

DETERMINACIÓN DE LA MOTILIDAD, LA CONCENTRACIÓN Y LA MORFOLOGÍA DEL ESPERMA EYACULADO DE UN VERRACO ESTÉRIL

S. Bonet, M. Briz, E. Pinart, R. Camps y A. Fradera.

Departamento de Biología. Universidad de Girona. Albereda 3-5. 17071-Girona.

RESUM

En aquest article s'analitza la qualitat espermàtica (pH, concentració espermàtica, motilitat espermàtica i morfologia espermàtica) de l'ejaculat d'un mascle reproductor porcí estèril. Els valors de pH (7,5), concentració (234.000spz/mm³), motilitat (30-40%) i morfologia (61% d'espermatozoides immadurs) són propis d'un esperma immadur a causa de l'estrès provocat per l'elevat ritme d'extraccions.

RESUMEN

En este artículo se analiza la calidad espermática (pH, concentración espermática, motilidad espermática y morfología espermática) del eyaculado de un verraco estéril. Los valores de pH (7,5), concentración (234.000spz/mm³), motilidad (30-40%) y morfología (61% de espermatozoides inmaduros) son propios de un esperma que no ha desarrollado correctamente la maduración epididimaria debido al estrés causado por el elevado ritmo de extracciones.

ABSTRACT

Sperm quality (pH, sperm concentration, sperm motility and sperm morphology) of the ejaculate from a sterile boar has been examined. The values of pH (7.5), concentration (234,000spz/mm³), motility (30-40%) and morphology (61% of immature spermatozoa) are characteristic of an immature sperm due to the stress condition caused by a high rhythm of semen collection.

Keywords: boar, ejaculate, semen, sperm, sterility.

INTRODUCCIÓN

A medida que la inseminación artificial (IA) porcina se impone sobre la monta natural, el interés sobre la patología del verraco aumenta y, de forma muy especial, su patología seminal. En la actualidad, la inseminación artificial porcina es una práctica extendida en más del 50% de la población porcina mundial y, en breve plazo, acabará imponiéndose en todas las explotaciones porcinas de multiplicación y selección. El rendimiento de las explotaciones porcinas de selección y, más aún, el de los centros de inseminación depende en gran medida de la producción de semen de sus verracos. La obtención de eyaculados de calidad alta y constante permitirá a los centros de IA organizarse con un número relativamente reducido de verracos. En la práctica, la producción espermática no es constante y son muchos

los factores, conocidos o no, que influyen sobre la calidad y la cantidad del semen. Las fluctuaciones en tal producción espermática alcanzan generalmente al 30% de los verracos, y ello obliga a los centros de IA a mantener un número adicional de verracos si se desea conservar para el centro de IA una producción espermática constante.

De los trabajos que tratan sobre los factores que inciden en la calidad del semen de los verracos, cabe destacar las excelentes revisiones realizadas por Colenbrander y Kemp (1989) y Martín Rillo (1990). En ellas se indican, por una parte, la incidencia de la patología seminal en el rendimiento económico de las explotaciones porcinas de selección y de los centros de IA y, por otra parte, los distintos factores que pueden inducir una patología seminal (estación, luz ambiental, temperatura ambiental, nutrición, manejo, raza, edad, tamaño de los testículos, estado fisiológico del verraco y, en especial, de su aparato reproductor, ritmo de extracciones de semen, etc.) (Cameron 1980 y 1990). Dentro de los factores más estudiados, se encuentran los parámetros ambientales y el ritmo de extracciones de semen. Vigil y col. (1986) ya indicaban de qué forma afectan a las características seminales variables ambientales tales como la humedad relativa, la temperatura media diaria y el fotoperiodo; Larsson y col. (1989) estudiaron las consecuencias de las temperaturas altas sobre la morfología espermática y la fertilidad del verraco; Swierstra (1973) demuestra la influencia de la frecuencia de eyaculaciones en la composición del semen, y Bonet (1987), Bonet et al. (1991) y Bonet et al. (1993) observaron las características específicas del semen de verracos sometidos a un ritmo elevado de extracciones de semen. Por otra parte, los trastornos funcionales del aparato reproductor del verraco han sido estudiados por distintos autores, entre los que cabe destacar a Buxadé (1984), Austin y Short (1986), Spark (1988), Bonadonna (1989), Hafez (1987), Cupps (1991), King (1993), Tibault et al. (1993) y Knobil y Neil (1994). Dichos autores coinciden en que los trastornos del aparato reproductor del macho, sea su origen traumático o infeccioso, inciden sobre la calidad y la producción espermáticas.

La esterilidad o subfertilidad de un verraco suele, pues, ir unida a una determinada patología seminal. En este artículo se describe el eyaculado de un verraco de 22 meses de edad que, siendo fértil de los 7 a 8 meses de vida, pasó por un periodo de subfertilidad de los 9 a los 10 meses de vida y que desde los 11 meses de edad hasta los 22 meses fue estéril. El análisis microscópico del eyaculado nos permitirá realizar un diagnóstico del factor causante de dicha patología seminal y, en consecuencia, de la causa que ha determinado la pérdida de la fertilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

El eyaculado analizado procede de un verraco estéril de raza Pietrain de 22 meses de edad y 200 kg de peso en vivo. Dicho verraco nació en octubre de 1987 y desde el mes de mayo de 1988 (7 meses de edad) fue sometido a dos extracciones de semen semanales. De cada extracción de semen se obtuvieron por término medio 14 dosis seminales que fueron utilizadas para fertilizar a 7 hembras, por inseminación artificial y a razón de dos dosis por inseminación y hembra. De los 7 meses a los 8 meses de edad (primer periodo) el verraco fue sometido a 10 extracciones de

semen. Se obtuvieron, pues, 140 dosis seminales, se inseminaron 70 hembras y todas ellas fueron fertilizadas (fertilidad: 100%). De los 9 meses de edad a los 10 meses de edad (segundo periodo), el verraco fue sometido nuevamente a 10 extracciones de semen, se obtuvieron 140 dosis seminales y se inseminaron 70 hembras, de las cuales sólo 49 de ellas fueron fertilizadas (Fertilidad: 30%). De los 11 meses a los 22 meses de edad (tercer periodo), el verraco fue sometido a 54 extracciones de semen, se obtuvieron 756 dosis seminales y se inseminaron 378 hembras, de las que ninguna fue fertilizada (Fertilidad: 0%). En los periodos primero y segundo del verraco, la prolificidad de las hembras utilizadas fue correcta, produciéndose partos de 9 a 10 lechones nacidos vivos.

De la fracción espermática del eyaculado obtenido a los 22 meses de edad, se analizó el pH, la motilidad espermática, la concentración espermática, la morfología espermática y las malformaciones espermáticas al microscopio óptico y al microscopio electrónico de barrido.

El pH fue determinado a 37°C, con un pH-metro CRISON modelo 506. La motilidad, definida como el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo lineal, fue determinada tras cinco recuentos de 100 espermatozoides por recuento. La motilidad espermática fue examinada a partir de gotas de esperma sobre portaobjetos mantenidos a 35°C y a través del microscopio óptico de contraste de fases. La concentración espermática ha sido estudiada a partir del recuento realizado con la cámara de Thoma de gotas de esperma inmovilizado previamente con solución salina formolada al 3% (300mOsm) (solución salina formolada: 11,1 g ClNa, 925 cc agua destilada y 75 cc formol al 40%). La morfología espermática y las malformaciones espermáticas han sido estudiadas en el microscopio óptico a partir de extensiones de semen teñidas, siguiendo el método de Papanicolaou adaptado al esperma de porcino. Para establecer el porcentaje de las distintas formas gaméticas, se ha realizado el recuento de 1.200 espermatozoides. Las malformaciones espermáticas han sido estudiadas en el microscopio electrónico de barrido tras aplicar el método convencional de secado por punto crítico (Bonet et al., 1994) y el método rápido de secado simple (Bonet y Briz, 1991a).

RESULTADOS

El pH oscila entre 7,4 y 7,5. La motilidad espermática progresiva y lineal se sitúa entre el 30% y el 40%, siendo la progresiva lineal y muy rápida del 15%. La concentración espermática es de 234.750 espermatozoides/mm³

En cuanto a la morfología espermática, cabe destacar el elevado porcentaje de espermatozoides inmaduros (61,0%) (fig. 2 y 3) frente al de espermatozoides maduros (32,6%) (fig. 1) y al de espermatozoides aberrantes (6,4%) (fig. 4 y 5) (tabla 1).

Dentro de los espermatozoides inmaduros, el 0,1% presenta la gota citoplasmática en posición distal, y el 99,9% muestra la gota citoplasmática en posición proximal.

Las malformaciones espermáticas han sido clasificadas atendiendo a la trayectoria de la cola (enrollada o doblada) (fig. 4, 5, 9 y 10), a la forma de la cabeza (redonda, bacilar o piriforme) (fig. 6, 7 y 8), al número de cabezas (fig. 5, 9 y 10) y

al estado fusionado de las colas en espermatozoides con una o dos cabezas (fig. 5, 8 y 10) (tabla II).

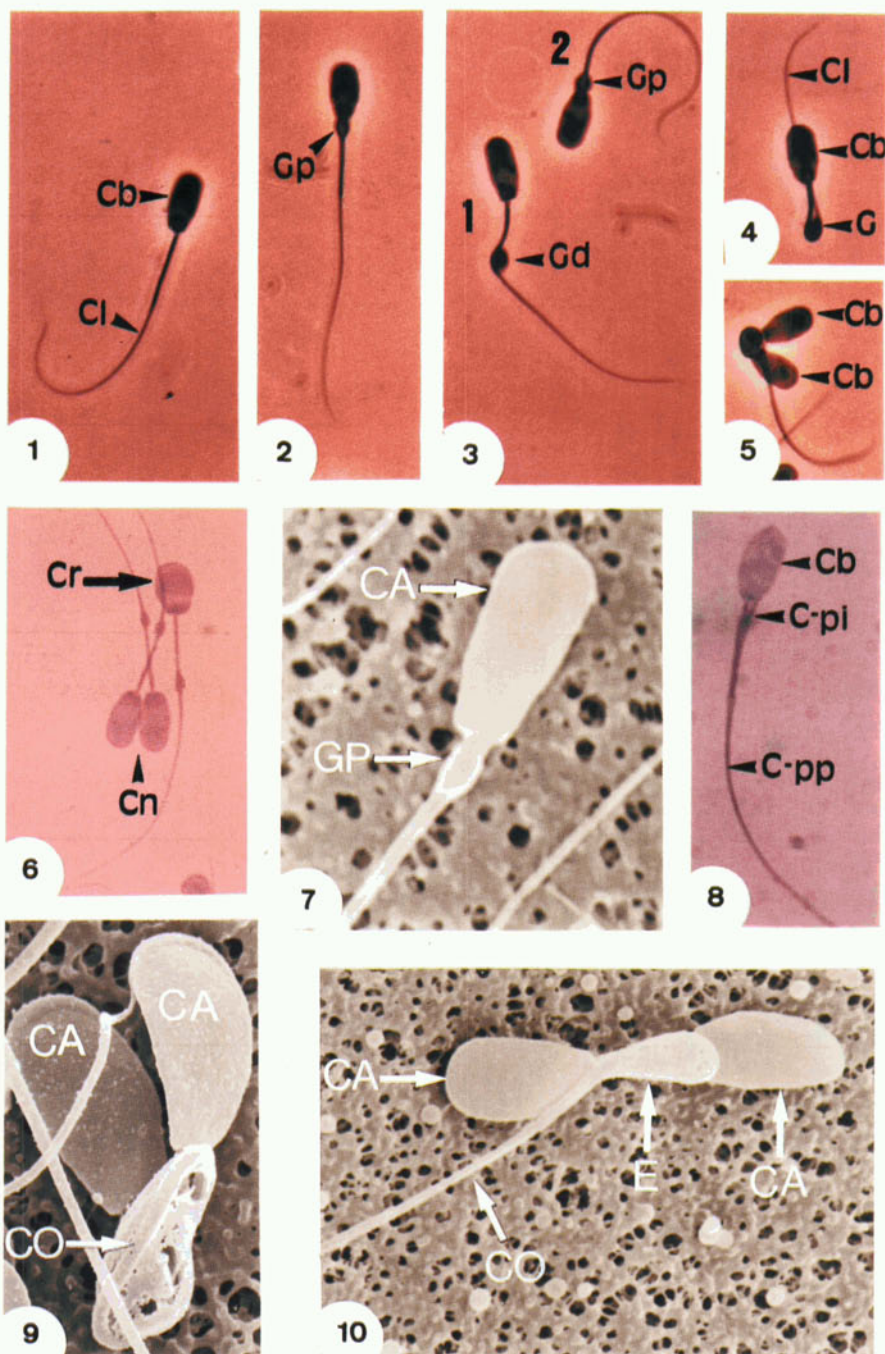
Las malformaciones que afectan a la trayectoria de la cola (enrollada o doblada) representan casi el 50% del total de malformaciones; el resto afecta a la forma, al tamaño o al número de cabezas y a la fusión de colas en espermatozoides con una o dos cabezas.

Tabla I. Morfología espermática: frecuencias absolutas (f) y porcentajes (%) de espermatozoides maduros, inmaduros y aberrantes:

TIPOS DE ESPERMATOZOIDEOS	f	%
maduros	393	32,6±4,6
inmaduros con gota proximal	726	60,4±4,7
inmaduros con gota distal	7	0,6±0,1
aberrantes	77	6,4±2,4
TOTAL	1.200	100%

Tabla II. Malformaciones espermáticas: frecuencias absolutas (f) y porcentajes (%) de espermatozoides aberrantes.

MALFORMACIÓN ESPERMÁTICA	f	%
Una cabeza y cola enrollada	33	22,0
Una cabeza y cola doblada	35	23,4
Cabeza redondeada (macro y microcefalia)	54	36,0
Una cabeza y dos colas fusionadas	7	4,6
Dos cabezas y dos colas fusionadas	16	10,6
Dos cabezas y dos colas enrolladas	5	3,4
TOTAL	150	100%



PIES DE FIGURAS

Figura 1: Espermatozoide maduro. Cb, cabeza; Cl, cola. Contraste de fases. 1100X.

Figura 2: Espermatozoide inmaduro con gota citoplasmática proximal. La gota citoplasmática (Gp) se dispone en la pieza de conexión de la cola, es decir, entre la cabeza y la pieza intermedia de la cola. Contraste de fases. 1100X.

Figura 3: Espermatozoide inmaduro con gota citoplasmática (Gd) distal (1), y espermatozoide inmaduro con gota citoplasmática (Gd) proximal (2). Obsérvese que la gota citoplasmática distal se dispone en el límite entre las piezas intermedia y principal de la cola. Contraste de fases. 1100X.

Figura 4: Espermatozoide aberrante con la cola doblada por el anillo de Jensen. Obsérvese que la cola (Cl) se dobla por la gota citoplasmática (G) en posición distal, y pasa por encima de la cabeza (Cb) del espermatozoide. Contraste de fases. 1100X.

Figura 5: Espermatozoide aberrante con dos cabezas y dos colas fusionadas. Las cabezas (Cb) se disponen entre sí en ángulo de 45° y las colas fusionadas se enrollan por sus piezas intermedias. Contraste de fases. 1100X.

Figura 6: Espermatozoides inmaduros con gota citoplasmática distal, uno con la cabeza redondeada (Cr) y los otros dos con la cabeza de tamaño y forma normales (Cn). Método de tinción: Papanicolaou. 1100X.

Figura 7: Espermatozoide inmaduro con gota citoplasmática (GP) proximal y cabeza (CA) piriforme. Microscopio electrónico de barrido. 4300X.

Figura 8: Espermatozoide maduro con dos colas fusionadas. La cabeza (Cb) presenta mayor tamaño y el reconocimiento de ambas colas se facilita en la pieza intermedia (C-pi), haciéndose más difícil a lo largo de la pieza principal (C-pp). Método de tinción: panóptico de QCA. 1200X.

Figura 9: Espermatozoide con dos cabezas (CA) y dos colas (CO) totalmente enrolladas. Microscopio electrónico de barrido. 4300X.

Figura 10: Espermatozoide con dos cabezas (CA) y dos colas (CO) fusionadas y parcialmente enrolladas (E) en su pieza intermedia. Microscopio electrónico de barrido. 3000X.

DISCUSIÓN

El pH varía en relación con la fracción del eyaculado, y sus valores normales para la fracción espermática oscilan entre 6,8 y 7,1 (Martín, 1982). Las desviaciones del pH pueden producirse por procesos infecciosos o por alteraciones en la secreción de alguna de las glándulas anejas del aparato reproductor (OMS, 1987). El plasma seminal se compone en un 10-25% de las secreciones de las vesículas seminales y en 50-70% del fluido prostático (Buxadé, 1984). En verracos sanos, los valores de pH pueden reflejar la mayor o menor participación en el eyaculado del fluido ácido prostático o de la secreción alcalina de las vesículas seminales (Austin y Short, 1993). En este sentido, un aumento del pH del eyaculado puede obtenerse por una disminución de la aportación prostática y por un aumento de la aportación de las secreciones procedentes de las vesículas seminales, o por ambos. Cuando un verraco es sometido, por un breve periodo de tiempo, a un ritmo de extracciones de semen elevado, se produce necesariamente un agotamiento de las reservas glandulares de la próstata y de las vesículas seminales que no tiene por qué afectar necesariamente por igual a ambos tipos glandulares.

Para la fracción espermática del eyaculado, los valores normales de motilidad deben superar el 80% de espermatozoides con movimiento progresivo. El espermatozoide adquiere la capacidad de moverse a lo largo de su recorrido por el epidídimo; en este sentido, cuando los espermatozoides de la cabeza del epidídimo son transferidos a una solución fisiológica, no desarrollan movimiento alguno, mientras que si los espermatozoides transferidos proceden de la cola del epidídimo, desarrollan un movimiento progresivo normal (Cooper, 1986). El espermatozoide de porcino emplea dos días para recorrer la región cefálica del epidídimo, tres días para atravesar el cuerpo epididimario y de cuatro a nueve días se mantiene almacenado en la región caudal del epidídimo (Holt y Smidt, 1976). Buxadé (1984) señala que, al producirse una eyaculación, se vacía un 60% del espermatozoide almacenado en la región epididimaria caudal y que en tan sólo dos extracciones consecutivas más se agotan las reservas espermáticas de la región caudal del epidídimo. Bonet et al. (1993) observaron que la motilidad del espermatozoide obtenido a partir de verracos estresados por el ritmo de extracciones de semen es muy baja y que su morfología se asemeja a la propia del espermatozoide procedente de las regiones cefálica y corporal del epidídimo. Cuando los verracos son sometidos a elevados ritmos de extracciones de semen, el recorrido epididimario del espermatozoide se acelera, la maduración espermática no se completa y el resultado es la obtención de un semen cuya motilidad desciende hasta valores tan bajos como los observados en el espermatozoide del verraco analizado en este artículo (45-55%).

Los valores normales de la concentración espermática para la fracción rica del eyaculado oscilan entre 500.000 y 1.000.000 de espermatozoides/mm³ (Martín, 1982). No cabe duda que la causa más evidente que puede conducir a una disminución de la concentración espermática es, en mayor o menor medida, el agotamiento de las reservas espermáticas de la región caudal del epidídimo por el elevado ritmo de extracciones de semen en un breve periodo de tiempo.

La morfología espermática, entendida como los porcentajes de espermatozoides maduros, espermatozoides inmaduros y espermatozoides aberrantes, es uno de los parámetros más indicativos del estrés. De acuerdo con Martín (1982), en un eyacu-

lado normal el porcentaje de espermatozoides maduros suele ser superior al 90%, aunque también son tolerados valores por encima del 75%. Briz et al. (1991), al estudiar la calidad del esperma procedente de las tres regiones epididimarias (caput, corpus y cauda), observaron que la presencia de espermatozoides inmaduros alcanza más del 50% de los espermatozoides presentes en las regiones cefálica y corporal del epidídimo. A nivel del caput epididimario, la forma gamética más numerosa es la inmadura con gota proximal, y a nivel del corpus epididimario, la forma gamética más abundante es la inmadura con gota distal. Así pues, los eyaculados con porcentajes muy elevados de espermatozoides inmaduros con gota citoplasmática proximal se asemejan, por su calidad espermática, al esperma procedente de la región cefálica del epidídimo.

Bonet (1990) y Bonet y Briz (1991b) han descrito las principales malformaciones espermáticas presentes en el eyaculado de *Sus domesticus*, en una clasificación que atiende las malformaciones que afectan tanto a la cabeza como a las distintas piezas de la cola del espermatozoide. Por otra parte, Bonet et al. (1992) y Briz et al. (1991) han establecido el origen epididimario de las malformaciones espermáticas "cola doblada" y "cola enrollada". De acuerdo con estos autores, los espermatozoides con cola doblada por el anillo de Jensen se desarrollan en la región caudal del epidídimo a partir de espermatozoides inmaduros con gota citoplasmática distal, y los espermatozoides con cola enrollada se desarrollan también a lo largo del recorrido epididimario. Las malformaciones espermáticas más abundantes en el eyaculado de los verracos examinados en este artículo son el doblamiento y enrollamiento de la cola.

Todas las características del esperma eyaculado del verraco estudiado (pH, motilidad, concentración, morfología y malformaciones) se asemejan a las del esperma procedente de las regiones cefálica y corporal del epidídimo, es decir, a las propias de un esperma inmaduro, no apto para la fecundación, hecho que explica la muy baja fertilidad del verraco estudiado.

BIBLIOGRAFÍA

- AUSTIN, C.R. and SHORT, R.V. 1993. *Reproduction in Mammals: Germ cells and fertilization*. Cambridge University Press. Cambridge.
- AUSTIN, C.R. and SHORT, R.V. 1986. *Reproduction in Mammals: Manipulating Reproduction*. Cambridge University Press. Cambridge.
- BONADONNA, T. 1989. *Reproducción Animal e Inseminación Artificial*. Hemisferio Sur SA.
- BONET, S. 1987. Estudio del eyaculado de un verraco estresado por la frecuencia de recogidas en inseminación artificial. *Scientia Gerund.*, 13: 35-40.
- BONET, S. 1990. Immature and aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Animal Reprod. Science*, 22: 67-80.
- BONET, S. y BRIZ, M. 1991a. Comparison between the conventional method and the simple desiccation method in porcine sperm processing for scanning electron microscopy. *J. of Microscopy*, 162: 291-294.
- BONET, S. y BRIZ, M. 1991b. New data on aberrant spermatozoa in the ejaculate of *Sus domesticus*. *Theriogenology* 35(4): 725-730.
- BONET, S., BRIZ, M. y FRADERA, A. 1991. The sperm quality and fertility of boars after two different ejaculation frequencies. *Scientia gerund.*, 17: 77-84.

- BONET, S., BRIZ, M. y FRADERA, A. 1993. Estudio comparativo entre la morfología espermática del eyaculado de verracos sometidos a extracciones de semen cada dos días y la morfología del espermatozoide procedente de las tres regiones epididimarias. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.*, 124: 30-38.
- BONET, S., BRIZ, M. y FRADERA, A. 1994. Contrastación del espermatozoide de porcino al microscopio electrónico de barrido. *Tratado de Ganado Porcino*, 21: 21-28.
- BONET, S., BRIZ, M., FRADERA, A. y EGOZCUE, J. 1992. Origin, development and ultrastructure of boar spermatozoa with folded tails and with two tails. *Human Reprod.*, 7(4): 523-528.
- BRIZ, M., BONET, S. y FRADERA, A. 1991. Qualitat microscòpica dels espermatozoides a les regions cefàlica, corporal i caudal de l'epidídim de *Sus domesticus*. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 42: 19-34.
- BRIZ, M., FRADERA, A., BONET, S. y PINART, E. 1993. Analysis of the seminal characteristics of a boar with impaired fertility. *Scientia gerund.*, 19: 53-60.
- BUXADÉ, C. 1984. *Ganado Porcino*. Ed. Mundi Prensa, Madrid.
- CAMERON, R.D.A. 1980. Factors influencing semen production and quality in young boars. *Int. Pig. Vet.Soc. (Denmark)*: 57-58.
- CAMERON, R.D.A. 1990. Desarrollo sexual y producción de semen en verracos. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.*, 91: 30-38.
- COLENBRANDER, B. y KEMP, B. 1989. Factors affecting semen quality in the boar. *Proceedings 10th, Symposium Anaporc (Barcelona)*, 58-66.
- COOPER, T.G. 1986. *The Epididymis, Sperm Maturation and Fertilization*. Springer-Verlag. Berlín.
- CUPPS, P.T. 1991. *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press. Londres.
- HAFEZ, E.S.E. 1987. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Interamericana-McGraw-Hill. México.
- HOLT, W. y SMIDT, D. 1976. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J. Reprod. Fert.*, 46: 227-229.
- KING, G.J. 1993. *Reproduction in Domesticated Animals*. Elsevier. Amsterdam.
- KNOBIL, E. y NEILL, J. 1994. *The Physiology of Reproduction*. Vol. I and II. Raven Press. Nova York.
- LARSSON, K., MALMGRAN, L. y EINARSSON, S. 1989. Exposición de verracos a elevadas temperaturas ambientales: consecuencias sobre la secreción hormonal, morfología espermática y fertilidad. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.*, 80: 33-36.
- MARTÍN, R.S. 1990. Problemas reproductivos asociados con anomalías del semen de verraco. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.*, 95: 35-46.
- MARTÍN, R.S. 1982. *Reproducción e Inseminación Artificial Porcina*. Ed. Aedos. Barcelona.
- OMS. 1987. *Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. Paramericana. Buenos Aires.
- SWIERSTRA, E.E. 1973. Influence of breed, age and ejaculation frequency on boar semen composition. *Can. J. Anim. Sci.*, 53: 43-45.
- SPARK, R. 1988. *The Infertile Male*. Plenum Medical Book Company. Nova York.
- THIBAULT, CH., LEVASSEUR, M.CL. y HUNTER, R.H.F. 1993. *Reproduction in Mammals and Man*. Ellipses. Paris.
- VIGIL, M.E., GONZALO, A.C., CIUDAD, C.C. y RUIZ-POVEDA, L.J. 1986. Variables ambientales que determinan la calidad seminal de un verraco. *Rev. Asoc. Nac. Porcinocult. Cient.*, 49: 71-83.