al microscopio de contraste de fases para realizar dos lecturas de 100 espermatozoides cada una, las cuales se promediaron.

El criterio de evaluación del acrosoma fue el empleado por Pursel et al. (1972), y consiste en clasificar como NAR aquellos espermatozoides en los cuales el capuchón estaba suavemente adherido al núcleo y poseían un borde apical que formaba una creciente suave; como DAR, aquellos en los que se observó un desprendimiento en la parte posterior del borde apical haciéndolo irregular; como MAR, los espermatozoides que carecían del borde apical pero cuyo capuchón acrosomal estaba fuertemente adherido a la cabeza del espermatozoide, y como LAC, aquellos espermatozoides que tenían una vesiculación del capuchón acrosomal anterior (Figura 1). Los acrosomas clasificados por Pursel et al. (1972) como NAR', que poseían las características de acrosomas tipo NAR pero con partículas de proteínas de plasma seminal en la parte posterior, se incluyeron en el grupo NAR por considerarse acrosomas normales.



**Figura 1.** (A) Espermatozoide con acrosoma tipo NAR (borde apical normal). (B) Espermatozoide con acrosoma tipo DAR (borde apical dañado). (C) Espermatozoide con acrosoma tipo MAR (borde apical faltante). (D) Espermatozoide con acrosoma tipo LAC (capuchón acrosomal d)

### Análisis estadístico

Se empleó el PROC MIXED del paquete SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) para el análisis de los datos. Se probaron los efectos de tiempo de almacenamiento (Fresco, 0, 24, 48, 72h) y de línea genética (materna y paterna) sobre la integridad acrosomal. El factor mes (abril, mayo y junio) se consideró un efecto de bloque.

### Resultados y Discusión

Los resultados del análisis de varianza para los efectos mes, línea genética y tiempo de conservación se observan en la Tabla 1. Los valores de integridad acrosómica registrados por la línea materna fueron mejores que los de la paterna (Tabla 2). El porcentaje de acrosomas NAR fue mayor en la línea materna que en la paterna ( $P < 0,001$ ). El efecto de línea sobre el porcentaje de acrosomas DAR no fue significativo ( $P = 0,08$ ).

El porcentaje de acrosomas MAR fue menor en la línea materna que en la paterna ( $P = 0,03$ ). El porcentaje de acrosomas LAC fue mayor en la línea paterna ( $P < 0,001$ ).

La Figura 2 muestra los porcentajes de los cuatro tipos de acrosomas a través del tiempo de conservación. El porcentaje de NAR fue mayor en F y en 0h que en 24, 48 y 72h ( $96,73 \pm 0,22$ ,  $97,14 \pm 0,24$  vs.  $93,37 \pm 0,49$ ,  $93,88 \pm 0,54$ ,  $93,93 \pm 0,45\%$ , respectivamente;  $P < 0,001$ ). El porcentaje de acrosomas DAR fue mayor en F que en 0h ( $1,36 \pm 0,17$  vs.  $0,82 \pm 0,10\%$ , respectivamente;  $P = 0,01$ ), y los valores a 24, 48 y 72h ( $1,10 \pm 0,15$ ,  $1,17 \pm 0,16$ ,  $1,25 \pm 0,12\%$ , respectivamente) fueron intermedios entre F y 0h. El porcentaje de acrosomas MAR fue menor en F y 0h que en 24, 48 y 72h ( $1,02 \pm 0,19$ ,  $1,52 \pm 0,17$  vs.  $2,46 \pm 0,22$ ,  $2,30 \pm 0,23$ ,  $2,31 \pm 0,23\%$ , respectivamente;  $P < 0,01$ ). El porcentaje de acrosomas tipo LAC fue menor en F y 0h que en 24, 48 y 72h ( $1,17 \pm 0,12$ ,  $1,33 \pm 0,18$  vs.  $2,92 \pm 0,30$ ,

2,61±0,34, 3,03±0,29%, respectivamente; P<0,001).

La técnica para la evaluación de la integridad acrosómica de semen fresco empleada por Pursel et al. (1972, 1974) fue adaptada para evaluar el estado del acrosoma en semen diluido, refrigerado y transportado, o sea, en el semen rutinariamente usado en las granjas porcícolas comerciales. El porcentaje de acrosomas NAR fue mayor en la

línea materna que en la paterna, al tiempo que los porcentajes de acrosomas DAR, MAR y LAC fueron menores en la línea materna. Ambos efectos podrían ser explicados como resultado de la heterosis (Johnson, 1981), en consideración a que los machos de línea materna son el producto del apareamiento de dos razas puras, mientras que los de línea paterna son el producto del apareamiento de animales presumiblemente puros.

**Tabla 1.** Análisis de varianza para los efectos mes, línea genética y tiempo de almacenamiento sobre los valores de acrosomas NAR (borde apical normal), DAR (borde apical dañado), MAR (borde apical faltante) y LAC (capuchón acrosomal desprendido).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Tipo de Acrosoma	Valor de F	Significancia
<b>Mes</b>	<b>2</b>	NAR	18,18	< 0,0001
		DAR	30,37	< 0,0001
		MAR	14,34	< 0,0001
		LAC	4,12	0,0295
<b>Línea</b>	<b>1</b>	NAR	31,56	0,0001
		DAR	3,50	0,0861
		MAR	5,83	0,0327
		LAC	23,30	0,0004
<b>Tiempo</b>	<b>4</b>	NAR	25,48	< 0,0001
		DAR	3,32	0,0170
		MAR	15,75	< 0,0001
		LAC	17,78	< 0,0001

**Tabla 2.** Porcentaje de acrosomas NAR (borde apical normal), DAR (borde apical dañado), MAR (borde apical faltante) y LAC (capuchón acrosomal desprendido) para verracos línea genética materna y paterna.

Línea Genética	Acrosomas NAR	Acrosomas DAR	Acrosomas MAR	Acrosomas LAC
Materna	95,84±0,32	1,01±0,12	1,70±0,20	1,74±0,19
Paterna	94,18±0,22	1,27±0,07	2,15±0,13	2,68±0,12
Significancia	< 0,01	0,08	0,03	< 0,01



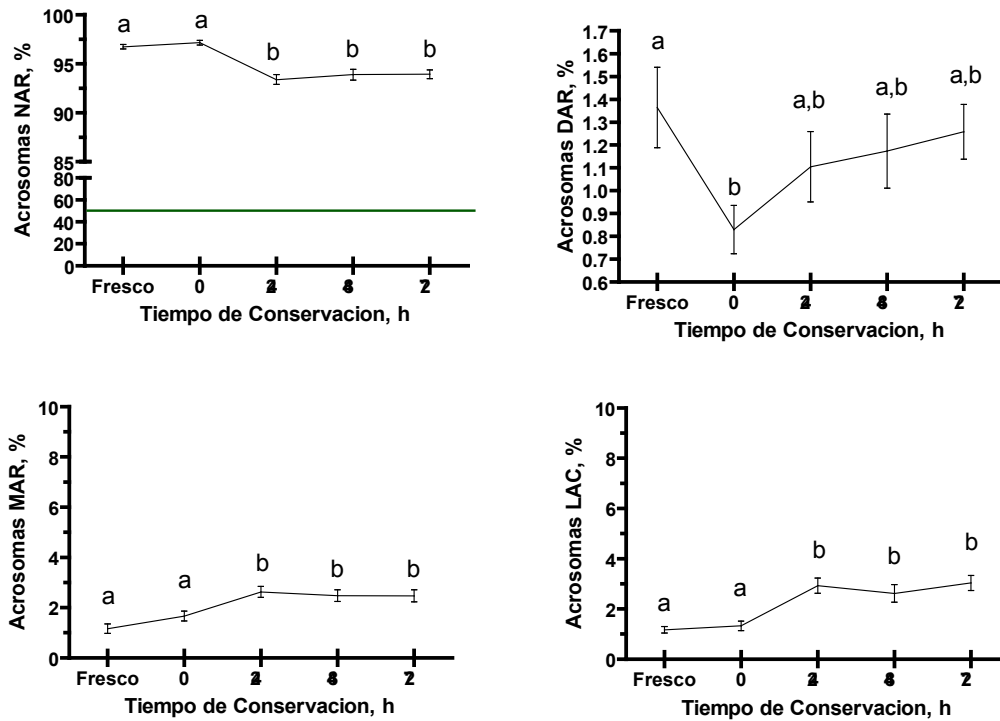


Figura 2. Porcentaje de acrosomas NAR (borde apical normal), DAR (borde apical dañado), MAR (borde apical faltante) y LAC (capuchón acrosomal desprendido) para semen fresco (F) y diluido a las 0, 24, 48 y 72h. Promedios identificados con letras diferentes son diferentes en la prueba de Tukey-Kramer. ( $P < 0,01$ ).

No se encontró diferencia en el porcentaje de acrosomas NAR evaluados en semen fresco y los evaluados al tiempo 0h. El mismo resultado se observó en los MAR y en los LAC. Sin embargo, se observó una disminución del porcentaje de acrosomas NAR desde 24h hasta 72h, sin diferencias significativas entre ellos, pero significativamente mayores que los evaluados en F y 24h. Se evidenció un descenso significativo del porcentaje de acrosomas tipo DAR en F hasta 0h y en los resultados obtenidos desde 24h hasta 72h no se observaron cambios significativos. Se observó un aumento en el porcentaje de acrosomas tipo MAR y LAC desde 24h hasta 72h, sin diferencias significativas entre ellos pero significativamente diferentes de los evaluados en F y 24h.

El deterioro observado que sufren los acrosomas durante el almacenamiento concuerda con lo reportado por Pursel et al. (1972), quienes describen este fenómeno como el resultado del estrés producido por el choque térmico por frío, cuando se emplea semen diluido en un medio con glucosa-bicarbonato. En relación con estas

diferencias, es pertinente anotar que todos los valores encontrados en este estudio superan considerablemente los valores mínimos normales para la especie, y que están por debajo del límite para las diferentes formas anormales (Rozeboom, 2000). Por tanto, los valores de integridad acrosómica registrados en este trabajo, para un semen similar al empleado en granjas comerciales, son normales hasta las 72h. El aumento del porcentaje de acrosomas tipo LAC en semen almacenado entre 24h y 72h puede ser producto de un deterioro de la membrana acrosomal a través del tiempo de conservación, debido a una separación de las fases lipídicas de la membrana. Este efecto se asocia a daños irreversibles de las proteínas de la membrana y genera radicales libres responsables de producir una peroxidación lipídica que ocasiona daños en la membrana espermática (Pursel et al., 1973; Cerolini et al., 2000; Gadea, 2003). Complementariamente, los daños acrosomales pueden deberse a los procesos degenerativos que sufre el espermatozoide, seguidos de la muerte de los mismos (Fazeli et al., 1997).

## Conclusiones

Una técnica para la evaluación de la integridad acrosomal en semen fresco fue adaptada para emplearla en la evaluación de semen diluido. Esto indicó que puede emplearse para realizar evaluaciones seminales de control de calidad para semen diluido de uso comercial. La evaluación de la integridad acrosómica del semen de verraco es una prueba especializada de control de calidad seminal y complementa de manera sustancial las pruebas de evaluación seminal existentes en el laboratorio; además, permitirá conocer más sobre la calidad de un eyaculado. Sin embargo, la estimación real del comportamiento de un macho se podrá obtener sólo mediante la comparación de los resultados de la evaluación seminal y los resultados de fertilidad y prolificidad obtenidos en campo.

## Agradecimientos

Los autores expresan sinceros agradecimientos a la Cooperativa de Porcicultores del Eje Cafetero, CERCAFÉ; en particular, al Dr. Hernando Blandón y al personal del Centro de Inseminación por su apoyo fundamental para la realización de esta investigación.

## Referencias bibliográficas

- Aguas, P.A.; Pinto, P. The acrosomal membrane of boar sperm: a golgi-derived membrane poor in glycoconjugates. **Journal of Cell Biology**, v.100, p.528-534, 1985.
- Campi, S.H.; Blasí, C.D.; Fischman, M.L. et al. Comparación entre dos test de funcionalidad de membrana para valorar semen de verraco. **Veterinaria Argentina**, v.21, p.421-426, 2004.
- Cerolini, S.; Maldjian, A.; Surai, P. et al. Viability, suceptibility to peroxidation and fattening acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.99-111, 2000.
- Fazeli, A.; Hage, W.J.; Cheng, F.P. et al. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.56, p.430-438, 1997.
- Gadea, J. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. **Spanish Journal of Agriculture Research** v.1, p.17-27, 2003 (suppl.2).
- \_\_\_\_\_, Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. **Theriogenology**, v.63, p.431-444, 2005.
- Harrison, R.A.P. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p.195-211, 1997.
- Johnson, R.K. Crossbreeding in swine: Experimental results. **Journal of Animal Science**, v.52, p.906-923, 1981.
- Pérez-Llano, B.; Sánchez, S.R.; Yáñez, G.P. et al. Study of the evolution of boar spermatozoa populations according to their response to short HOST and their acrosomal status during preservation at 15°C. In: **Sixth International Conference on Pig Reproduction**, 2001, Columbia. Proceedings... University of Missouri; 2001. 50.
- Polakoski, K.L.; McRorie, R.A. Boar acrosin: classification, inhibition and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. **The Journal of Biology and Chemistry**, v.248, p.8183-8188, 1973.
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A. Glutaraldehyde fixations of boar spermatozoa for acrosome evaluation. **Theriogenology**, v.1, p.638-641, 1974.
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Rampaeck, G.B. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. **Journal of Animal Science**, v.34, p.278-283, 1972.
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A.; Schulman, L.L. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. **Journal of Animal Science**, v.37, p.528-531, 1973.
- Rozeboom, K.J. Evaluating boar semen quality. **Animal Science Facts**, Extension Swine Husbandry. Publication number: ANS 00-812S, p.1-7, 2000.
- Saacke, R.G. Sperm morphology. **37<sup>th</sup> annual convention of the American association of bovine practitioners**, Forth Worth, Texas. Pages 67-72 in Proc 2004.
- Sutkevičienė, N.; Žilinskas, H. Sperm morphology and fertility in artificial insemination boars. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.26, p.11-13, 2004. (Suppl. 48)