

EFECTO DE LA APLICACIÓN PARENTERAL DE LISOZIMA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y CALIDAD DEL SEMEN DE VERRACOS EN VENEZUELA

Effect of the Application of Parental Lysozyme on Production and Quality of Boars Semen in Venezuela

Armando Fuentes

Agropecuaria AGRQUIMVET C.A. Venezuela. arfuentes@gmail.com

RESUMEN

En la inseminación artificial porcina, el número de dosis obtenidas depende de la calidad del semen y el número de espermatozoides en el eyaculado. La aplicación parenteral semanal de lisozima en verracos maduros, puede actuar incrementando el número de espermatozoides eyaculados, incrementando el número de dosis. En el presente trabajo, se tomaron 10 verracos maduros separados en dos grupos, cinco en el grupo control (grupo C) y cinco para el tratamiento con lisozima (grupo L). Durante el primer mes de estudio, no se aplicó ningún tratamiento. Durante el segundo mes, se aplicó semanalmente, vía parenteral, lisozima durante cuatro semanas a los verracos del grupo L. Semanalmente se les hacía extracción seminal SE evaluaba y registraba la información. Al análisis estadístico, para 190 eyaculados, con el programa StatView, se observaron diferencias en el número total de espermatozoides eyaculados ($P < 0,05$) entre grupos con promedios de $72,26 \times 10^9 \pm 16,8$ y $64,72 \times 10^9 \pm 17,3$ para C y L, respectivamente. El análisis estadístico indicó que hubo diferencias ($P < 0,05$) entre tratamientos, específicamente en el mes de post-tratamiento en el grupo L con $58,48 \times 10^9 \pm 16,0$ y $71,65 \times 10^9 \pm 15,2$ para el conteo de espermatozoides totales para los meses 1 y 3, respectivamente. Se observó diferencias entre tratamientos para volumen eyaculado. No se observaron diferencias para motilidad y vitalidad entre los tratamientos. No se vieron diferencias entre meses dentro de tratamiento (grupo L) para el volumen eyaculado. Este trabajo conduce al uso futuro de las lisozimas en el manejo reproductivo de los cerdos y especialmente los verracos, y probablemente, en otras especies, mejorando la producción de dosis seminales. Por otro lado, se recomienda continuar el estudio durante mayor número de meses y posiblemente la aplicación o suministro diario de la enzima como aditivo en el alimento.

Palabras clave: Lisozima, espermatozoides totales, volumen, verracos.

ABSTRACT

In swine artificial insemination, the number of doses obtained depends on the semen quality and ejaculate sperm number. Weekly parenteral application of lysozyme in mature boars could increase the number of ejaculates sperm, thus increasing the number of doses. In the present study, 10 mature boars were taken and separated into two groups, five boars for control group (Group C) and five for lysozyme treatment (Group L). During the first month of study, no treatment was applied. During the second month, lysozyme was applied weekly; via parenteral during four weeks, every week sperm was taken from each boar toward seminal extraction and evaluated in a laboratory data was recorded. Statistical analysis for 190 ejaculates were analyzed using the Statview program and differences were observed ($P < 0.05$) between groups with averages of $72.26 \times 10^9 \pm 16.8$ and $64.72 \times 10^9 \pm 17.25$ for C and L, respectively. Statistical analysis indicates that there were differences ($P < 0.05$) between treatments, specifically in the month of after-treatment, in Group L $58.48 \times 10^9 \pm 16.01$ and $71.6 \times 10^9 \pm 15.2$ for total sperm count for months 1 and 3, respectively. There were no differences for motility and vitality among treatments. Differences between treatments for the ejaculate volume were observed. Differences between months in treatment (Group L) for the ejaculate volume were not observed. This work focused on the future use of the lysozyme on the reproductive management of the pigs boars, and possibly in other species, improving sperm production. Furthermore, it is recommended the study for a longer period and possibly the application or daily supply of the enzyme as a food additive.

Key words: Lysozyme, total sperm, volume, boars.

INTRODUCCIÓN

En producción animal, la importancia del macho radica en su valor genético y su potencial reproductivo, que se manifiesta en su calidad seminal, así como en la producción de semen cuando se utilizan en programas de inseminación artificial (IA), manifestándose en el número de dosis y cerdas (*Sus scrofa*) posibles a servir, valorándose de esta manera la difusión genética y el mejoramiento de los índices productivos de la granja o explotación. Por lo cual, al incorporar aditivos a la dieta normal de éstos reproductores, que permitan incrementar su potencial reproductivo, sería una práctica muy valiosa dentro de todo sistema de producción animal y en este caso del porcino.

Se conoce que la introducción de los antibióticos en el manejo rutinario para el control de las enfermedades, tanto en el humano como el animal, ha traído grandes beneficios a la humanidad, por un lado, incrementando la expectativa de vida y por el otro, incrementando el aporte de proteína de origen animal. Sin embargo, el uso y abuso de los antibióticos han provocado respuestas defensivas de las bacterias, creando resistencia a muchos de ellos y respuestas alérgicas en humanos y animales. De seguir así, estarán expuestos a nuevas enfermedades, a no ser que se desarrollen nuevos medicamentos o se utilicen otras alternativas naturales que no provoquen resistencia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) decretó el año 2011 [13], como el año de la Resistencia Bacteriana, solicitando con urgencia, activar todos los medios de investigación para la generación de alternativas en la lucha contra las bacterias, ante el uso y abuso indiscriminado de los antibióticos. Entre esas alternativas aparecen las Lisozimas, como enzimas naturales y consideradas como elementos de primera fila en defensa contra las infecciones bacterianas.

La lisozima fue descubierta por Fleming en 1922, de manera fortuita, cuando analizaba unas placas de cultivos bacterianos y al estornudar, comprobó que no hubo crecimiento en los sitios donde cayeron gotas de estornudo [5]. Se ha demostrado la presencia de lisozima en los líquidos orgánicos y en la clara de huevo de distintas especies de aves, con mayor concentración en el de gallina (*Gallus gallus domesticus*) [1, 5]. La lisozima, es una enzima (muramidasa) que rompe las paredes celulares de las bacterias, hidrolizando enlaces glucosídicos (β 1-4) de ácido N-acetilmurámico a N-acetilglucosamina presente en el peptidoglicano de la pared celular bacteriana. Existen reportes y algunos trabajos de investigación que demuestran que, las Lisozimas [4, 11] permiten el control de algunas cepas bacterianas y otras enzimas [2], que presentan a su vez efecto sobre la respuesta reproductiva, tanto en hembras como en machos [3], en este último disminuyendo su capacidad de producción seminal de calidad [9, 10] y en las hembras de diferentes especies, en su incapacidad de lograr que sus ovocitos sean fertilizados debido a desordenes ováricos o dificultar su nidación debido a la presencia de endometritis producidas por *Escherichia coli* [8]. En Venezuela se ha identificado un tipo de lisozima como elemento de resistencia a infecciones bacteria-

nas en la producción de ovas (huevos) embrionadas y alevines de trucha Arcoiris [19].

Molina [10] demostró como la presencia de bacterias contaminantes en el semen, en este caso de humano, provoca problemas de infertilidad, debiendo ser atacado con antibióticos que en muchos casos presentan alta resistencia. En otros trabajos se ha demostrado que, las contaminaciones bacterianas, causan procesos inflamatorios [21] en infecciones intestinales [12] y otros asociados a disminución de la concentración espermática [20]. En Europa [17] se viene utilizando la lisozima en medicina humana, para el control bacteriano y otras patologías en investigación, como son las de origen endocrino, nutricionales y enfermedades virales. Se ha observado en enfermedades respiratorias de conejo (*Oryctolagus cuniculus*), una acción favorable de los macrófagos alveolares debido al alto contenido de lisozima de los mismos [11]. A pesar de la multitud de estudios realizados a esta proteína, solamente parece clara la función de defensa contra la infección bacteriana [18]. Reforzando este estudio, en el 2010 [16], también se observó actividad antimicrobiana de la lisozima del huevo de gallina, con alta especificidad a la pared microbiana (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*), con aparente ausencia de efectos tóxicos a los humanos. Además es registrada como E-1105 y utilizada en la conservación de alimentos (carnes, quesos, lácteos, vinos, entre otros), sin influir en las características organolépticas de los mismos. En el presente estudio se trató de demostrar otra función como lo es la reproductiva, basada en hechos verificables en la rutina de manejo de los verracos. En Venezuela no existe hasta el momento, ningún reporte científico que avale esta aseveración, por lo que se implementó un trabajo para estudiar el efecto de la aplicación parenteral de lisozima en verracos donantes de semen y estudiar su efecto sobre la calidad del semen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con la colaboración de una empresa de producción de dosis seminales para IA, donde se mantuvieron a 26 verracos completamente aislados de las unidades de producción en ambiente controlado, con una temperatura media de 24°C. La empresa posee un laboratorio ubicado en el municipio Carlos Arvelo del estado Carabobo, con todos los equipos modernos para la recolección, evaluación, procesamiento y almacenamiento de semen porcino. Este laboratorio procesa semen para una población de 3.500 cerdas. A los verracos se les suministró diariamente 2 kg de alimento lactante (20% de proteína y 3.200 Kcal). Su ritmo de recolección de semen varió de cuatro a cinco días. Se seleccionaron 10 verracos adultos de línea terminal con edad comprendida entre 18 y 24 meses, asignando cinco verracos al grupo control (C) y cinco verracos al grupo lisozima (L). Al grupo L se les aplicó una inyección (8 mL) semanal (todos los sábados) de un producto comercial que contiene lisozima, por un mes, o sea cuatro semanas se-

guidas. El grupo C se continuó con su manejo de rutina como todos los demás verracos. Presentaban disponibilidad de agua constantemente. Las vacunas que correspondieron según el plan sanitario se aplicaron concomitantemente a todos los verracos.

Para la recolección y evaluación de las muestras en los 10 verracos seleccionados se siguieron los pasos siguientes según metodología descrita por Fuentes [7].

La recolección del semen se realizó (manteniendo las normas de higiene establecidas para esta tecnología y de manera manual) utilizando un envase de 300 mL de capacidad y un filtro para la separación de la fracción sólida de la líquida. La evaluación espermática se realizó en el laboratorio a través del uso de un microscopio de luz, marca ZPO de origen polaco, evaluando las variables: motilidad, vitalidad (porcentaje de espermatozoides en movimiento o vivos), presencia de aglutinaciones [14], concentración espermática, espermatozoides totales en el eyaculado y volumen del eyaculado (mL). La motilidad se determinó al microscopio con objetivo 10X, evaluando las características del movimiento con valores de 0 a 5. La concentración espermática, se determinó utilizando un fotocolorímetro digital portátil, de pila, marca MediChimica, fabricada en Italia. La concentración espermática determinada en millones por mL, se multiplicó por el volumen del eyaculado (mL), obteniendo así, la cantidad de espermatozoides totales por eyaculado ($ET \times 10^9$). Dilución: La cantidad de espermatozoides totales ($ET \times 10^9$) contenido en el eyaculado, se dividió entre el número de espermatozoides por dosis de semen ($Ex \times 10^9$), obteniendo el número de dosis.

Los datos obtenidos de la evaluación fueron registrados inmediatamente en planillas elaboradas para tal fin y luego vaciados en planillas individuales por verraco. El personal que realizó la extracción del semen siempre fue el mismo, así como la persona que realizó la evaluación, evitando así la variabilidad por efecto humano.

Semanalmente se realizó la recolección de la información de los 10 verracos en estudio. Las primeras cuatro semanas, todos los verracos fueron manejados en iguales condiciones, iniciando la aplicación parenteral de la lisozima a la quinta semana del estudio, hasta la semana ocho que se realizó la última aplicación. En este sentido, el estudio se realizó en tres etapas (mes), correspondiendo a: Mes 1 (sin tratamiento); Mes 2 (tratamiento solo al grupo L); Mes 3 (sin tratamiento).

Análisis estadístico

Se analizaron las variables: motilidad, vitalidad, volumen y el número de espermatozoides por eyaculado, para determinar las variaciones en el periodo de tratamiento.

El primer mes de los datos, corresponde a las semanas previas al tratamiento, donde los verracos fueron extraídos dentro de la rutina de la empresa. Después de la última extracción del mes previo, los verracos del grupo L fueron inyecta-

dos con el producto a base de lisozima (Lizovet), y así durante cuatro semanas seguidas. El segundo mes del análisis corresponde al mes de las aplicaciones de lisozimas. Al tercer mes, ambos grupos de verracos siguieron su misma rutina, sin aplicaciones de tratamiento alguno.

Se utilizó el paquete estadístico StatView del programa SAS [15], aplicando análisis de varianza en este caso para ver el efecto tratamiento, mes y diferencias entre medias, sobre las variables en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evaluaron 190 eyaculados durante los tres meses de estudio con los siguientes resultados. En la TABLA I, se puede observar diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los dos tratamientos para espermatozoides por eyaculados, con promedios de $72,262 \pm 16,822$ y $64,724 \pm 17,254 \times 10^9$ espermatozoides para C y L, respectivamente. Sin embargo es de hacer notar, que corresponden a valores globales del ensayo, considerando que el grupo C, inicialmente presentaba mayor producción espermática que el grupo L. Así mismo, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) para volumen entre tratamientos, con promedios $225,622 \pm 27,778$ y $190,073 \pm 34,849$ mL, para C y L, respectivamente (TABLA II), no demostrando diferencias entre meses para ambos grupos (TABLA IV). No se observaron diferencias para motilidad y vitalidad entre tratamientos (TABLA III).

Cuando se analizó el efecto de la variable mes se pudo observar en el grupo L que, existió un incremento del número de espermatozoides en el eyaculado (TABLA V), durante el mes de aplicación (mes 2), lo que no se puede confundir con incremento de la actividad espermatogénica, sino como una mayor estimulación en la liberación de los espermatozoides

TABLA I
PROMEDIO DE ESPERMATOZOIDES TOTALES
POR TRATAMIENTO

Variables	Grupo C	Grupo L
N° Observaciones	82	108
Espermatozoides totales ($\times 10^9$)	$72,262 \pm 16,822a$	$64,724 \pm 17,254b$

($P < 0,05$) Letras diferentes entre columnas implican diferencias significativas.

TABLA II
PROMEDIO DE VOLUMEN DE EYACULADO
POR TRATAMIENTO

Variables	Grupo C	Grupo L
N° Observaciones	82	108
Volumen (mL)	$225,622 \pm 27,778 a$	$190,073 \pm 34,849 b$

($P < 0,05$) Letras diferentes entre columnas implican diferencias significativas.

TABLA III
PROMEDIOS DE MOTILIDAD Y VITALIDAD POR EFECTO TRATAMIENTO Y MES

Tratamiento	Mes	N° Observac.	Motilidad (0-5)	Vitalidad (%)
Grupo C	1	30	3,58 ± 0,19	77,00 ± 2,49
	2	26	3,61 ± 0,21	77,88 ± 2,51
	3	26	3,64 ± 0,23	78,14 ± 2,82
Grupo L	1	39	3,64 ± 0,28	77,56 ± 3,00
	2	37	3,67 ± 0,24	77,97 ± 2,48
	3	32	3,68 ± 0,24	78,18 ± 2,74

NS (P>0,05).

TABLA IV
PROMEDIO DE VOLUMEN EYACULADO (mL) POR TRATAMIENTO Y MES DE EXTRACCIÓN

Tratamiento	Mes	Cantidad	Media (mL)	DS
Grupo C	1	30	232,56	31,39
	2	26	221,65	26,20
	3	26	221,57	24,06
Grupo L	1	39	187,97	40,39
	2	37	189,00	36,91
	3	32	193,75	24,64

NS (P>0,05).

TABLA V
PROMEDIO DE ESPERMATOZOIDES TOTALES (E X 10⁹) POR TRATAMIENTO Y MES

Tratamiento	Mes	Cantidad	Media	DS
Grupo C	1	30	69,799	16,0
	2	26	74,490	15,75
	3	26	72,875	18,11
Grupo L	1	39	58,448 ^a	16,01
	2	37	65,349 ^{ab}	18,16
	3	32	71,651 ^b	15,18

(P<0,05) Letras diferentes entre columnas implican diferencias significativas.

del epidídimo, con mantenimiento del mismo efecto en el siguiente mes. Así mismo se pudo observar que, en el grupo C no existió variación en la cantidad de espermatozoides eyaculados en los diferentes meses. El análisis estadístico indicó que hubo diferencias (P<0,05) entre meses, específicamente en el mes de post-tratamiento en el grupo L con 58,48 ± 16,01 y 71,65 ± 15,18 X10⁹ de espermatozoides totales para los meses 1 y 3, respectivamente.

En la TABLA III se puede observar que no existen diferencias entre meses dentro de tratamientos (grupo L) para el volumen eyaculado. Fuentes y col. [6, 7], Fuentes [7] deter-

minaron que el incremento del número de espermatozoides está asociado al volumen eyaculado, y en este caso, la mayor concentración, es debido a la mejor movilización de los espermatozoides a través del epidídimo y no al incremento de la multiplicación espermática por estímulos durante el proceso espermatogénico. En este sentido, es necesario profundizar e incrementar el tiempo de estudio para determinar efectos sobre la espermatogénesis. Sin embargo, el efecto antiinflamatorio [12], puede estar jugando un papel muy importante en los cambios bioquímicos de las vías espermáticas facilitando su transporte a través del epidídimo.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos concuerdan con reportes aislados que indican, que posterior a una inyección de lisozimas, a verracos donantes de semen se observaba un incremento del número de dosis en la siguiente extracción, por lo que este trabajo orienta hacia el uso futuro de las lisozima en el manejo reproductivo de los cerdos y en este caso de los verracos, así como en otras especies, mejorando posiblemente la producción de espermatozoides y controlando la contaminación bacteriana que tiene un efecto negativo en cuanto a la fertilidad se refiere. La aplicación parenteral de lisozima podría estar jugando un papel muy importante en el control bacteriano, acondicionando las vías de tránsito espermático y los cambios bioquímicos, que ocurren en los procesos inflamatorios provocados por las infecciones bacterianas, también observadas a nivel intestinal en infecciones con *E. coli*, por lo que se recomienda continuar el estudio durante mayor número de meses y posiblemente la aplicación o suministro diario de la enzima como aditivo en el alimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALDERTON, G.; WARD, W.; FEVOLD, H. Isolation of lysozyme from egg white. **J. Biol. Chem.** 157:43-58. 1945.
- [2] DE ONDIZ, A.; AVILES, M.; GARCIA-VAZQUEZ, F.A.; AVILES, K.; GRULLIN, L.; RUIZ, S. Enzymatic activity level of different glycosidases in porcine epididymal sperm and fluid. **Reprod. Dom. Anim.** 43:72. 2008.
- [3] FERNÁNDEZ, A.; CRUZ, E.; LAZO, L.; ARREDONDO, C.; BRITO, A. Estudio bacteriológico del semen de porcino. Valoración preliminar del efecto de la lectina de *Escherichia coli* en la aglutinación espermática. **Salud Anim.** 23 (2):73-79. 2001.
- [4] FLEMING, A.; ALLISON, V. Observation on a bacteriolytic substance ("lysozyme") found in secretions and tissues. **Brit. J. Exp. Path.** 13:252. 1922.
- [5] FLEMING, A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. **Proc. Roy Soc. Ser B.** 93:306-17. 1922.

- [6] FUENTES, A.; SERRANO, G. de; MANZO, M. de; REGUIRO, C.; VALLE, A. Efecto de la época sobre las características espermáticas de verracos en el trópico. **Zoot. Trop.** X (1):51-64. 1992.
- [7] FUENTES, A. Estudio del comportamiento reproductivo de verracos a nivel de granjas en el trópico. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Central de Venezuela. Maracay. Tesis de Grado. 95 pp. 1989.
- [8] GILBERT, R.O.; BOSU, W. K.; PETER, A.T. The effect of *Escherichia coli* endotoxin on luteal function in Holstein heifers. **Theriogenol.** 33(3):645-650. 1990.
- [9] MALAVE, S. Investigación de la calidad de espermática y aislamiento de enterobacterias en semen de pacientes con problemas de infertilidad en Cumaná, Estado Sucre. Escuela de Ciencias Universidad de Oriente. Tesis de Grado 44 pp. 2011.
- [10] MOLINA, R. Calidad espermática y su asociación con *Enterococcus faecalis*, aislado de pacientes con problemas de fertilidad. Escuela de Ciencias Universidad de Oriente. Tesis de Grado. 48 pp. 2011.
- [11] MYRVIK, Q. M.; LEAKE, E. S.; FARISS, B. Studies of pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit. **J. Immunol.** 86:128. 1961.
- [12] NYACHOTI, C.M.; KIARIE, E.; BHANDARI, S.K.; ZHANG, G.; KRAUSE, D. O. Weaned pig responses to *Escherichia coli* K88 oral challenge when receiving a lysozyme supplement. **J. Anim. Sci.** 90:252-260. 2012.
- [13] ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. "Resistencia a los antimicrobianos (RAM)". Centro de Prensa. Nota descriptiva N°194. En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>. 03/11/2012.
- [14] PINEDA, Y.; SANTANDER, J. Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela. **Zoot. Trop.** 25(3): 173-177. 2007.
- [15] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS). Stat View. Version 5.0. 1998.
- [16] RUAS, G. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de Lisozimas. Universidad de Sao Paulo, Sao Paulo. Tesis de Grado. Pp 80. 2010.
- [17] SANZ, M. Estudios estructurales y aplicaciones biotecnológicas de la lisozima del bacteriófago Cp-I de *Neumococo*. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Complutense de Madrid. Tesis de Grado. 177 pp. 1992.
- [18] SCHINDLER M.; ASSAF, Y.; SHARON, N.; CHIPMAN, D. Mechanism of Lysozyme Catalysis: Role of Ground-State Strain in Subsite D. in *Heg Egg-White and Human Lysozymes*. **Biochem.** 16 (3): 423-431. 1977.
- [19] TORRES, J. M.; CONCEPCIÓN, J. L.; VIELMA, J. R. Detección de agentes bacterianos en ovas de trucha Arcoiris. **Rev. Dig. INIA HOY.** N° 2 Mayo-Agosto. Pp. 1-5. 2008.
- [20] TORRES, D.; GONZÁLEZ, G. El factor masculino en un servicio de infertilidad de Lima. **Rev. Invest. Clin.** 34 (2):17-22. 1995.
- [21] WEIDNER, W.; LUDWIG, M. Common organisms in urogenital infections with special impact on prostatitis. **Eur. Urol.** 2:15-18. 2003.