

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MORFOLOGÍA ACROSOMAL POSTDESCONGELAMIENTO EN EL SEMEN PORCINO CONGELADO EN TRES DIFERENTES TÉCNICAS

COMPARATIVE STUDY OF POSTTHAWING ACROSOMIC MORPHOLOGY IN FROZEN BOAR SEMEN, USING THREE DIFFERENTS TECHNIQUES

MARÍA E. TORRETTA O.¹, CLAUDIO A. WEVAR V.² y SUSANA FERRERO D.³

Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC)
Facultad de Agronomía y Veterinaria
Ruta Nacional 36, km 601. Estaleta postal N° 9 - (5800)
Río Cuarto, Provincia de Córdoba,
República Argentina

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo fueron: a) examinar la morfología acrosomal postdescongelación, en semen porcino congelado usando diferentes técnicas; b) clasificar morfológicamente a los acrosomas según su deterioro en NAR (borde apical normal), DAR (borde apical dañado), MAR (borde apical perdido), LAC (cápsula acrosomal perdida); c) determinar las influencias de los métodos de congelación sobre la morfología acrosómica. El semen se colectó manualmente, dos veces por semana, de cuatro machos adultos de fertilidad y "congelabilidad" probadas. Inmediatamente postcolecta se realizaron los exámenes seminales de rutina. Cada eyaculado se fraccionó en dos alícuotas, una para procesar en macropajuelas (Mp) y micropajuelas (mp) y la otra en pastillas (Pt). Posteriormente, se descongeló una muestra de cada método, de acuerdo a su técnica original y se diluyó con "Beltsville Thawing Solution", se fijó en formol salino tamponado y se observó por microscopía de contraste de fases. Se analizaron diez muestras de cada verraco utilizando un arreglo factorial sobre un Diseño de Medidas Repetidas. La comparación *a posteriori* entre medias se realizó mediante la prueba SNK. Se consideraron significativas las diferencias con $P \leq 0,05$. En las mp se encontraron menores porcentajes de DAR ($p= 0,008$) y LAC ($p= 0,0020$) y mayores porcentajes de NAR ($p= 0,0057$), que en Mp y Pt, entre las que no se encontraron diferencias significativas. Los porcentajes de MAR no variaron significativamente entre las técnicas. De los presentes resultados y con la metodología utilizada, se concluye que la morfología acrosomal es afectada por la criopreservación; que en todas las técnicas se observan acrosomas correspondientes a los cuatro tipos propuestos y que la técnica de congelación en micropajuelas produce el menor daño acrosomal.

Palabras clave: semen porcino, congelación, descongelación, morfología acrosomal.

SUMMARY

The purposes of this work were: 1) To examine the posthaw acrosomal morphology in boar semen freezing in maxistraws, ministraws and pellets. 2) To classify according to the acrosomal morphology in NAR (normal apical ridge), DAR (damaged apical ridge), MAR (missing apical ridge) and LAC (loosed acrosomal cap). 3) To compare the incidence of freezing techniques on acrosomal morphology. Semen was obtained

Trabajo subsidiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

¹ M. V., M. Sc. Jefe de Trabajos Prácticos. Dpto. de Reproducción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC. Tel.: (54)-0358-4676200. Correo electrónico: mtorretta@ayv.unrc.edu.ar

² M. V., M. Sc. Profesor Asociado. Dpto. de Reproducción Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC. cwevar@ayv.unrc.edu.ar

³ Prof. de Matemática, Profesor Adjunto. Área Estadística, Dpto. de Matemática, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, UNRC.

from four proved fertility and "freezability" adult boars. Ejaculates were collected twice a week by the glovedhand method. Immediately post collect, routine exams were carried out. For this, semen was simultaneously fractionated in two aliquots. One aliquot was processed in maxistraws and ministraws and the other aliquot was processed in pellets. All the samples thawed were diluted with Beltsville Thawing Solution, fixed in saline formol solution and observed by phase contrast microscopy. Ten samples of each boar were analyzed using factorial adjustment for repeated measurement desing. The SNK test was applied to compare means later. The differences with $P \leq 0.05$ were considered significant. Lower percentages of DAR ($p=0.008$) and LAC ($p=0.0020$) and higher percentages of NAR ($p=0.0057$) were found in mp than in Mp and Pt, with no significative differences. MAR percentages presented no significant differences between techniques. The results show, so far, that according to the techniques used, the acrosomal morphology is affected by freezing, because the four types of acrosomal morphology can be observed, and the acrosomal damage is lower in semen frozen in ministraws.

Key words: boar semen, freezing, thawing, acrosomal morphology.

INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (I.A.) con semen porcino congelado no está aún muy difundida a causa de su escasa eficiencia productiva. Existen varias técnicas de congelación, pero ninguna resulta óptima para su uso masivo. Sin embargo, dado el gran impacto genético que la técnica implica, se continúan estudiando diferentes aspectos científico-técnicos conducentes a su mejoramiento y posterior aplicación a campo.

En todos los mamíferos la criopreservación reduce la fertilidad espermática debido, por un lado, a una disminución en la viabilidad espermática, y por otro, a una disfunción subletal de la población superviviente. Los efectos deletéreos sobre la viabilidad espermática pueden ser provocados por la velocidad de enfriamiento (Eriksson y Rodríguez Martínez, 2000; Thurston *et al.*, 2003); de calentamiento (Eriksson y Rodríguez Martínez, 2000; Watson, 2000; Holt, 2000a); la susceptibilidad individual de los verracos a la congelación de sus espermatozoides, producida por diferencias en la composición de las membranas espermáticas (Holt, 2000b; Holt *et al.*, 2005); el diluyente de congelación (Maldjian *et al.*, 2005) y de descongelación (Watson, 2000), que pueden inducir estrés osmótico o tóxico (Holt, 2000a) y la técnica de criopreservación (Torretta *et al.*, 2002).

Las alteraciones en los espermatozoides supervivientes son generadas por factores

que afectan su estado funcional, provocando cambios en la estructura del núcleo y de las membranas. Estas pierden estabilidad y sufren alteraciones en sus receptores (Watson, 2000) lo que se traduce, principalmente, en una disminución de la motilidad progresiva y en un aumento en el número de patologías morfológicas, especialmente del acrosoma (Peña *et al.*, 2003).

El espermatozoide porcino es particularmente sensible al enfriamiento y tiene menor tolerancia a la disminución de la temperatura que el de otras especies domésticas (Holt, 2000a). Esa sensibilidad al choque térmico se caracteriza por una irreversible disminución en la permeabilidad selectiva y en la integridad de las membranas espermáticas; razón por la cual se producen severos daños en los acrosomas (Peña *et al.*, 2003). Cuando los espermatozoides son expuestos a choques térmicos, sus acrosomas experimentan un marcado desprendimiento o desintegración, que varía de acuerdo con la severidad del tratamiento. Se dañan tanto por el enfriamiento entre 37 y (-10°) C, durante la congelación; como por el calentamiento rápido entre 5 y 37° C, durante la descongelación (Eriksson y Rodríguez Martínez, 2000). Por ello, es importante detectar los cambios que se producen en las membranas acrosomales, ya que son un indicador apropiado de los daños que el proceso de criopreservación provoca sobre las células espermáticas (Peña *et*

al., 2003). La integridad acrosomal se puede evaluar usando coloraciones supravitales fluorescentes simples, dobles o triples, las cuales diferencian células vivas, dañadas y muertas; por citometría de flujo o por microscopía de contraste de fases.

En 1972, Pursel *et al.* (1972) evaluaron semen congelado-descongelado mediante microscopía de contraste de fases y clasificaron a los acrosomas según sus características morfológicas en cuatro clases: NAR (borde apical normal), DAR (borde apical dañado), MAR (borde apical perdido) y LAC (capuchón acrosomal perdido). Asimismo, pudieron observar que la morfología acrosomal se deteriora en mayor o menor grado según el choque térmico a que sea sometida la célula, progresando secuencialmente desde NAR a DAR, a MAR y a LAC. Si bien esta clasificación no fue aplicada por otros autores, se considera que por ser práctica y de bajo costo, podría convertirla en una técnica apropiada para el uso rutinario.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1. Examinar la morfología acrosomal postdescongelación en el semen porcino congelado en macropajuelas, micropajuelas y pastillas. 2. Clasificar a los acrosomas según el grado de deterioro de su morfología. 3. Determinar las influencias de los métodos de congelación sobre la morfología acrosomal.

MATERIALES Y MÉTODOS

En cada muestreo se realizó la siguiente rutina de trabajo:

Obtención del semen. El semen se obtuvo mediante el método manual, de cuatro verracos adultos, entrenados, de fertilidad y "congelabilidad" probadas, de las razas Hampshire, Landrace y Duroc Jersey. La fracción rica en espermatozoides del eyaculado se colectó dos veces por semana. Para ello se utilizó un recipiente plástico, colocado dentro de un termo de boca ancha, temperado a 37° C y cubierto con triple capa de gasa estéril, para filtrar el semen e impedir el paso de las partículas de gel.

Evaluación del semen fresco. Inmediatamente postcolecta, el eyaculado se llevó al laboratorio y se evaluó macroscópica y microscópicamente, a fin de determinar su calidad para el congelamiento. Para que ello fuera factible, los eyaculados debían ser normales a la observación microscópica; tener como mínimo 70% de motilidad espermática progresiva y no más de 25% de patologías espermáticas totales.

Congelación. Todos los eyaculados obtenidos cumplieron con las exigencias mínimas para su procesamiento, por consiguiente, no fue necesario descartar muestras. El número de dosis inseminantes a obtener se estimó de acuerdo a la concentración espermática total, y teniendo en cuenta que, por cada dosis inseminante, se necesitan 6×10^9 espermatozoides totales. Cada eyaculado se homogeneizó con un agitador magnético y se fraccionó en dos alícuotas. Una, se preparó para congelar en pastillas (Pt) según la técnica de Pursel y Johnson (1975); y la otra, para envasar en macropajuelas (Mp) y micropajuelas (mp), de acuerdo al método de Westendorf *et al.* (1975).

Descongelación. Previo a la descongelación, el semen congelado se mantuvo almacenado a -196° C, como mínimo siete días. Luego se procedió de la siguiente manera:

- Las macropajuelas se sumergieron individualmente durante 50 segundos en un baño María a 50° C.
- Cada dosis inseminante constituida por 10 micropajuelas se mantuvo durante 15 segundos en un baño de agua a 39° C. Posteriormente, ambos tipos de pajuelas se secaron, cortaron y su contenido se mezcló con 80 mL de diluyente de descongelación a 30° C, contenidos en una botella plástica de inseminación.
- Las 50 pastillas correspondientes a una dosis inseminante, se colocaron durante tres minutos en una caja isotérmica y luego en 80 mL de diluyente de descongelación a 50° C, hasta su total descongelación y homogeneización.

Dilusión. En las tres técnicas se utilizó el mismo diluyente de descongelación, para evitar la incidencia de otra variable. Se eligió el "Beltsville Thawing Solution" (BTS) (Pursel y Johnson, 1975), sobre la base de los resultados de un trabajo previo en el cual dicho diluyente mostró mejores resultados de vitalidad espermática para estas tres técnicas de congelación, en comparación con plasma seminal homólogo y Diluyente de Hülsenberg (Torretta *et al.*, 1995).

Evaluación del semen descongelado. Para estudiar la morfología acrosomal, inmediatamente postdescongelación, se tomaron diez gotas de semen diluido proveniente de cada muestra y se fijaron en 1 mL de solución de formol salino tamponado (FST). Posteriormente, una gota de esta muestra húmeda se colocó entre porta y cubreobjeto y se la observó en microscopio de contraste de fases a 1200 X (Carl Zeiss Standard WL con objetivo 100 X, ocular de 12 X), contando en guarda griega sobre un total de 400 espermatozoides.

El estudio morfológico se basó en la clasificación descrita por Pursel *et al.* (1972):

- NAR (borde apical normal): acrosoma levemente adherido al núcleo y con el borde apical nítido, formando una protrusión suave en el borde apical de la cabeza.
- DAR (borde apical dañado): acrosoma con borde apical irregular.
- MAR (borde apical perdido): acrosoma con borde apical ausente pero con capuchón firmemente adherido a la cabeza del espermatozoide.
- LAC (capuchón acrosomal perdido): acrosoma con capuchón acrosomal completamente desprendido y vesiculado.

Análisis estadísticos

Se congelaron 10 eyaculados por verraco y en cada uno se evaluó una muestra de cada técnica. N= 40.

Variables. Las variables analizadas estadísticamente fueron los tipos de acrosomas observados inmediatamente postdescongelación: NAR, DAR, MAR y LAC.

Procedimiento de análisis. Se trabajó con el software estadístico STATA. Se analizaron 10 muestras de cada verraco. Se utilizó un Arreglo Factorial sobre un Diseño de Medidas Repetidas (Winer *et al.*, 1991), luego de verificar que se cumplieran los supuestos necesarios. Los factores analizados fueron: Verraco (cuatro niveles, aleatorio) y Método (tres niveles, Mp, mp y pt). Como los valores se expresaron en porcentajes, para el análisis fue necesario realizar la transformación arcoseno.

La comparación entre medias se realizó mediante la prueba Student-Newman-Keuls. Se consideraron significativas las diferencias con $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Para todas las variables, el factor Verraco, aleatorio, no fue significativo ($P > 0,05$, lo cual indica similar variabilidad entre verracos. La interacción Verraco por Método, tampoco fue significativa ($P > 0,05$), lo cual demuestra que los resultados de cada método no dependen de las particularidades del verraco.

En el Cuadro 1 se muestran los porcentajes de acrosomas normales (NAR) y patológicos (DAR, MAR y LAC) hallados inmediatamente postdescongelación en cada una de las técnicas estudiadas.

Variable NAR. Se detectaron diferencias altamente significativas entre métodos ($P = 0,0057$). Los mayores porcentajes se encontraron en las micropajuelas, mientras que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre macropajuelas y pastillas (Cuadro 1, Figura 1).

Variable DAR. Se encontraron diferencias altamente significativas entre métodos ($P = 0,008$). Los menores porcentajes se hallaron en las mp y no se registraron diferencias estadísticamente significativas entre Pt y Mp (Cuadro 1, Figura 2).

Variable MAR. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre métodos ($P = 0,4813$) (Cuadro 1, Figura 3).

Cuadro 1

Porcentaje de acrosomas normales (NAR) y patológicos (DAR, MAR y LAC) inmediatamente postdescongelación, en el semen porcino congelado mediante diferentes técnicas. N= 10

TÉCNICA	MORFOLOGÍA ACROSOMAL			
	NAR	DAR	MAR	LAC
Macropajuelas	72,46 a	25,38 c	1,04 e	1,10 f
Micropajuelas	80,65 b	17,80 d	0,99 e	0,54 g
Pastillas	67,18 a	29,76 c	1,35 e	1,68 f

Letras distintas indican diferencias significativas entre técnicas: (a - b) P= 0,0057; (c - d) P= 0,0080; (f - g) P= 0,0020.

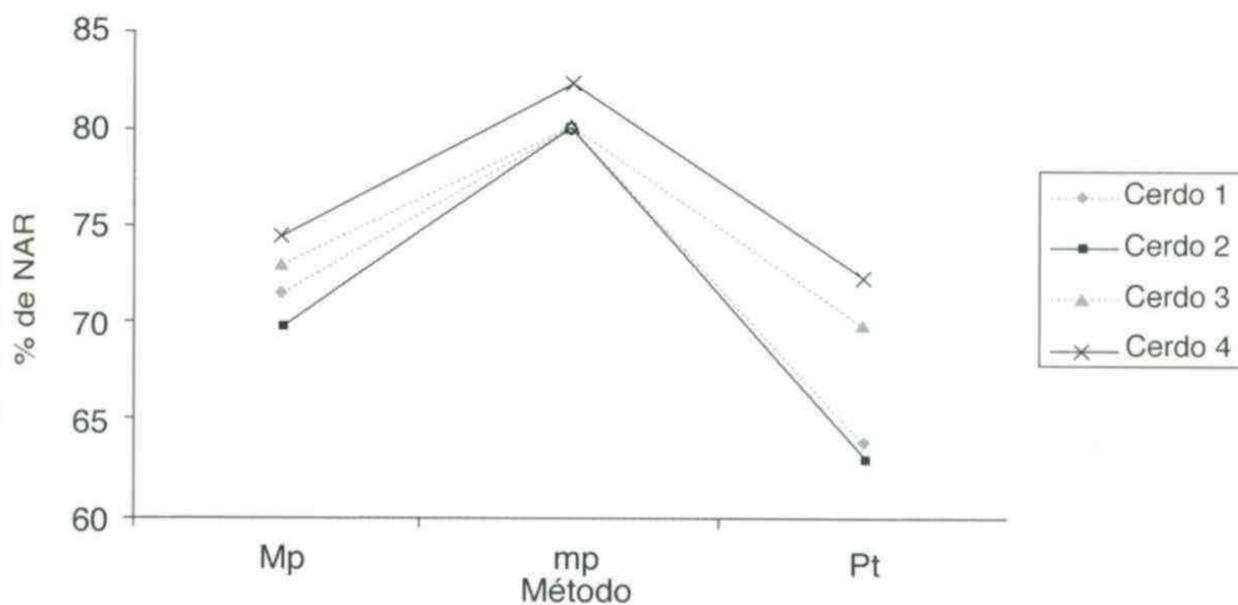


Figura 1. Porcentajes de NAR encontrados en las muestras de semen congelado-descongelado en MP, mp y Pt, correspondientes a los cuatro cerdos estudiados.

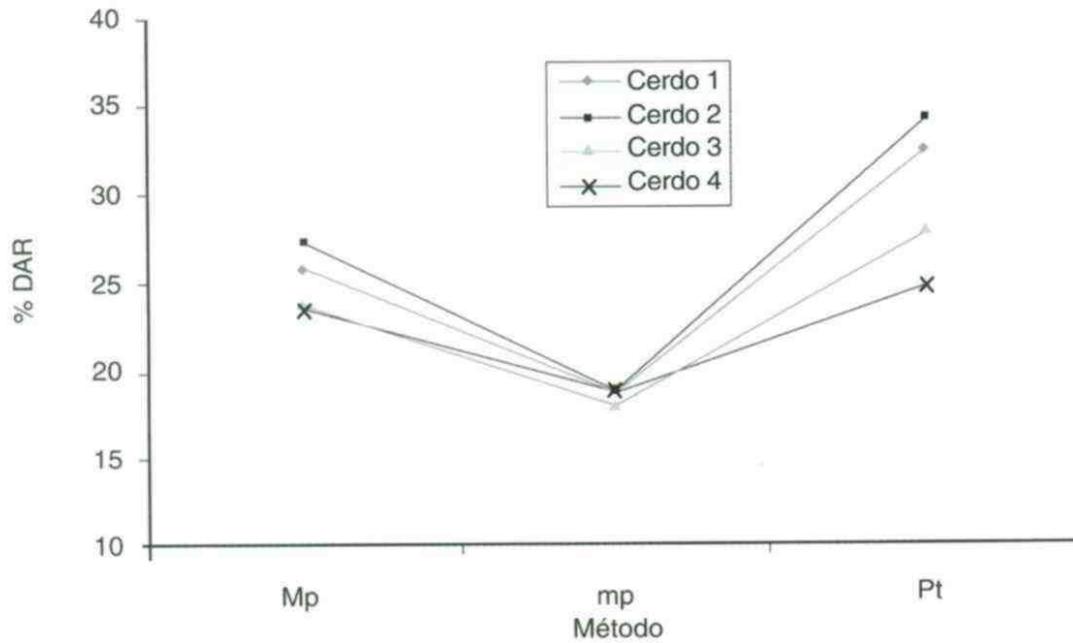


Figura 2. Porcentajes de DAR encontrados en las muestras de semen congelado-descongelado en Mp, mp y Pt, correspondientes a los cuatro cerdos estudiados.

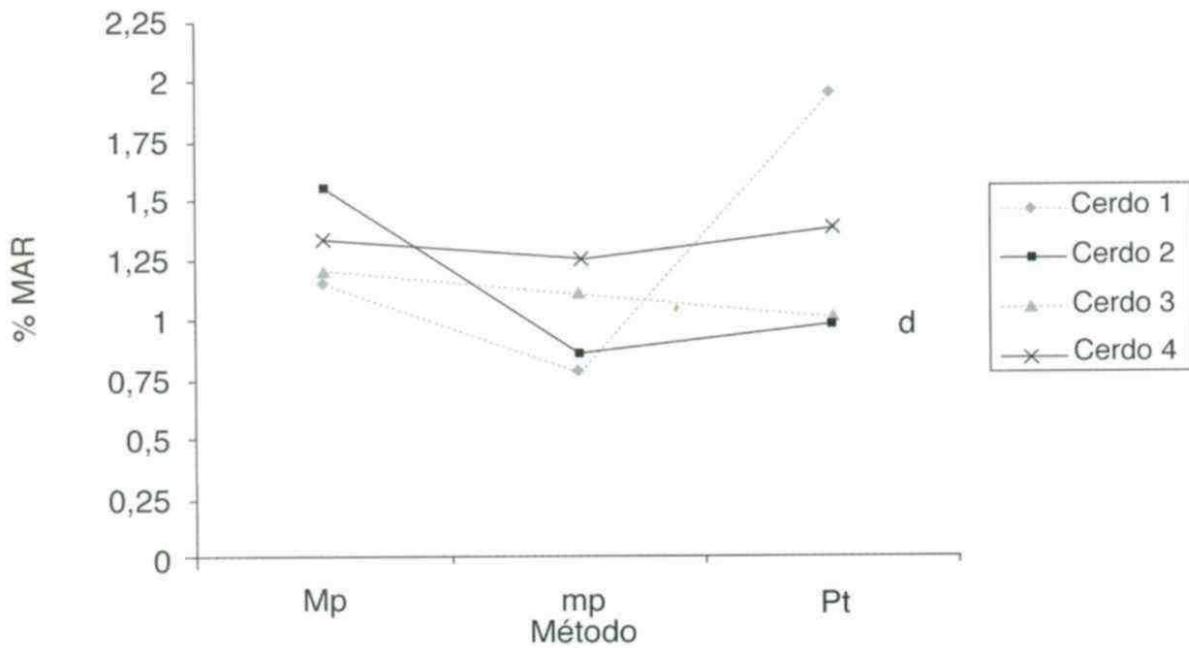


Figura 3. Porcentajes de MAR encontrados en las muestras de semen congelado-descongelado en Mp, mp y Pt, correspondientes a los cuatro cerdos estudiados.

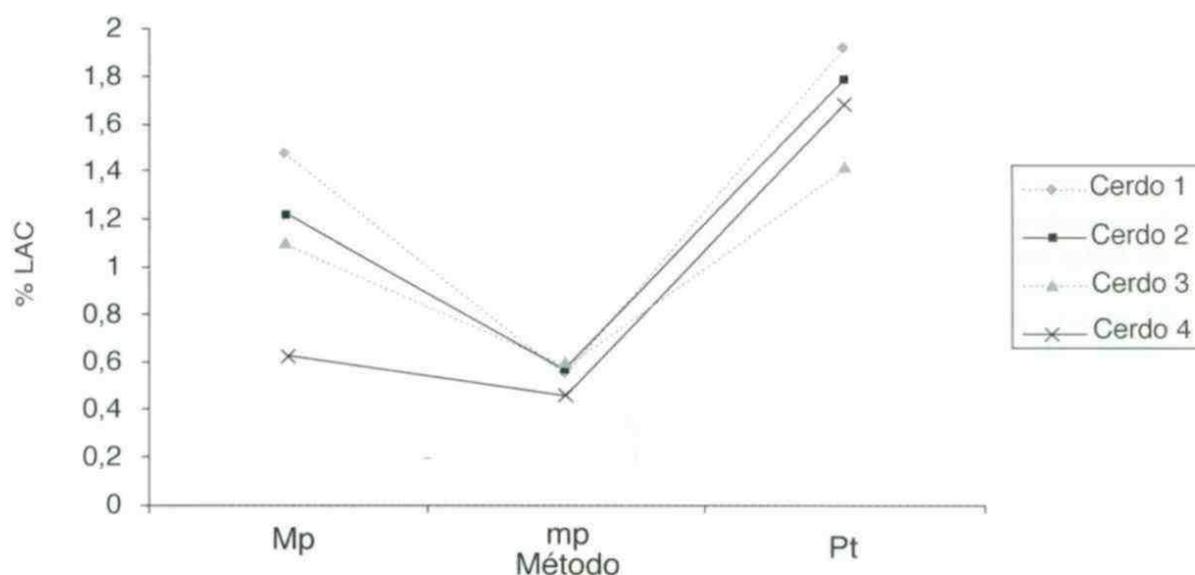


Figura 4. Porcentajes de LAC encontrados en las muestras de semen congelado-descongelado en Mp, mp y Pt, correspondientes a los cuatro cerdos estudiados.

Variable LAC. Se detectaron diferencias altamente significativas entre los métodos ($P= 0,0020$). Los menores porcentajes se registraron en las micropajuelas, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre macropajuelas y pastillas (Cuadro 1, Figura 4).

DISCUSIÓN

En todas las técnicas se encontraron acrosomas que responden a los tipos propuestos por Pursel *et al.* (1972).

Comparando las técnicas, se determinó que las mp mostraron mayores porcentajes de NAR ($P= 0,0057$) (Cuadro 1, Figura 1) y menores porcentajes de DAR ($P= 0,008$) y LAC ($P= 0,0020$) (Cuadro 1, Figuras 2 y 4) con respecto a Mp y Pt, en tanto entre estas últimas (Mp y Pt) no se encontraron diferencias significativas. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de MAR entre los métodos (Cuadro 1, Figura 3). Esto indica que en las mp se produjo menor choque térmico que en las otras dos técnicas, probablemente debido a que, por su mayor superficie de exposición,

se congela de manera más rápida y pareja, evitando los daños provocados por las fluctuaciones térmicas y la formación de cristales de hielo (Thurston *et al.*, 2003).

Al determinar las variaciones en las características morfológicas dentro de cada técnica se observó que, en todas ellas, el mayor porcentaje correspondió a acrosomas normales. En tanto que, en Mp y Pt, el menor porcentaje encontrado fue de MAR y en mp de LAC.

Dado que esta clasificación no fue utilizada por otros autores, no se dispone de datos comparativos. No obstante, en coincidencia con otros autores que evaluaron los efectos de diferentes factores sobre la vitalidad espermática (Erikson y Rodríguez Martínez, 2000; Watson, 2000; Holt, 2000a, b; Torretta *et al.*, 2002; Thurston *et al.*, Holt *et al.*, 2005), se encontró un número importante de células dañadas, independientemente de la técnicas de congelación utilizada. En promedio con los tres métodos, sin embargo, el porcentaje de NAR fue el mayor (73,4%) seguido en orden decreciente por DAR (24,31%), MAR (1,13%) y LAC (1,11%). Ello estaría indicando en consecuencia que el daño con cada una de las técnicas probadas no fue tan grave.

CONCLUSIONES

De los presentes resultados y con la metodología utilizada, se concluye que:

- La morfología acrosomal es afectada por la criopreservación.
- En todas las técnicas se observan acrosomas con diferentes grados de deterioro.
- El menor daño acrosomal se produce cuando el semen es congelado-descongelado en micropajuelas.

LITERATURA CITADA

- ERIKSSON, B. and H. RODRÍGUEZ MARTÍNEZ. 2000. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flat-packs and mini-straws. *Anim. Reprod. Sci.* 63: 205-220.
- HOLT, W. V. 2000a. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
- HOLT, W. V. 2000b. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 53: 47-58.
- HOLT, W., A. MEDRANO, L. THURSTON and P. WATSON. 2005. The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Theriogenology* 63 (2): 370-382.
- MALDJIAN, A., F. PIZZI, T. GLIOZZI, S. CEROLINI, P. PENNY and R. NOBLE. 2005. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 63 (2): 411-421.
- PEÑA, F. J., A. JOHANNISSON, M. WALLGREN and H. RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60 (4): 677-689.
- PURSEL, V., L. JOHNSON and G. RAMPACEK. 1972. Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *J. Anim. Sci.* 34: 278-283.
- PURSEL, V. and L. JOHNSON. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40: 99-102.
- TORRETTA, M. E., C. WEVAR, O. FORCHETTI y S. FERRERO. 1995. El efecto de tres soluciones de descongelación sobre la calidad espermática del semen porcino congelado por diferentes técnicas. *Revista Argentina de Producción Animal* 15 (3-4): 964-966.
- TORRETTA, M. E., C. WEVAR y S. FERRERO. 2002. Interacción entre efectos estacionales y técnicas de congelación de semen porcino. *Avances en Producción Animal* 27: 103-116.
- THURSTON, L., W. HOLT and P. WATSON. 2003. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology* 60 (1): 101-113.
- WATSON, P. F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 481-492.
- WESTENDORF, P., L. RITCHER und H. TREU. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor-und-Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberg Pailleten Verfahren. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 82: 261.
- WINER, B. J., D. R. BROWN and K.M. MICHELS. 1991. *Statistical principles in experimental design*. 3rd edition. Editorial: McGraw-Hill.