

COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS EN LA DETERMINACIÓN DE MORFOANOMALÍAS DEL SEMEN PORCINO*

Comparison between two techniques for determination of morfoanomalies in pig semen

Manuel de Jesús Acosta¹, Madelyn Rueda¹ y Rolando Perdigón¹

RESUMEN

Se estudiaron las morfoanomalías de la cabeza del nemaspermo mediante comparación entre la acrosomía y el espermiograma de semen porcino en 59 eyaculados de sementales cubanos CC21, Yorkshire y L35 del Centro de Procesamiento de Semen Porcino del Instituto de Investigaciones Porcinas. En los eyaculados evaluados por la técnica de acrosomía se encontró entre 72 y 98 % de acrosomas normales; mientras que cuando fueron evaluados por la técnica de espermiograma, los acrosomas normales estuvieron entre 97 y 100 %. Las anomalías que se presentaron con más frecuencia al aplicar ambas técnicas fueron acrosoma perdido, perdiéndose y dañado. Se observaron diferencias ($P < 0,01$) en el diagnóstico de anomalías de la cabeza de los acrosomas. Se concluyó que la acrosomía ofrece alta precisión, es rápida, económica y de fácil manipulación, por lo que se recomienda su inclusión en el análisis de rutina de la calidad seminal en ganado porcino.

Palabras clave: cerdos, contrastación de semen, acrosomía, espermiograma, acrosomas, morfoanomalías espermáticas

ABSTRACT

Morphoanomalies of nemasperm head were studied by comparing acrosomy and spermiogram of pig semen in 59 ejaculates from Cuban CC21, Yorkshire and L35 studs from the centre for processing pig semen, Swine Research Institute. Normal acrosome found by the acrosomy technique oscillated between 71 and 98 % of examined ejaculates, and when these same samples were evaluated by the spermiogram procedure determined that normal acrosome were between 97 and 100 %. More frequent anomalies found in both techniques were loss, losing and damaged acrosome. There were significant ($P < 0.01$) differences between both methods in favor of the acrosomy technique for diagnosis of head anomalies. It was

(*) Recibido: 03-12-2007

Aceptado: 31-03-2008

(1) Instituto de investigaciones Porcinas, AP 1, Punta Brava. La Habana. Cuba. E-mail: mjesus@iip.co.cu

concluded that this technique offers high precision, is fast, economical and of easy handling, and therefore it should be recommended for routinary analysis of semen quality in pigs.

Key words: pigs, semen contrasting, acrosomy, spermogram, acrosomes, sperm morphoanomalies

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial en el ganado porcino ha evolucionado considerablemente en los últimos años, lo que ha permitido obtener óptimos resultados de fertilidad y prolificidad (García *et al.* 1989; Martín-Rillo 1989, Vyt 2007). No obstante, la capacidad de discernir entre eyaculados fértiles e infértiles para clasificar a los sementales según el grado de calidad seminal, constituye uno de los principales problemas actuales. Al respecto, se ha investigado sobre nuevas técnicas de contrastación seminal (Martín-Rillo *et al.* 1996).

En condiciones de producción comercial, la determinación de la motilidad de los espermatozoides es una técnica rutinaria para la evaluación del semen de cerdos (Shipley 1999). En Cuba, en cualquier laboratorio de inseminación artificial se comprueban de forma rutinaria indicadores tales como la motilidad, el volumen y la concentración espermática del eyaculado, y mensualmente se realiza un análisis individual de los verracos en explotación, que incluye además de los indicadores antes señalados, la determinación de morfoanomalías

espermáticas a través del espermograma (Del Toro *et al.* 1995). Resulta oportuno destacar que en algunas ocasiones, una fertilidad reducida está asociada con anormalidades seminales que no pueden detectarse por estas técnicas empleadas en el examen rutinario. En este sentido, un verraco con evaluación normal puede ser subfétil. Por ello, es necesario utilizar otras pruebas, como señalan algunos autores (Flowers 1997, Grabo 1997 y García Rubalcava *et al.* 1998), que permitan predecir con la máxima precisión, rapidez y economía posible, la capacidad fecundante del eyaculado.

El objetivo del presente trabajo consistió en validar la técnica de acrosomía para su uso en Cuba en los laboratorios de procesamiento de semen porcino en el análisis de rutina de la calidad seminal.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio del Centro de Procesamiento de Semen Porcino, del Instituto de Investigaciones Porcinas, durante un trimestre. Se evaluaron 59 eyaculados de sementales porcinos de las razas CC21, Yorkshire, y L35 con edades

comprendidas entre 9 y 12 meses. No se consideró el efecto del genotipo, pues se ha demostrado que no afecta los parámetros seminales porcinos (Kommisrud *et al.* 2002). La tecnología de alimentación y manejo para la explotación de sementales se siguió de acuerdo con los procedimientos descritos en el Instituto (IIP 1998, 2001). Otros detalles relacionados con el manejo fueron ya descritos (Rueda *et al.* 2006). El semen se obtuvo mediante el procedimiento de la mano enguantada (Hernández 1976). Las morfoanomalías se determinaron por las técnicas de acrosomía y de espermograma.

Se empleó la técnica de acrosomía recomendada por Martín Rillo *et al.* (1996). Para ejecutarla, se depositó en un tubo de ensayo 1 ml de la solución de formaldehído (citrato de sodio, 2,9 g, formaldehído al 40 %, 4 ml, agua destilada, 100 ml), y se añadió entre 0,2 y 0,5 ml de semen, en dependencia de su concentración. De esta preparación se depositó una gota pequeña entre cubre y portaobjetos, se dejó reposar unos segundos para fijarla, se añadió una gota de aceite de cedro y se visualizó el estado del acrosoma a partir del aumento en 1000 veces con el microscopio de contraste de fases. Para valorar la muestra, se contaron 50 células por eyaculado y se calculó el porcentaje de acrosomas normales.

La técnica de espermograma se efectuó como se señala en las

recomendaciones cubanas de producción porcina (IIP 2001), la cual consistió en la extensión de una gota de semen puro o diluido en un portaobjeto. A continuación se fijó el frotis seco durante 5 min en una solución de formaldehído (solución madre), y posteriormente se coloreó durante 5 min en una solución de rosa de bengala. Nuevamente el material se fijó otros 3 min en una solución de metanol y formaldehído, para finalmente colorear por 3 min en una solución de azul victoria saturado. La muestra se examinó al microscopio con lente de inmersión y aceite de cedro. Para la lectura del espermograma se contaron 100 células del frotis y se calculó el porcentaje de células sanas, con énfasis en anomalías de la cabeza.

Al aplicar ambas técnicas, para cada eyaculado evaluado se tuvo en cuenta la clasificación del acrosoma de acuerdo con los distintos estados del capuchón cefálico (normal, dañado, perdiéndose, perdido). El acrosoma se visualizó como si fuera una “uña” perfectamente cortada en la parte axial de la cabeza del espermatozoide.

Los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico de Harvey (1990), a través de un modelo de clasificación simple para comparar las medias por tratamiento (Steel *et al.* 1997), con el fin de determinar si las técnicas evaluadas diferían en el nivel de detección de las distintas morfoanomalías de la cabeza del espermatozoide de los cerdos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del total de eyaculados evaluados (Tabla 1), la técnica del espermiograma detectó 11 con afectación acrosómica; mientras que la acrosomía halló 22 morfoanomalías (18,6 y 37,2 %, respectivamente). Estos resultados coinciden con lo informado por Martín Rillo *et al.* (1996), quienes demostraron que en más del 50 % de los eyaculados evaluados se puede detectar afectación del estado del acrosoma en diferentes grados. También se encontró que el rango de acrosomas normales detectados por los métodos de espermiograma y acrosomía osciló entre 97 y 100 %, y desde 72 hasta 98 %, respectivamente. Estos valores son superiores a los encontrados por Martín-Rillo *et al.* (1998) y Rozeboom (2001) quienes hallaron una cifra de 50 %; contrariamente son similares a los encontrados por Flowers (1997) y por

Larsson y Flowers (citados por Rozeboom 2001), que describen valores entre 86 y 90% de acrosomas normales postrecogida.

En cuanto al tipo de lesiones, se encontraron como las más comunes: capuchones perdidos, capuchón perdiéndose y capuchón dañado, en ese orden (Tabla 2). La técnica de acrosomía fue más precisa en la detección de afectaciones con 100, 50 y 100 %, contra 0, 27,2 y 72,7 % respectivamente, lo cual coincidió con lo encontrado por Martín Rillo *et al.* (1996) y Mirjyn (1997), quienes hallaron estas anomalías como las más frecuentes. Sin embargo, estos autores no señalaron en qué porcentaje se presentó cada una de ellas.

Hubo diferencias ($P < 0,01$) entre las dos técnicas en la detección de las patologías, la técnica de acrosomía fue superior en el

Tabla 1. Morfoanomalías en eyaculados normales de cerdos. Rango de acrosomas normales.

n	Técnica		Total
	Espermiograma	Acrosomía	
	59	59	-
Afectaciones acrosómicas			
Positivas			
Cantidad	11	22	33
En %	18,6	37,2	55,9
Negativas			
Cantidad	48	37	-
En %	81,3	62,7	-
Rango de acrosomas normales	97-100	72-98	72-100

Tabla 2. Estado del acrosoma de semen porcino. Efecto del método de evaluación

Estado	Cantidad afectada		Por ciento del total	
	Espermiograma	Acrosomía	Espermiograma	Acrosomía
Perdido	-	22	-	37,2
Perdiéndose	3	12	5,1	20,3
Dañado	8	22	13,5	37,2
Total de eyaculados	59	59	100	100

diagnóstico de las diferentes lesiones encontradas (Tabla 3). Este resultado coincide con lo informado en otros trabajos (Bonet *et al.* 1998, Wysocki *et al.* 1998 y Rozeboom 2001), en los cuales se indica que el examen morfológico ideal se realiza con microscopio con contraste de fase, ya que permite mejor distinción de las membranas del espermatozoide y por consiguiente mayor precisión en la evaluación y confiabilidad en los resultados. Se encontró que el porcentaje de acrosomas normales fue mayor cuando se usó la técnica del espermograma. Del Toro *et al.* (1995) encontraron similares resultados. Sin embargo, estos autores informaron una efectividad en la cubrición no concordante con estos niveles de calidad, lo cual pudiera explicar una limitación en el diagnóstico con esta técnica, precisamente por detectar las patologías de acrosomas con menor efectividad.

Según metodologías descritas por Gadea (2005), el estudio del Núcleo del espermatozoide permite valorar su madurez y estabilidad, condiciones necesarias para que se produzca la descondensación cromosómica y la singamia. De ahí la importancia de establecer el método

más efectivo para el descubrimiento de morfoanomalías en el espermatozoide de los cerdos. Por otra parte, se ha manifestado la relación encontrada entre los problemas de fertilidad y alteraciones de la estructura del núcleo. Estas alteraciones del núcleo han sido clasificadas como factores indispensables de la fertilidad, ya que no es posible mejorarla mediante el aumento del número de espermatozoides por dosis de inseminación. Los espermatozoides de los mamíferos pueden sufrir una verdadera reacción acrosómica consistente en una progresiva vesiculización de la membrana plasmática y de la membrana acrosomal externa con salida del contenido acrosomal y una falsa reacción acrosómica, como consecuencia de la muerte del espermatozoide y consiguiente degeneración de sus membranas. Durante la realización de este trabajo observamos estos fenómenos con gran nitidez, especialmente cuando se ejecutó la prueba de acrosomía.

Se puede concluir que la técnica de acrosomía, tal como propusieron Martin-Rillo *et al.* (1996) y Roca *et al.* (2004), ofrece alta precisión, es rápida, económica y de fácil manipulación. De esta forma, se recomienda su uso en el análisis de

Tabla 3. Comparación del diagnóstico de las morfoanomalías en el semen porcino por dos técnicas de evaluación

Tipo de afectación	Método de evaluación		Sig
	Espermograma	Acrosomía	
Perdido	0 ± 0,24	1,81 ± 0,21	***
Perdiéndose	1,11 ± 0,20	2,72 ± 0,18	*
Dañado	1,30 ± 0,45	2,75 ± 0,40	***
Total de eyaculados	98,50 ± 0,24	85,00 ± 0,21	

* P<0,05; *** P<0,001

rutina de la calidad seminal. La técnica de espermograma, no permite un alto nivel de diagnóstico de patologías de la cabeza del nemaspermo; además al realizarse mensualmente, se pudiera omitir la detección de trastornos que se presenten al evaluar el eyaculado de sementales porcinos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento por su ayuda técnica, a los señores Digna Mendoza, Esther Benítez y G. Morales, del Centro de Procesamiento de Semen Porcino, y del Grupo de Reproducción del Instituto. Igualmente se agradece la ayuda del Dr. Julio Ly en la preparación del presente manuscrito.

REFERENCIAS

- Bonet, S., Pinart, E., Briz, M., Sancho, S. y Escuder, M. 1998. Aportación al conocimiento de la criptorquidia espontánea abdominal y unilateral en porcino. Análisis microscópico del eyaculado. *Revista de Porcinocultura* 18(178):91-115.
- Del Toro, Y., Arias, T. y Benítez, E. 1995. Algunos aspectos que afectan la morfología del semen porcino. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 2(3):41-46.
- Flowers, W.L. 1997. Management of boars for efficient semen production. *Journal of Reproduction and Fertility* 52:67-78.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63:431-444.
- García, C., Berrocal, F., Andújar, J., Sánchez, R., García, P.F., Saiz, Y. and Martín Rillo, S. 1989. Fertility results between ORT groups using mixed boar semen. In: 3th International Conference on Pig Reproduction. Dublin, p 26.
- García Rubalcava, J.A., Lapuente, S., Corcuera, D., Sagües, A., De Alba, C. y Martín Rillo, S. 1998. Avances en inseminación artificial para mejorar resultados reproductivos. *Revista de Porcinocultura* 18(181):104-124.
- Grabo, B.G. 1997. Reproductive examination and evaluation of the boar. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (R.S. Youngquest, editor). W.B. Saunders Company. Philadelphia, pp 664-670.
- Harvey, W.R. 1990. User's guide for LSMLMW mixed model least square and maximum likelihood computer program (PC-2 version). Ohio State University Press. Columbus, 91 p.
- Hernández, J.J. 1976. Estudio comparativo entre vagina

- artificial y mano enguantada para la recolección de semen porcino. *Revista Cubana de Producción Animal* 2:65-75.
- IIP. 1998. Instructivo Técnico de Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. Instituto de Investigaciones Porcinas. La Habana, pp43-51.
- IIP. 2001. Manual de Procedimientos Técnicos para la Crianza Porcina. Instituto de Investigaciones Porcinas. La Habana, 139p.
- Kommisrud, E., Paulenz, H., Schested, E. y Gresle, I.S. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Veterinaria Scandinavica* 43:49-55.
- Martín Rillo, S. 1989. Aportación al estado de la congelación del semen de verraco. Tesis Dr.Sci. Universidad de Zaragoza. Zaragoza, 197p.
- Martín Rillo, S., M. C. Alba, y J. García. 1998. La calidad seminal, garantía de la reproducción. *Rev. Informativo Porcino* 1: pp 12-13.
- Martín Rillo, S., Martínez, C., García, C. y de Alaba, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reproduction of Domestic Animals*, 35:519-526.
- Mirjyn, A. 1997. Inseminación artificial en granjas porcinas. In: *Curso Internacional de Reproducción Porcina*, México, pp40-42.
- Roca, J., Gil, M.A., Hernández, M., Parrilla, I., Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. 2004. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* 25:397-405.
- Rozeboom K. 2001. Factores importantes en la conservación de la calidad del semen porcino. *Rev. Cerdo/Swine* 4(41):29-30.
- Rueda, M., Arias, T., Caballero, N., Tosar, M. y Acosta, M.J. 2006. Análisis de la calidad espermática de sementales porcinos en dos tipos de porcicultura cubana. *Revista Computadorizada de Producción Porcina* 13:49-54.
- Shipley, C.F. 1999. Breeding soundness examination of the boar. *Swine Health and Production* 7:117-120.
- Steel, R.G.D., Torrie, J. H. and Dickey, M. 1997. Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. MacGraw-Hill Book Company. New York, 666p.

Vyt, P. 2007. Examination and storage of liquid pig semen. Tesis Dr.Sci. Universidad de Gante. Gante, 156 p.

Wysocki, P., Sáiz Cidoncha, F. y Strzezek, J. 1998. Influencia de la mutación del gen receptor de rianodina (RYR1) en verracos sobre la calidad del semen y su capacidad de conservación en estado líquido. *Revista de Porcinocultura* 18(182): 144-154.