



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD.

REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS.

**Tesis que para obtener el grado de Maestro en Biología de la Reproducción
Animal presenta:**

JOSE ANTONIO HERRERA BARRAGAN.

**Dr. J. Miguel Betancourt Rule. (Tutor)
M en C. Adelfa Del C. García Contreras. (Asesora)**

México, D.F.

Marzo del 2000.

Este trabajo, se realizó en el laboratorio de Biología Celular del departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I), con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), mediante el convenio 1407PN y la beca para maestría número 124684.

Agradecemos a todas las granjas que contribuyeron para la realización de este trabajo, mediante la donación de muestras de semen y la confianza para otorgar la información solicitada.

Gracias Gaby

Gracias Natalia

Por su paciencia, amor y confianza.

Así es el reino de Dios, como cuando un hombre echa semilla en la tierra, la semilla crece y brota sin que él sepa como, primero hierba, luego espiga, después grano lleno en la espiga.

S. Marcos 4: 26-28

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Betancourt, por la confianza y acertada dirección de éste trabajo.

A la M. en C. Adelfa Del Carmen, por sus consejos y apoyo.

Al M. en C. Héctor Zayas, por su amistad incondicional al compartir sus conocimientos.

Al M. en C. Jesús Conejo, por su amistad y ayuda desinteresada en la revisión del trabajo.

Al M. en C. Ricardo Ruiz, por su gran apoyo y ayuda en la parte del análisis estadístico de lo datos.

Al Dr. Heberto Esparza, por la revisión del trabajo.

A todos los compañeros del laboratorio de Biología Celular, por el respeto y disposición de ayuda.

Al Sr. Armando Herrera y Sra. Guadalupe Guarneros, por todo su apoyo incondicional y desinteresado.

A mis padres y hermanos.

INDICE.

| | | |
|------|--|----|
| I | RESUMEN..... | 6 |
| 1. | INTRODUCCION..... | 7 |
| 2. | REVISION DE LITERATURA..... | 8 |
| 2.1 | Inseminación artificial y conservación del semen porcino..... | 8 |
| 2.2 | Problemas de fertilidad y evaluación espermática..... | 11 |
| 2.3 | Estructura espermática..... | 12 |
| 2.4 | Capacitación espermática y reacción acrosomal..... | 14 |
| 2.5 | La reacción acrosomal como indicador de fertilidad y/o prolificidad..... | 17 |
| 2.6 | Factores que inhiben la reacción acrosomal..... | 18 |
| 3. | JUSTIFICACION..... | 19 |
| 4. | HIPOTESIS..... | 19 |
| 5. | OBJETIVOS..... | 19 |
| 5.1. | Objetivo general..... | 19 |
| 5.2. | Objetivos particulares..... | 19 |
| 6. | DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 20 |
| 7. | MATERIAL Y METODOS..... | 21 |
| 7.1. | Selección y clasificación de verracos..... | 23 |
| 7.2. | Evaluación espermática básica..... | 23 |
| 7.3. | Determinación de la reacción acrosomal..... | 24 |
| 7.4. | Influencia de variables ajenas a la calidad espermática en la reacción acrosomal..... | 25 |

| | | |
|------|---|----|
| 8. | ANALISIS ESTADISTICO..... | 27 |
| 9. | RESULTADOS..... | 29 |
| 9.1. | Prevalencia de problemas reproductivos en verracos..... | 29 |
| 9.2. | Evaluación espermática básica..... | 29 |
| 9.3. | Determinación de la reacción acrosomal..... | 31 |
| 9.4. | Efecto de la raza en la reacción acrosomal..... | 34 |
| 9.5. | Efecto de la edad de los verracos en la reacción acrosomal..... | 36 |
| 9.6. | Efecto del tiempo de conservación del semen en la reacción acrosomal..... | 37 |
| 9.7. | Correlación entre la motilidad espermática y la reacción acrosomal..... | 38 |
| 9.8. | Efecto del tipo de alojamiento en la reacción acrosomal..... | 39 |
| 9.9. | Efecto del propósito zootécnico en la reacción acrosomal..... | 40 |
| 10. | DISCUSION..... | 41 |
| 10.1 | Evaluación espermática básica..... | 41 |
| 10.2 | La reacción acrosomal espontánea como indicador de fertilidad..... | 42 |
| 10.3 | Evaluación de la reacción acrosomal inducida..... | 43 |
| 10.4 | Influencia genética y ambiental en la reacción acrosomal..... | 45 |
| 11. | CONCLUSIONES..... | 47 |
| 12. | ANEXOS..... | 48 |
| 13. | LITERATURA CITADA..... | 54 |

INDICE DE CUADROS.

| | | |
|-----------|---|----|
| Cuadro 1. | Parámetros establecidos para no usar dosis seminales conservadas..... | 9 |
| Cuadro 2. | Factores que influyen en la calidad del semen conservado..... | 10 |
| Cuadro 3. | Enzimas presentes en el acrosoma..... | 14 |
| Cuadro 4. | Contaminantes bacterianos encontrados en muestras diluidas de semen porcino..... | 18 |
| Cuadro 5. | Localización de las granjas y número de muestras proporcionadas..... | 22 |
| Cuadro 6. | Características de los verracos..... | 22 |
| Cuadro 7. | Prevalencia de verracos con problemas reproductivos..... | 29 |
| Cuadro 8. | Comparación de la motilidad y viabilidad espermática en los grupos de verracos..... | 30 |
| Cuadro 9. | Comparación de la morfología espermática en los grupos de verracos.... | 30 |

INDICE DE FIGURAS.

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1. | Patrones de fluorescencia en espermatozoides sin y con reacción acrosomal..... | 32 |
| Figura 2. | Distribución de los porcentajes de reacción acrosomal determinados en espermatozoides de verracos sin y con problemas reproductivos..... | 33 |
| Figura 3. | Comparación de la reacción acrosomal espontánea é inducida en espermatozoides de verracos del mismo grupo..... | 34 |
| Figura 4. | Distribución de los porcentajes de reacción acrosomal espontánea en espermatozoides de verracos de diferente raza sin y con problemas reproductivos..... | 35 |
| Figura 5. | Distribución de los porcentajes de reacción acrosomal inducida en espermatozoides de verracos de diferente raza sin y con problemas reproductivos..... | 35 |
| Figura 6. | Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos de distintas edades sin problemas reproductivos..... | 36 |
| Figura 7. | Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos de distintas edades con problemas reproductivos..... | 36 |
| Figura 8. | Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos sin problemas reproductivos, con respecto a los tiempos de conservación del semen..... | 37 |

| | | |
|------------|---|----|
| Figura 9. | Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos con problemas reproductivos, con respecto a los tiempos de conservación del semen..... | 37 |
| Figura 10. | Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos sin problemas reproductivos, con diferente motilidad espermática..... | 38 |
| Figura 11. | Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos con problemas reproductivos con diferente motilidad espermática..... | 38 |
| Figura 12. | Comparación de la reacción acrosomal espontánea en espermatozoides de verracos alojados en confinamiento e intemperie, sin y con problemas reproductivos..... | 39 |
| Figura 13. | Comparación de la reacción acrosomal inducida en espermatozoides de verracos alojados en confinamiento e intemperie, sin y con problemas reproductivos..... | 39 |
| Figura 14. | Reacción acrosomal espontánea en espermatozoides de verracos con diferente propósito zootécnico, sin y con problemas reproductivos..... | 40 |
| Figura 15. | Reacción acrosomal inducida en espermatozoides de verracos con diferente propósito zootécnico, sin y con problemas reproductivos..... | 40 |

I RESUMEN.

El propósito del presente trabajo fue determinar si la evaluación de la reacción acrosomal (RA) es una herramienta para identificar verracos con problemas reproductivos (CPR), sin signos clínicos evidentes, que no fue posible identificarlos mediante la evaluación espermática básica. Para tal efecto se analizaron los registros de producción de 22 granjas, en los cuales se observaron particularmente los indicadores reproductivos de los verracos. De esta manera, se identificaron verracos con baja fertilidad y/o prolificidad. Se obtuvieron muestras de semen de 73 verracos sin y con problemas reproductivos, encontrándose una prevalencia del 30% de animales con estos problemas. En las muestras de semen, se determinó la reacción acrosomal espontánea (RAE) después de un periodo de capacitación, así como la reacción acrosomal inducida (RAI) con progesterona después del mismo periodo de capacitación. Los resultados obtenidos en espermatozoides de verracos CPR, se compararon con los de verracos sin problemas reproductivos (SPR). Al comparar la RAE en ambos grupos de verracos, no se observaron diferencias ($P > 0.05$). Sin embargo, al inducir la RA con progesterona, los espermatozoides de verracos CPR, reaccionaron en menor proporción (6%) comparado con los promedios de verracos SPR (10%) teniendo diferencias estadísticas ($P < 0.01$), lo cual sugiere que los espermatozoides de verracos CPR, presentan una incapacidad para llevar a cabo la RA después de un periodo de incubación con el inductor que pueda impedir así la fertilización de los ovocitos. Estos resultado, sugieren que la RAI puede ser un indicador de verracos CPR. También se analizó el efecto de la raza, edad, tiempo de conservación del semen, motilidad, tipo de alojamiento y propósito zootécnico de los verracos, sin encontrar efecto o asociación alguna con los valores de RA determinados.

1. INTRODUCCION.

En las granjas porcinas se ha incrementado el uso de la inseminación artificial (IA), con el propósito de aprovechar al máximo a los verracos con los que cuentan y disminuir así los costos de producción, que pueden ser elevados si estos animales no son bien utilizados. La adquisición o crianza, manutención y alojamiento, son considerados como gastos para las granjas.

La IA se ha desarrollado por las ventajas sanitarias y de mayor difusión del material genético, el cual se transmitirá a sus descendientes, que pueden llegar a ser de 6000 a 7000 por año con el uso de esta tecnología (Flowers, 1998^a). Por lo tanto, es importante el tener herramientas que indiquen la capacidad reproductiva de los verracos. Para cumplir con lo anterior, en las granjas con centros de IA y en los centros productores de semen, se han implementado técnicas de evaluación espermática que incluyen determinación del volumen eyaculado, concentración, motilidad y morfología. Sin embargo, aunque estas evaluaciones ayudan a decidir el manejo de cada eyaculado, no son suficientes para identificar a verracos con problemas reproductivos (baja fertilidad y/o prolificidad) lo cual representa pérdidas económicas para las granjas. Por tal motivo se hace necesario implementar otras técnicas de evaluación espermática, factibles de llevar a cabo en centros de IA con los objetivos de identificar verracos con problemas reproductivos, y predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

El trabajo que a continuación se presenta, pretende determinar si la RA puede ayudar a identificar verracos con dichos problemas apoyado con las técnicas de evaluación espermática básica.

2. REVISION DE LITERATURA.

2.1. Inseminación artificial y conservación del semen porcino.

El incremento del uso de la IA porcina, en los últimos años ha sido espectacular, estimándose que de los 72 millones de cerdas en el mundo, más del 25 % son inseminadas con esta técnica (Decuadro, 1999), esto debido a las ventajas que representa el utilizar esta tecnología como son: Disminución del número de verracos en la granja, utilización de reproductores de alta calidad genética y valor económico, explotar al máximo el manejo de lotes de cerdas, obtención de porcentajes de fertilidad iguales o superiores a los obtenidos con la monta natural, facilidad en el manejo reduciendo el tiempo y trabajo por monta, un mejor control sanitario y un mayor control de calidad del semen (Decuadro, 1999; Colenbrander *et al.* 1993).

El control de la producción y calidad del semen, es una de las tareas mas comunes del Médico Veterinario Zootecnista y dentro de la cual, se realiza el análisis espermático básico rutinario que incluye la evaluación del volumen, concentración, motilidad y morfoanormalidades en los espermatozoides eyaculados de cada verraco que esta integrado a un programa de IA (Rillo *et al.* 1996; Flowers, 1998^a).

El objetivo mas importante de la evaluación espermática, es el de predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides (Amann y Hammerstedt, 1993) pues tal como lo señalan Castañeda *et al.* (1996) existe la posibilidad de desechar mas rápido un verraco con problemas reproductivos debidos a una baja calidad espermática que se puede detectar con la evaluación espermática básica. Un ejemplo de esto, es el reportado por Flowers, (1998^a) que describe una disminución en la tasa de partos al observar una motilidad espermática menor del 60%, menos del 70% de morfología normal y menos del 75% de acrosomas normales, aunque Woelders (1991) y Chavarria *et al.* (1997^b), reportan que la evaluación *in vitro* de estas características y su correlación con la capacidad fertilizante, en general es baja.

Rillo *et al.* (1996) determinaron una serie de parámetros a partir de los cuales no recomiendan el uso de dosis seminales diluidas y conservadas (cuadro 1).

Cuadro 1. PARAMETROS ESTABLECIDOS PARA NO USAR DOSIS SEMINALES CONSERVADAS

| PARAMETROS. | 24 Horas de conservación. | 48 Horas de conservación. | 72 Horas de conservación. |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Motilidad sin cafeína. | - 10 %. | - 10 %. | 0 |
| Motilidad con cafeína. | - 20 %. | - 10 %. | 0 |
| Acrosomas normales. | - 30 %. | - 30 %. | - 30 % |
| Colas anormales. | > 40 %. | > 40 %. | > 40 %. |
| Gota. Citoplasmica. Próximal | > 50 %. | > 50 %. | > 50 %. |
| Gota. Citoplasmica. Distal. | > 80 %. | > 80 %. | > 80 %. |

Fuente: Rillo *et al.* 1996.

Por otra parte Flowers, (1998^b) describe que los problemas asociados al uso de la IA pueden ser subdivididos en tres áreas: calidad del semen, inseminación y manejo de la hembra en el área de gestación. La calidad del semen incluye, manejo del verraco, recolección y almacenaje del semen, los cuales pueden influir en forma negativa disminuyendo la capacidad reproductiva de los machos al usar IA (cuadro 2). En el área de inseminación, se involucran decisiones asociadas con el tiempo y frecuencia de montas, detección de estros y técnicas de inseminación. Finalmente, en el área de gestación, se involucra el manejo de las hembras después de ser inseminadas, observando principalmente su alojamiento y/o nutrición.

La tasa de partos y el número de lechones al parto, en granjas que utilizan IA, son una fuente de información que ofrece una guía para identificar los “pasos críticos” en los cuales se pueden identificar los problemas reproductivos (Flowers, 1998^b). Con los indicadores anteriores, Campos (1995) y García (1994) describen como verracos con baja prolificidad aquellos que cerdas inseminadas con dosis de éstos, presentaron un bajo tamaño de camada al parto con menos de 10.2 lechones nacidos en cerdas multíparas y menos de 9.3 lechones nacidos en cerdas nulíparas, por otra parte, describen como cerdos con baja fertilidad, aquellos cuyas cerdas inseminadas con dosis dichos verracos, presentaron retorno a estro con una tasa mayor al 15%.

Los factores de tipo ambiental que afectan la productividad de una granja en el área reproductiva son: Salud, manejo y nutrición. En ocasiones estos factores pueden modificar la eficiencia reproductiva de una granja y sin embargo ser poco importantes en otras (Batista, 1998).

Cuadro 2. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA CALIDAD DEL SEMEN CONSERVADO

| Indicador. | Problema. | Frecuencia del problema. |
|--------------------------------|---|--------------------------|
| Tiempo de conservación. | Mas de 72 hrs. | 27/100 |
| Condiciones de almacenamiento. | Temperatura inadecuada. (Ideal 15°C) | 15/100 |
| Calidad del agua. | Presencia de: Bacterias y metales pesados | 12/100 |
| Calidad del diluyente. | pH y Osmolaridad inadecuados | 12/100 |
| Tasa de dilución. | Mayores o menores al rango 1:5 – 1:32 | 10/100 |
| Morfología anormal. | Mas del 20 % | 9/100 |

Adaptado de Flowers, 1998^b.

El impacto que tiene la fertilidad de un verraco sobre el indicador global en eficiencia reproductiva puede ser mayor al de las cerdas, ya que una cerda normal, puede tener una descendencia de hasta 25 lechones por año, mientras que al usar exclusivamente la IA, un verraco puede tener una descendencia de entre 6000 y 7000 lechones por año (Flowers, 1998^a). Por su parte, Colenbrander *et al.* (1993) comentan que con el uso de la IA, un solo verraco puede cubrir hasta 1000 cerdas por año con doble inseminación.

Por lo anterior, tal como lo señalan Ducos *et al.* (1996), es necesario implementar técnicas que ayuden a incrementar el porcentaje de predicción de la capacidad fertilizante de los espermatozoides de cada eyaculado, pudiendo ser una de ellas, la evaluación del acrosoma tal como lo señala Parinaud (1995), quien reporta una correlación entre problemas en la fisiología espermática y problemas en la morfología y motilidad en espermatozoides de verraco, reflejándose en una disminución de su capacidad fertilizante.

2.2. Problemas de fertilidad y evaluación espermática.

Como ya se describió, la IA tiene como ventaja el que los eyaculados pueden ser analizados previamente a su uso. Sin embargo, existen problemas como las aberraciones cromosómicas las cuales no se pueden identificar con la evaluación espermática básica y se presentan en un 3% de los verracos. Se ha demostrado una correlación entre estas anormalidades, con fallas en el desarrollo y la reproducción, existiendo reportes sobre muerte prenatal en cerdos, que sugieren una mortalidad embrionaria del 33% durante el transcurso del primer tercio de la gestación, sin embargo, en México por distintos motivos la aplicación del análisis citogenético en la producción animal no se ha desarrollado (Villagómez, 1998).

En las granjas con centros de IA y centros de producción de semen, la evaluación espermática básica ha sido una herramienta para decidir la utilidad de cada eyaculado y/o dosis seminal conservada. Es importante señalar que el análisis espermático básico no logra identificar daños específicos en la estructura y fisiología espermática que involucren su capacidad fertilizante y solamente lo hace en casos muy evidentes que pongan de manifiesto alteraciones en la morfología y/o motilidad espermática. Las anormalidades morfológicas en los espermatozoides, se han relacionado con problemas de fertilidad, aunque han sido consideradas como normales hasta en un 20%, pudiéndose dividir estas, en alteraciones de la cabeza y alteraciones en la cola (Bonet *et al.* 1993).

Se sabe que alteraciones específicas en la cabeza del espermatozoide y en particular del acrosoma, pueden interferir en los procesos de capacitación y RA (Rillo *et al.* 1996), siendo esta última utilizada por varios investigadores (Jaiswal *et al.* 1998; Esteves *et al.* 1998) como indicador para evaluar el proceso de capacitación espermática.

Las lesiones del acrosoma pueden ser determinadas por la liberación extracelular de hialuronidasa y acrosina, aunque el registro de esta última es complicado y los resultados no pueden ser correlacionados con el porcentaje de acrosomas dañados, por lo que no es un método recomendado. Por otro lado, la integridad del acrosoma puede evaluarse con diversos métodos microscópicos como la técnica de triple tinción, anticuerpos y lectinas conjugadas a marcadores, aunque algunas tienen el inconveniente de dañar células al ser arrastradas para preparar el frotis (Rillo *et al.* 1996).

Woelders (1991) propone la evaluación simultánea de la integridad de la membrana celular y del acrosoma, usando el fluorocromo bisbenzimidaz (Hoechst-33258). Valcárcel *et al.* (1997) recomiendan el uso de lectinas/Hoechst-33258 para evaluar el estado del acrosoma y la integridad celular como un método muy preciso.

Los marcadores de membrana como las lectinas, son sustancias que tienen afinidad por determinados carbohidratos presentes en la membrana espermática. Tras un periodo de incubación, cada lectina presenta afinidad por un carbohidrato específico de tal modo que las variaciones de membrana producirán un cambio en los patrones de unión de las lectinas; por lo que se recomienda este método para estudios de capacitación y RA, Sánchez (1991).

2.3. Estructura espermática.

El espermatozoide es el producto de la gametogénesis en el macho, proceso que ocurre en los tubulos seminíferos del testículo. Estructuralmente está formado por la cabeza, pieza media y flagelo. La cabeza contiene un núcleo haploide grande y muy condensado, rodeado por escaso citoplasma circunscrito a su vez en su parte proximal por la membrana que delimita al acrosoma. Este último organelo de características similares a un gránulo secretor, libera en forma programada las enzimas hidrolíticas, las

cuales, facilitan el proceso de fertilización (cuadro 3). En la pieza media se encuentran las mitocondrias responsables de activar el metabolismo energético celular. El flagelo tiene una estructura semejante a todos los cilios y flagelos, pero con características particulares debidas a la presencia de las fibras densas externas y la cubierta fibrosa (Chavarría *et al.* 1997^a).

La membrana del espermatozoide esta subdividida en regiones denominadas dominios, los cuales presentan diferente composición y función a lo largo de la vida de esta célula. El mayor dominio en la membrana plasmática del espermatozoide de los mamíferos, es la región acrosomal (región apical de la cabeza) y el segundo, la región post-acrosomal (región caudal de la cabeza).

En la cabeza del espermatozoide, la membrana plasmática esta subdividida en tres porciones: segmento apical, ó dominio periférico del acrosoma; segmento principal, de mayor porción del acrosoma y segmento ecuatorial ó dominio posterior. También es identificada una región o dominio entre el segmento ecuatorial del acrosoma y el cuello del espermatozoide. La base posterior, en la unión entre la cabeza y el tallo, es un estrecho paso para el compartimento citoplasmático entre la cabeza y la cola del espermatozoide. Por último, la membrana plasmática del flagelo esta subdividida en tres regiones: tercio medio o región que contiene la vaina mitocondrial, parte principal, que es una vaina fibrosa y la pieza terminal (Eddy y O'Brien, 1994).

El sulfato de colesterol, ha sido identificado como un componente membrana del espermatozoide, y se ha calculado que en el espermatozoide humano, quizá esta presente en un 20 % del acrosoma (Brucker y Lipford, 1995).

Cuadro 3. ENZIMAS PRESENTES EN EL ACROSOMA

Acrosina.
Aрил-amidasa.
Aрил-sulfatasa.
Aspartilamidasa.
Beta-galactosidasa.
Beta-N-Acetil glucosaminidasa.
Calpaina II.
Dipeptidil-peptidasa.
Esterasa.
Fosfatasa ácida.
Fosfolipasa A2.
Fosfolipasas C.
Hialuronidasa.
Nuoraminidasa (sialidasa).
Peptidasa de tipo Catepsina-D.
Peptidasa de tipo colagenasa.

Fuente: Chavarría, et al. 1997^a.

2.4. Capacitación espermática y reacción acrosomal.

La capacitación espermática ocurre fisiológicamente en el tracto reproductivo de la hembra y es la modificación post-eyaculatoria de la superficie espermática. Algunas de éstas modificaciones son el reacomodo gradual de glicoproteínas periféricas y una modificación en la distribución de fosfolípidos que la integran, tras un proceso previo denominado maduración epididimal que ocurre en el tracto reproductivo del macho y en el cual la membrana espermática tuvo modificaciones físicas, como el reacomodo de proteínas intramembranales, y químicas, como la síntesis de colesterol de *novo*, proporcionándole una estabilidad a la membrana que le permite su conducción durante el trayecto hasta el sitio de fertilización. Durante la capacitación, la fluidez de la membrana, se incrementa en la región acrosomal a diferencia de la región ecuatorial y post-acrosomal que permanecen más estables (Yanagimachi, 1994).

Se sabe que muchos estabilizadores de los sulfatos de membranas son removidos durante la capacitación espermática, la cual requiere un aumento en los niveles de Ca_2^+ intracelular que al interactuar con el sulfato de colesterol, origina una inestabilidad membrana iniciando así la RA (Brucker y Lipford, 1995).

La RA es un proceso fisiológico del espermatozoide que ocurre durante el proceso de fertilización, al hacer contacto con la zona pelúcida (ZP) del ovocito, y no en otro sitio del tracto reproductor del macho o la hembra en donde no tiene ninguna función, la que cuando sucede se denomina como reacción acrosomal espontánea y es considerada como un proceso anormal el cual depende de dos tipos de factores: Intrínsecos (genética de los verracos, tiempo de conservación de los espermatozoides en el epidídimo, nutrición, etc.) y extrínsecos (alojamiento de los verracos, composición del diluyente para conservar los espermatozoides, temperatura de conservación, etc.) (Yanagimachi, 1994).

El proceso de RA consiste en la formación de poros que se producen al fusionarse la membrana plasmática y la membrana acrosomal externa del espermatozoide, liberando las enzimas del acrosoma que facilitan la penetración de la ZP del ovocito. Posteriormente, la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa, origina la formación de pseudo vesículas por un proceso similar al de otros sistemas celulares (Yanagimachi, 1994).

In vivo la RA ocurre tras el estímulo adecuado que es recibido al pasar los espermatozoides por las células del cúmulo, fluido folicular y pared de la granulosa (Henkel *et al.* 1998; Mattioli *et al.* 1998; Fabbri *et al.* 1998). Se ha estimado, que las células del cúmulo y el fluido folicular proveen al medio, hasta 1 µg /ml de progesterona, cantidad que se ha considerado como apropiada para inducir la RA en espermatozoides humanos (Osman *et al.* 1989 citados por Brucker y Lipford, 1995). Antes de encontrar al ovocito para la fertilización, dichas células filtran y seleccionan a los espermatozoides potencialmente fértiles, que se unen entonces a la ZP del ovocito mediante receptores membranas, originando la fusión de las membranas y liberación de enzimas acrosomales (Brucker y Lipfor, 1995).

Los datos obtenidos en diferentes especies de mamíferos, sugieren que la RA está regulada por varios mecanismos que involucran diversos receptores de moléculas y proteínas reguladoras, como la progesterona que al interactuar con su receptor en la membrana del espermatozoide, induce el flujo de Ca_{2+} hacia el interior de la célula. La ZP también activa canales de calcio, a través de proteínas G, que en el caso de ser una proteína G_i , esta a su vez estimula a una fosfolipasa C, resultando el rompimiento de polifosfoinositidinas, situadas en la membrana plasmática, originando la producción de diacilglicerol e inositoltrifosfato, este último, incrementa el flujo de Ca_{2+} al interior de la célula y por su parte, el diacilglicerol, activa la proteína Cinasa C y/o fosfolipasa A2 resultando en la producción de los lisofosfolípidos por la fosfolipasa A2. Los lisofosfolípidos junto con el Ca_{2+} intracelular elevado, perturban la membrana acrosomal provocando la fusión membrana y ocasionando la exocitosis acrosomal. Saling (1991), ha propuesto que la proteína tirosinacinasasa esta involucrada en el control de la RA siendo identificada en la superficie del espermatozoide y asociada con la unión inicial a la ZP induciendo la RA (Brucker y Lipfor, 1995).

In vitro, se ha demostrado que la RA puede ser inducida (RAI) con progesterona y 17alfa-hidroxi progesterona, con un bajo efecto citotóxico (Kenneth *et al.* 1994; Parinaud *et al.* 1992.; Fabbri *et al.* 1998), además de un gran numero de sustancias que están en vecindad con el ovocito (Henkel *et al.* 1998; Mattioli *et al.* 1998), así como por la ZP homologa (Berger *et al.* 1989).

2.5. La reacción acrosomal como indicador de fertilidad y/o prolificidad.

Vázquez *et al.* (1993) observaron promedios bajos de RAE (1.5 a 3.5 %) en espermatozoides de cerdos conservados durante 24 horas a 16 °C en un diluyente de larga duración (MR-A). Cuando estos espermatozoides fueron incubados por 40 minutos en medio de capacitación (TCM-199), los promedios de RAE se incrementaron (9 a 10 %). Holt *et al.* (1997) encontraron una correlación negativa entre la RAE determinada *in vitro* en espermatozoides recién eyaculados de verracos fértiles, con altos tamaños de camada.

Berger y Parker (1989), al analizar la RA en espermatozoides de verracos fértiles encontraron una correlación negativa ($r = -0.90$) en espermatozoides recién eyaculados de verracos fértiles y la capacidad de fertilización *in vitro* (FIV) de ovocitos de hámster. Sin embargo, no encontraron correlación con la capacidad de FIV y la RA después de 6 horas de incubación de éstos espermatozoides. También encontraron que un incremento en la RA durante la incubación *in vitro*, no se correlaciona ($r = 0.31$) con la fertilidad *in vivo* de los verracos. Por otro lado, encontraron que los promedios de RA determinados en espermatozoides de verracos fértiles antes de la capacitación espermática (4%) y después de 6 horas de capacitación (25 %), fueron menores en ambos casos a los determinados en espermatozoides de verracos subfértiles (22% y 35% respectivamente).

En otras especies, Meyers (1996) al inducir *in vitro* la RA en espermatozoides de caballos subfértiles, encontró valores inferiores a los inducidos en espermatozoides de caballos fértiles. Centola *et al.* (1997) proponen que la evaluación *in vitro* de la RA en espermatozoides humanos, permite predecir la capacidad fertilizante de cada eyaculado.

2.6. Factores que inhiben la reacción acrosomal.

En condiciones normales, la reproducción del ganado no se lleva a cabo en un ambiente estéril. Gary (1999), menciona que las bacterias son un componente natural en un eyaculado de verraco. En el cuadro 4 se describe una lista de bacterias encontradas en un muestreo de granjas con antecedentes de problemas reproductivos, la mayoría de estas no dan lugar a enfermedades clínicas en el ganado porcino, pero en ciertas circunstancias, estas bacterias pueden ser patógenas para los espermatozoides. El-Mulla *et al.* (1996) y Köhn *et al.* (1998), han encontrado que la RAI *in vitro* en espermatozoides humanos, es significativamente menor en muestras incubadas con *E. Coli*, comparadas con controles, demostrando que esta bacteria, inhibe la inducción de la RA, aunque como lo señalan, existe controversia al referirse a la capacidad fertilizante de eyaculados con presencia de bacterias.

Por otra parte se sabe que existen factores químicos que *in vitro*, pueden alterar la capacidad de RA de los espermatozoides. Kenneth *et al.* (1997), reportan que la inducción de la RA *in vitro* con progesterona, puede ser inhibida por insecticidas organoclorados (Clordane y Endosulfan) y que han sido identificados en leche de mujer, queso de bovino, y pescado.

Cuadro 4. CONTAMINANTES BACTERIANOS ENCONTRADOS EN MUESTRAS DILUIDAS DE SEMEN PORCINO

| Bacteria. | N° De Granjas. |
|---------------------|----------------|
| Aceintobacter spp. | 2 |
| Aeromonas sp. | 2 |
| Alcaligenes sp. | 2 |
| Bacillus sp. | 1 |
| Burkholderia sp. | 4 |
| Comamonas sp. | 1 |
| Citrobacter sp. | 1 |
| Corynebacterium spp | 3 |
| Escherichia coli. | 6 |
| Enterobacter spp. | 7 |
| Klebsiella spp. | 4 |
| Proteus sp. | 3 |
| Providencia sp. | 2 |
| Pseudomonas spp. | 5 |
| Serratia sp. | 4 |
| Estafilococos spp. | 7 |
| Estreptococos spp. | 5 |

Fuente: Gary, (1999).

3. JUSTIFICACION.

En las granjas con centros de IA existen verracos con problemas reproductivos, los cuales, en ocasiones no pueden ser detectados con los métodos tradicionales de evaluación espermática. Ello exige desarrollar técnicas de laboratorio que permitan predecir la capacidad fertilizante de los verracos. Una de estas técnicas novedosas es la determinación de la RA, sin embargo, antes de sugerir su empleo es necesario confirmar su validez.

4. HIPOTESIS.

Dado que la RA es un paso necesario para llevar a cabo el proceso de fertilización, entonces, la capacidad que presenten los espermatozoides eyaculados para experimentar este proceso, puede ser la base para establecer un nuevo indicador de capacidad fertilizante.

5. OBJETIVOS:

5.1. General.

Determinar si existe una correlación entre la RA de los espermatozoides, con la incidencia de verracos CPR.

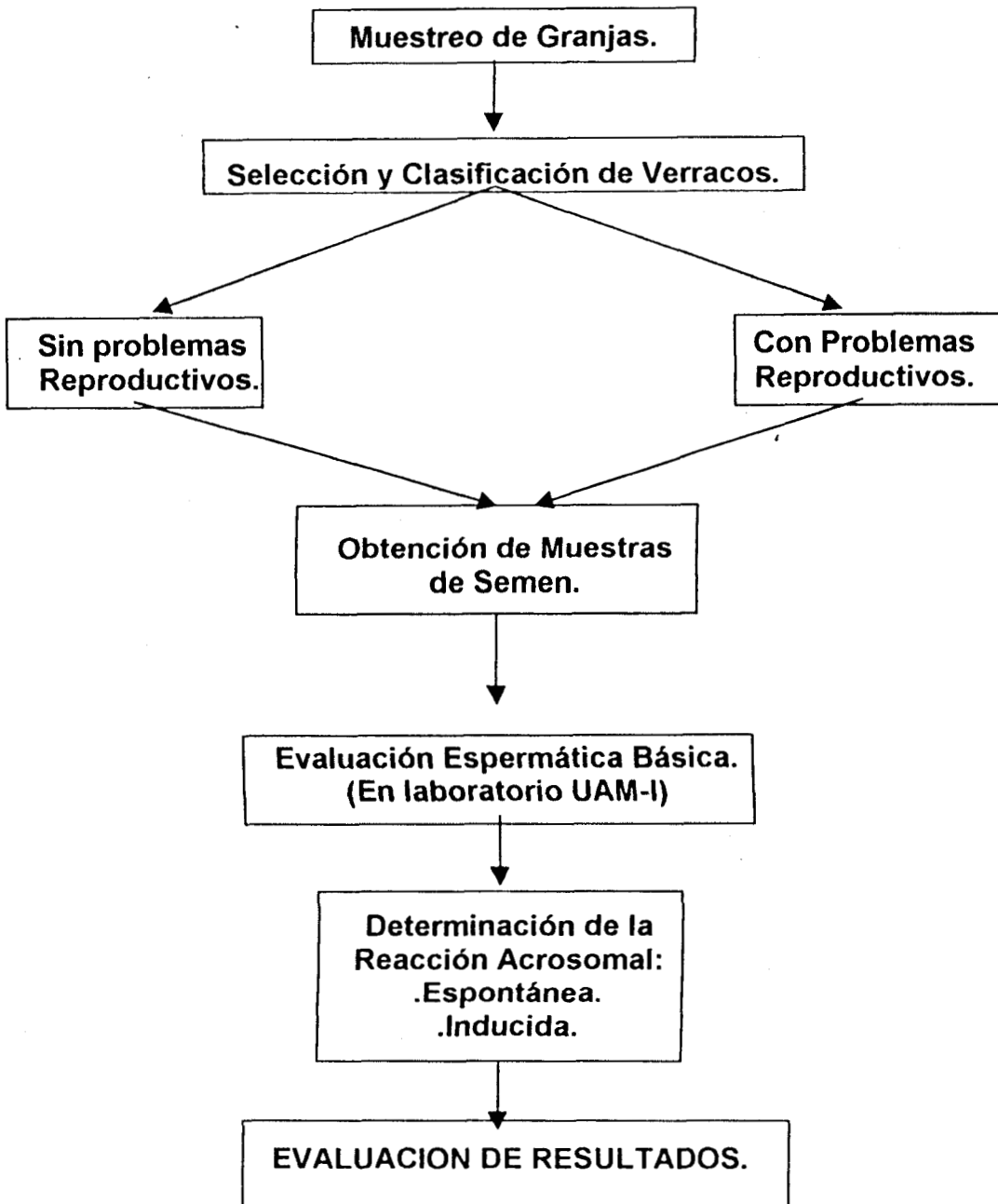
5.2. Particulares.

Evaluar los registros de producción de las granjas, para identificar verracos CPR.

Analizar y comparar los porcentajes de RA espontánea e inducida en espermatozoides de verracos sin y con problemas reproductivos.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo, se realizó bajo un modelo transversal ya que se muestreó cada verraco únicamente una vez y de casos y controles, al muestrear verracos con y sin problemas reproductivos respectivamente (Méndez *et al.* 1997).



7. MATERIAL Y METODOS.

De Febrero a Agosto de 1999, se muestrearon 22 granjas porcinas en distintas zonas del país, con diferente grado de tecnificación y propósito zootécnico (cuadro 5). Se obtuvieron muestras de semen de 73 verracos de diferente edad y raza, integrados a un programa de IA y con su respectivo registro de producción (cuadro 6). Se obtuvieron los eyaculados por el método de la "mano enguantada" filtrándolos a través de una gasa para obtener únicamente la fracción rica y ser analizada mediante la técnica implementada en cada granja. Los eyaculados fueron diluidos a una misma concentración (6×10^9 espermatozoides/100 ml.) y en un mismo diluyente de larga duración (MR-A[®]). Las muestras se transportaron, procurando mantenerlas a temperatura de 15 °C y protegidas de la luz, en cajas de poliuretano hasta el laboratorio de Biología Celular de la UAM-I en donde se evaluaron, procurando que la conservación de las dosis no fuera mayor a 24 horas. Se determinaron los siguientes indicadores en cada una de las dosis: Concentración, motilidad, viabilidad, anormalidades morfológicas como parte de la evaluación espermática básica y para los fines de este trabajo, se determinaron los promedios de RAE y RAI siguiendo la técnica descrita por Berger (1990).

Cuadro 5. LOCALIZACION DE LAS GRANJAS Y NUMERO DE MUESTRAS PROPORCIONADAS

| N° De Granja. | N° De Verracos. | Localización geográfica. | |
|---------------|-----------------|--------------------------|--------------------|
| 1 | 4 | Cuautitlan Izcalli. | Estado de México. |
| 2 | 3 | Villa del Carbón. | Estado de México. |
| 3 | 1 | Villa del Carbón. | Estado de México. |
| 4 | 2 | Visitación. | Estado de México. |
| 5 | 1 | Tepexpan. | Estado de México. |
| 6 | 1 | Zumpango. | Estado de México. |
| 7 | 2 | Zumpango. | Estado de México. |
| 8 | 1 | Atiacomulco. | Estado de México. |
| 9 | 9 | Tecamachalco. | Estado de México.. |
| 10 | 4 | Tecamac. | Estado de México. |
| 11 | 2 | Tepatlixco. | Estado de México. |
| 12 | 2 | Ojo de Agua. | Estado de México. |
| 13 | 1 | Teoloyucan. | Estado de México. |
| 14 | 5 | Chapingo. | Estado de México. |
| 15 | 2 | Calpulalpan. | Tlaxcala. |
| 16 | 13 | Xalmimilulco | Puebla. |
| 17 | 2 | Izucar de Matamoros. | Puebla. |
| 18 | 1 | Tenayuca. | Hidalgo. |
| 19 | 1 | Pachuca. | Hidalgo. |
| 20 | 8 | La Piedad. | Michoacan. |
| 21 | 6 | La Piedad. | Michoacan. |
| 22 | 2 | Poza Rica. | Veracruz. |

Cuadro 6. CARACTERISTICAS DE LOS VERRACOS

| Indicador. | Raza. (genética de los verracos) | N° Verracos. | Intervalo de Edades (meses). |
|---------------------------------------|-------------------------------------|--------------|---------------------------------|
| Verracos Sin Problemas Reproductivos. | Landrace. | 13 | 8 – 60 |
| | Duroc. | 11 | 13 – 29 |
| | Yorkshire. | 10 | 11 – 30 |
| | Hampshire. | 5 | 8 – 46 |
| | Pietraen. | 3 | 12 – 24 |
| | Sigherz (Línea). | 2 | 24 – 48 |
| | Duroc X Pietraen (F1). | 4 | 15 – 42 |
| | Hampshire X Duroc (F1). | 1 | 24 – 24 |
| Yorkshire X Landrace (F1). | 2 | 9 – 12 | |
| Verracos Con Problemas Reproductivos. | Landrace. | 8 | 8 – 36 |
| | Duroc. | 1 | 36 – 36 |
| | Yorkshire. | 5 | 24 – 36 |
| | Hampshire. | 1 | 22 – 22 |
| | Pietraen. | 2 | 17 – 42 |
| | Sigherz (Línea). | 2 | 36 – 36 |
| | Duroc X Pietraen (F1). | 2 | 18 – 28 |
| Hampshire X Duroc (F1). | 1 | 18 – 18 | |
| Total. | | 73 | 7 – 60 |

7.1. Selección y clasificación de verracos.

La selección de los verracos, se realizó considerando aquellos que cumplieran los siguientes criterios: estar integrados en un programa de IA, contar con un registro de producción, y no mostrar signos clínicos de alguna patología. La clasificación se hizo analizando sus indicadores reproductivos mediante los registros de producción de la granja de procedencia. Considerando los indicadores descritos por García (1994) y Campos (1995) fueron clasificados como verracos CPR aquellos con baja fertilidad y/o prolificidad y verracos SPR aquellos sin estos antecedentes. Se evaluaron datos de por lo menos cuatro meses anteriores a la fecha en la que se obtuvo la muestra. En seis casos de verracos jóvenes (11 meses de edad o menos) únicamente se consideró el indicador de fertilidad (cerdas en gestación).

7.2. Evaluación espermática básica.

Motilidad.- Se determinó por observación directa al microscopio óptico a 200 aumentos para estimar el porcentaje de espermatozoides en movimiento a 37°C.

Concentración.- Se determinó la concentración espermática, al microscopio óptico con una cámara para contar glóbulos sanguíneos.

Viabilidad.- Se diluyó la muestra con eosina-nigrosina (3:1) haciendo un frotis y secando a 37°C, se observaron al microscopio 100 células a 400 aumentos para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos (no teñidos) y el porcentaje de espermatozoides muertos (teñidos).

Anormalidades morfológicas.- En los frotis con eosina-nigrosina, se determinó el porcentaje total de espermatozoides con presencia de gota citoplasmica próximal y distal, cola partida, en látigo y enrollada, por cada cien espermatozoides observados al azar.

7.3. Determinación de la reacción acrosomal.

Lavado y Capacitación Espermática.

Debido a la necesidad de utilizar conservadores para las muestras de semen y a la presencia de factores descapacitantes en el plasma seminal del verraco descritos por Bonilla *et al.* (1996); fue necesario lavar las muestras. Para ello, se depositaron 1.5 ml de semen diluido (6×10^9 espermatozoides/100 ml) en un tubo para centrifuga con 2 ml de medio TALP-H a 39°C, y se centrifugó a 350 g por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 1 ml de medio TALP-H a 39°C. Una vez lavados los espermatozoides, se capacitaron siguiendo la técnica descrita por Bonilla *et al.* (1994). Se tomaron dos alícuotas de 100 μ l cada una, con aproximadamente 9×10^6 espermatozoides, y se depositaron en pozos de una caja de plástico (Nunc Denmark®) con 0.9 ml de medio de capacitación TALP-H y se incubó a 39°C por cuatro horas en atmósfera de CO₂ y oscuridad.

Inducción y Determinación de la Reacción Acrosomal.

Después de capacitados los espermatozoides, la inducción y determinación de la RA se realizó según la técnica descrita por Berger (1990), adicionando 20 μ l de una solución de progesterona (500 μ g/ml en solución de PBS) a uno de los dos pozos con la muestra de semen, para tener una concentración final de 10 μ g de progesterona por pozo é incubando nuevamente a 39°C por 15 minutos en atmósfera de CO₂ y oscuridad.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, con progesterona, se adicionaron a cada pozo 10 μ l de una solución de Hoechst-33258 (100 μ g/1ml en PBS) para tener una concentración final de 1 μ g/pozo. Se incubó nuevamente a 39°C por 8 minutos en atmósfera de CO₂ y oscuridad. De cada pozo, se tomaron alícuotas de 100 μ l de la solución de espermatozoides y se depositaron en tubos Eppendorf (de 500 μ l) con 300 μ l de una solución de polivinilpirrolidona-40 al 2% en PBS (PVP-40) a 39°C y se centrifugaron a 600 g por 10 minutos. Se corto cada tubo por encima del paquete

celular para asegurar la eliminación del Hoechst-33258 y el resto del sobrenadante, se retiró con una pipeta. Los espermatozoides se fijaron adicionando 50 µl de etanol frío y se resuspendieron suavemente, dejándolos reposar 5 minutos en la oscuridad. Se hicieron preparaciones microscópicas, dejando secar por 18 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente se les adicionaron 20 µl de una solución de lectina PSA-FITC (20 µg/ml en PBS), se colocó un cubreobjetos y se incubó a 39°C por 8 minutos en atmósfera húmeda y oscuridad. El cubreobjetos, fue removido lavando con agua destilada para eliminar el exceso de lectina y se dejó secar a 30 °C en oscuridad.

Se depositaron 15µl de glicerol al 90% y se colocó un cubreobjetos esperando a que se expandiera por completo el glicerol para evaluar la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides en un microscopio de epifluorescencia a 360 nm. El estado del acrosoma de los espermatozoides vivos en el mismo campo microscópico, se evaluó a 495 nm analizando 200 espermatozoides por preparación a 400 aumentos. Fueron considerados como espermatozoides con RAI aquellos que presentaban de manera simultánea integridad de la membrana y ausencia de la membrana plasmática en la región acrosomal. La RAE fue determinada de igual manera y después de 4 horas de capacitación en ausencia del inductor.

7.4. Influencia de variables ajenas a la calidad espermática en la reacción acrosomal.

Para determinar si el tipo de alojamiento de los verracos, influyó en los valores de RA, se formaron dos grupos. Aquellos alojados en "confinamiento total" (con tan solo ventanas operadas manualmente para su ventilación) y aquellos que estaban en contacto con la intemperie expuestos a cambios bruscos de temperatura y corrientes de aire comparando los valores determinados en cada grupo.

También se intentó determinar si el propósito zotécnico de cada verraco, influyó en los valores de RA. Para ello, se compararon los valores en espermatozoides de verracos productores de cerdos para "engorda" (destinados a rastro), contra los de verracos productores de cerdos para pié de cría (destinados a futuros reproductores).

8. ANALISIS ESTADISTICO.

Las variables registradas que pudieron influir en este trabajo, fueron analizadas de manera individual e independiente como lo describe el siguiente modelo:

$$Y_i = \alpha + \beta x_i + e_i$$

Donde:

Y_i Es la RA espontánea ó inducida en espermatozoides de verracos sin o con problemas reproductivos.

i Puede ser $1,2,3,4,5,6$

X_1 Es el efecto de la raza en la RA.

X_2 Es el efecto de la edad de los verracos en la RA.

X_3 Es el efecto del tiempo de conservación del semen en la RA.

X_4 Es el efecto de la motilidad espermática en la RA.

X_5 Es el efecto del tipo de alojamiento en la RA.

X_6 Es el efecto del propósito zootécnico en la RA.

$e_{1,2,3,4,5,6}$ Son los errores aleatorios desconocidos para cada variable que se distribuyen $N I (0, \delta^2)$.

α y β Son respectivamente ordenada al origen y pendiente de la relación entre variables.

Los valores de motilidad y viabilidad espermática en muestras de verracos sin y con problemas reproductivos, se compararon mediante la prueba de comparación de medias "t de Student" para muestras apareadas (Rodríguez, 1991).

La comparación de los porcentajes de RAE y RAI en los espermatozoides de verracos sin y con problemas reproductivos, se realizó con la prueba de comparación de medias "t de Student" para muestras apareadas (Rodríguez, 1991).

Para determinar si los valores determinados de RAE y RAI fueron influenciados por la raza de los verracos, se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) para grupos con diferente número de repeticiones por tratamiento (cada raza se consideró como un tratamiento y cada verraco de una misma raza como una repetición). De acuerdo con los resultados obtenidos con el ANDEVA para determinar la influencia de las razas y cruza, se realizó la prueba de comparación de medias de "Sheffe" (Rodríguez, 1991).

Se determinaron los coeficientes de correlación entre los valores determinados de RA, con la edad de los verracos, horas de conservación del semen y motilidad espermática (Rodríguez, 1991).

Por último, se realizó un análisis de covarianza factorial con diferente número de repeticiones para determinar si el tipo de alojamiento y propósito zootécnico de cada verraco, influyó en los valores de RA determinados (Rodríguez, 1991).

En las figuras se representan valores promedio, sin embargo, para hacer el análisis estadístico se consideraron los valores individuales de cada caso.

9. RESULTADOS.

9.1. Prevalencia de problemas reproductivos en verracos.

En cada granja se muestreó el total de verracos que cumplieron con las características descritas en la metodología. Se analizaron 73 en total, de los cuales 51 fueron SPR, estos tenían una edad que oscilaba entre los 8 y 60 meses; en los 22 verracos restantes que mostraron antecedentes de problemas reproductivos, las edades oscilaron entre los 8 y 42 meses. De esta manera, se encontró una prevalencia del 30% de verracos CPR (cuadro 7)

Cuadro 7 . PREVALENCIA DE VERRACOS CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS

| Variable. | Frecuencia. | % |
|---------------------------------------|-------------|-----|
| Verracos sin problemas reproductivos. | 51 | 70 |
| Verracos con problemas reproductivos. | 22 | 30 |
| Total. | 73 | 100 |

9.2. Evaluación espermática básica.

Al comparar la motilidad y viabilidad espermáticas en verracos SPR y CPR, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) (cuadro 8). De igual manera, no se observaron diferencias al comparar la morfología espermática (cuadro 9). De manera que con estas evaluaciones, no fue posible distinguir el eyaculado de verracos CPR, excepto en un caso que presentó 45 % de gota citoplásmica distal.

Cuadro 8. COMPARACION DE LA MOTILIDAD Y VIABILIDAD ESPERMATICA EN LOS GRUPOS DE VERRACOS

| Variable. | Espermatozoides de verracos sin problemas Reproductivos. | | | Espermatozoides de verracos con problemas reproductivos. | | |
|-----------------------------|--|-------|-----------------|--|-------|-----------------|
| | \bar{X} | \pm | D.E. | \bar{X} | \pm | D.E. |
| % Motilidad ^a . | 78 | | 13 ^a | 77 | | 12 ^a |
| % Viabilidad ^b . | 96 | | 3 ^a | 94 | | 5 ^a |

^{a,b} P > 0.05

Cuadro 9. COMPARACION DE LA MORFOLOGIA ESPERMATICA EN LOS GRUPOS DE VERRACOS

| % de Anormalidades. | Verracos SPR. | | | Verracos CPR. | | |
|----------------------|-----------------------|------|----|-----------------------|------|-----|
| | N° de eyaculados con: | | | N° de eyaculados con: | | |
| | GCP. | GCD. | DC | GCP. | GCD. | DC. |
| 1 | 2 | 2 | 8 | 1 | 1 | 3 |
| 2 | 3 | 0 | 12 | 1 | 0 | 5 |
| 3 | 3 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 5 | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 | 3 |
| 12 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 30 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 45 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| % Total de muestras. | 16 | 4 | 59 | 14 | 9 | 64 |

SPR. Sin problemas reproductivos, CPR. Con problemas reproductivos,
GCP. Gota citoplasmica proximal, GCD. Gota citoplasmica distal,
DC. Daño en la cola.

9.3. Determinación de la reacción acrosomal.

Los patrones de tinción encontrados en espermatozoides sin RA, mostraron una fluorescencia intensa y homogénea en la región acrosomal y con menor intensidad de la región ecuatorial hacia la región distal. En los espermatozoides con RA, la intensidad de fluorescencia en la región acrosomal fue tenue y claramente diferente de la región ecuatorial que también presentó fluorescencia tenue (figura 1).

Al comparar los porcentajes de RAE en espermatozoides de verracos SPR y CPR, no existió diferencia estadística ($P > 0.05$). Se observó además, una distribución de los valores determinados de RAE entre 2% y 10% en espermatozoides de verracos SPR y de entre 1% a 8% en espermatozoides de verracos CPR. Al inducir la RA, se encontraron diferencias al comparar los porcentajes de cada grupo ($P < 0.01$). La distribución de los porcentajes de RAI en espermatozoides de verracos SPR, fue de 5% a 20%, y para espermatozoides de verracos CPR de 3 a 10% (figura 2).

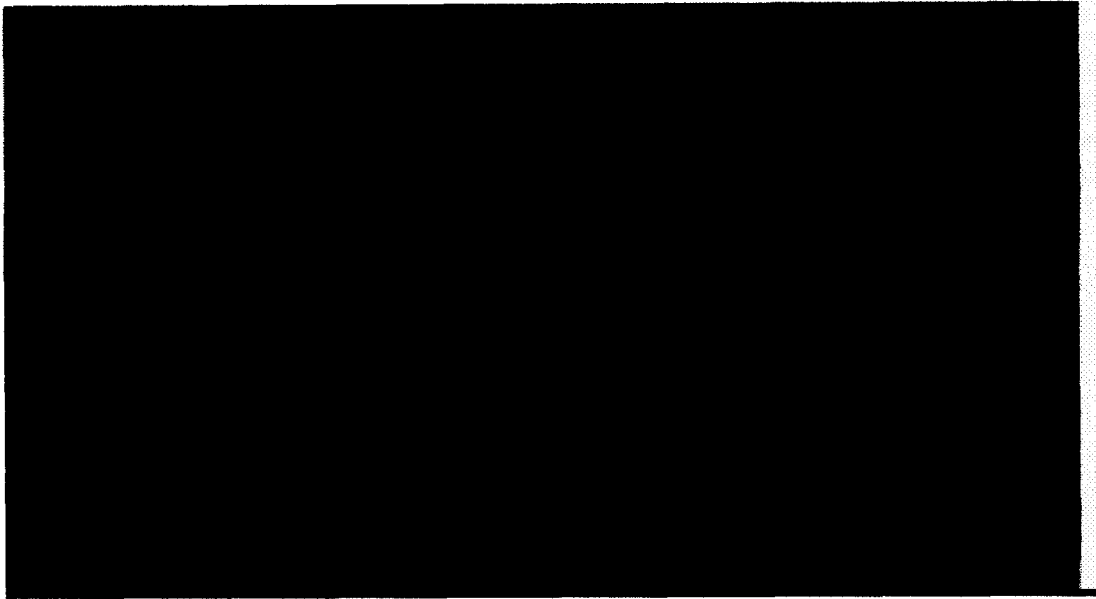
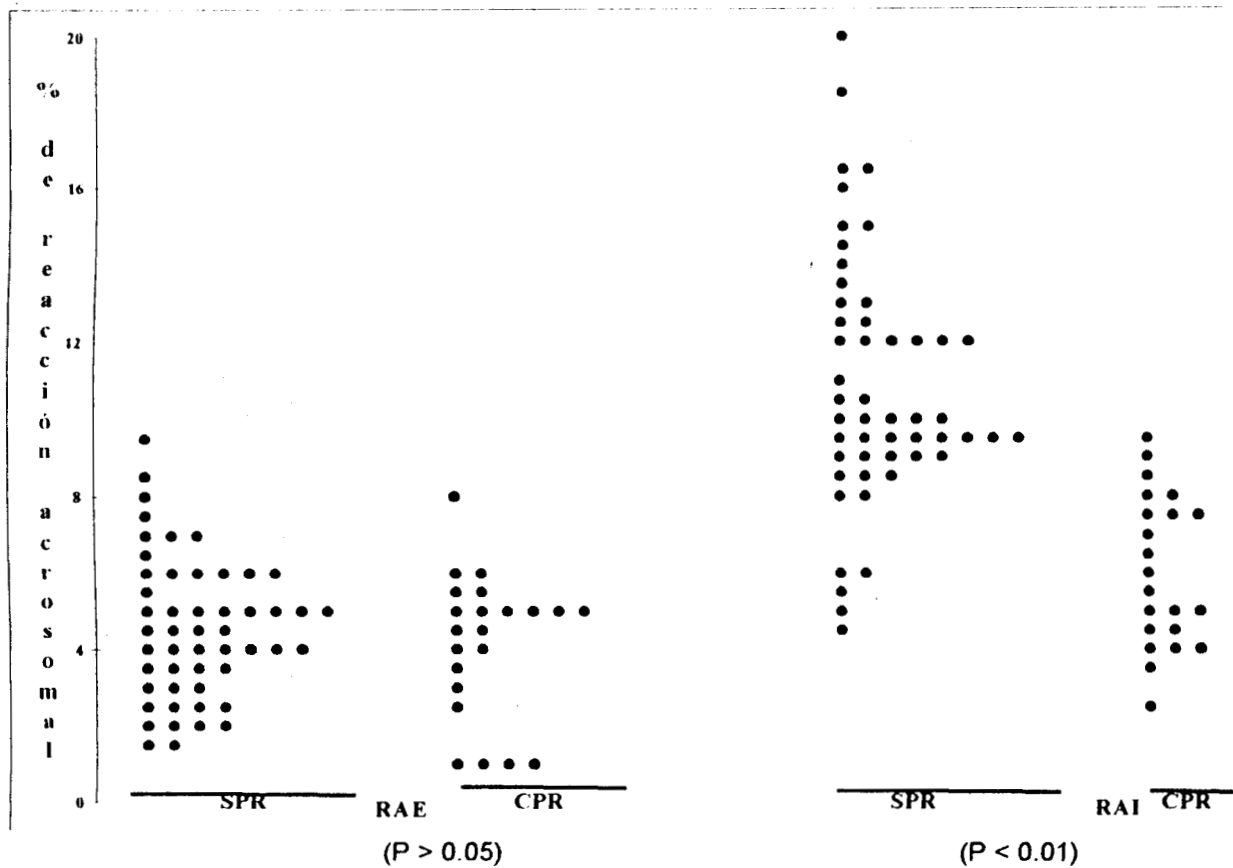


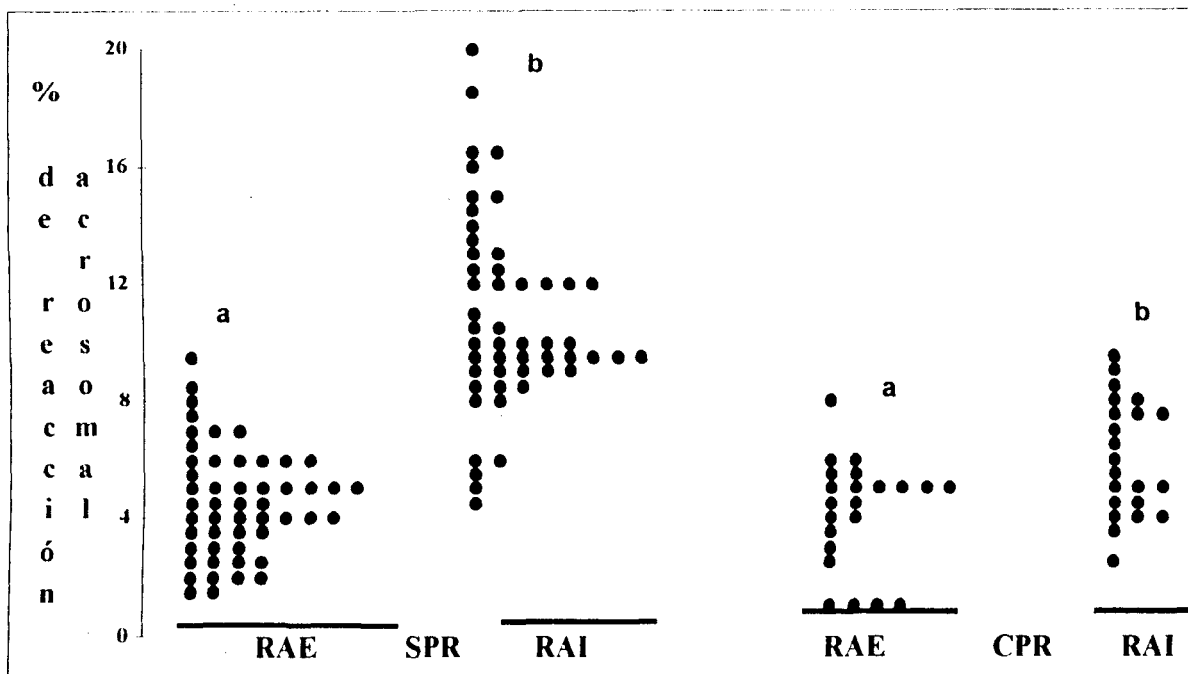
Figura1 PATRONES DE FLUORESCENCIA EN ESPERMATOZOIDES SIN Y CON REACCION ACROSOMAL. IZQUIERDA: ESPERMATOZOIDE SIN RA, PRESENTA FLUORESCENCIA INTENSA EN LA REGION ACROSOMAL, DONDE DESTACA EN LA PARTE APICAL UNA CUÑA, MIENTRAS LA FLUORESCENCIA ES MENOS INTENSA EN LA REGION CAUDAL DE LA CABEZA. DERECHA: ESPERMATOZOIDE CON RA, LA FLUORESCENCIA ES MENOS INTENSA EN LA REGION APICAL AL PERDERSE EL ACROSOMA Y SE DISTINGUEN CLARAMENTE LAS REGIONES ECUATORIAL Y POSTECUATORIAL



SPR. Sin problemas reproductivos. CPR. Con problemas reproductivos.
RAE. Reacción acrosomal espontánea. RAI. Reacción acrosomal inducida.

Figura 2. DISTRIBUCION DE LOS PORCENTAJES DE REACCION ACROSOMAL DETERMINADOS EN ESPERMATOZOIDEOS DE VERRACOS SIN Y CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS

Por otra parte, al comparar los promedios de RAE y RAI en espermatozoides de verracos SPR y CPR, en ambos se encontró un incremento de la RAI con diferencia estadística ($P < 0.01$) (figura 3)



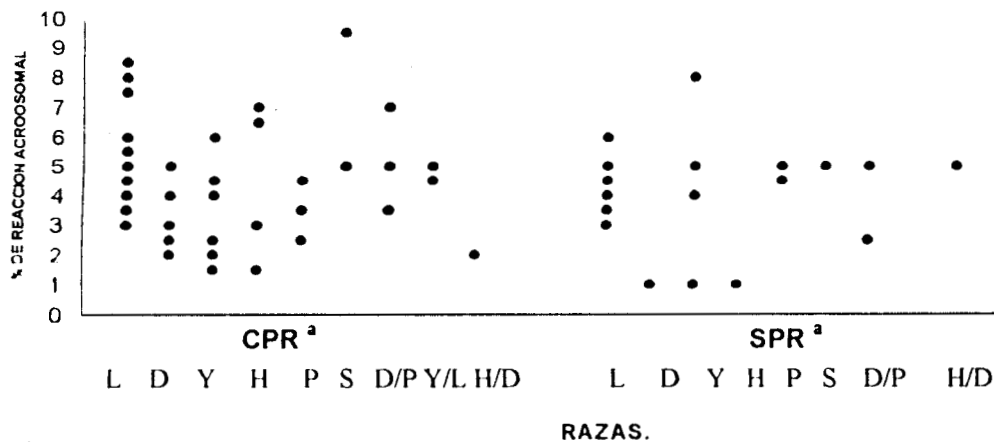
^{a,b} Literales distintas dentro de grupos, indican diferencia estadística ($P < 0.01$)

SPR. Sin problemas reproductivos. CPR. Con problemas reproductivos.
RAE. Reacción acrosomal espontánea. RAI. Reacción acrosomal inducida.

Figura 3. COMPARACION DE LA REACCION ACROSOMAL ESPONTANEA E INDUCIDA EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS DEL MISMO GRUPO

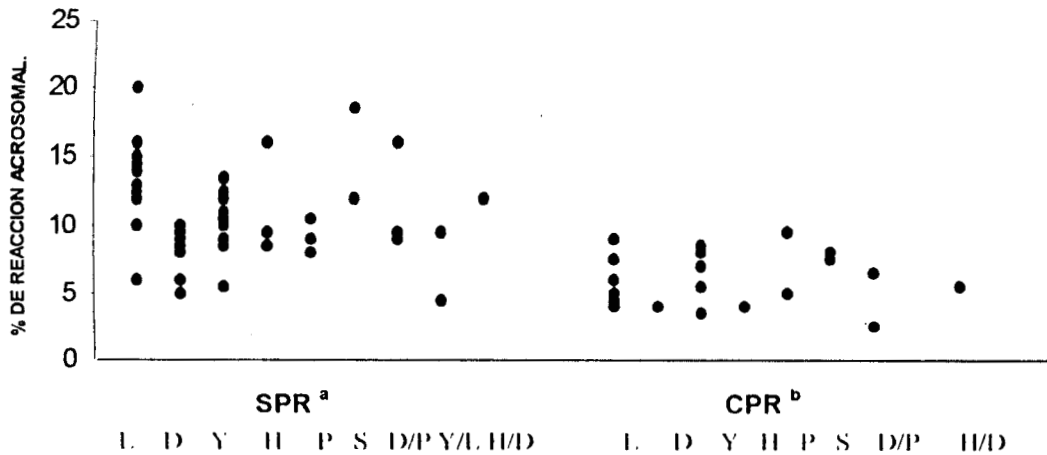
9.4. Efecto de la raza en la reacción acrosomal.

La raza no influyó en los promedios de RAE determinados ($P > 0.05$) (figura 4). Tampoco en la RAI en espermatozoides de verracos CPR ($P > 0.05$), sin embargo en espermatozoides de verracos SPR, se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.01$) (figura 5). En las figuras se muestra que la dispersión de los valores de RAE y RAI en espermatozoides de verracos de diferente raza fue muy amplia. La diferencia estadística encontrada fue solamente en la comparación entre las razas Landrace y Duroc. Sin embargo, esta diferencia se encontró a nivel centesimal (Diferencia Mínima significativa 4.67 y Diferencia Entre Medias 4.66) lo cual indica que otros factores independientes de la raza, pudieron estar involucrados para que se presentara esta diferencia.



^a No mostraron diferencias significativas (P > 0.05)

FIGURA 4. DISTRIBUCION DE LOS PORCENTAJES DE REACCION ACROSOMAL ESPONTANEA EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS DE DIFERENTE RAZA, SIN Y CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS



^a Los verracos sin problemas reproductivos (SPR) mostraron diferencias significativas (P < 0.01)

RAZA

^b los verracos con problemas reproductivos (CPR) no mostraron diferencias (P > 0.05)

Figura 5. DISTRIBUCION DE LOS PORCENTAJES DE REACCION ACROSOMAL INDUCIDA EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS DE DIFERENTE RAZA, SIN Y CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS

9.5. Efecto de la edad de los verracos en la reacción acrosomal.

No se encontró una correlación entre la edad de los verracos SPR con los promedios de RAE ($r = 0.01$) y RAI ($r = 0.34$) (figura 6). Tampoco se encontró una correlación entre la edad de los verracos CPR, con los promedios de RAE ($r = 0.15$) y RAI ($r = 0.20$) (figura 7). Los valores de "r" determinados, mostraron una clara tendencia a cero, indicando que no existió una correlación entre estas variables.

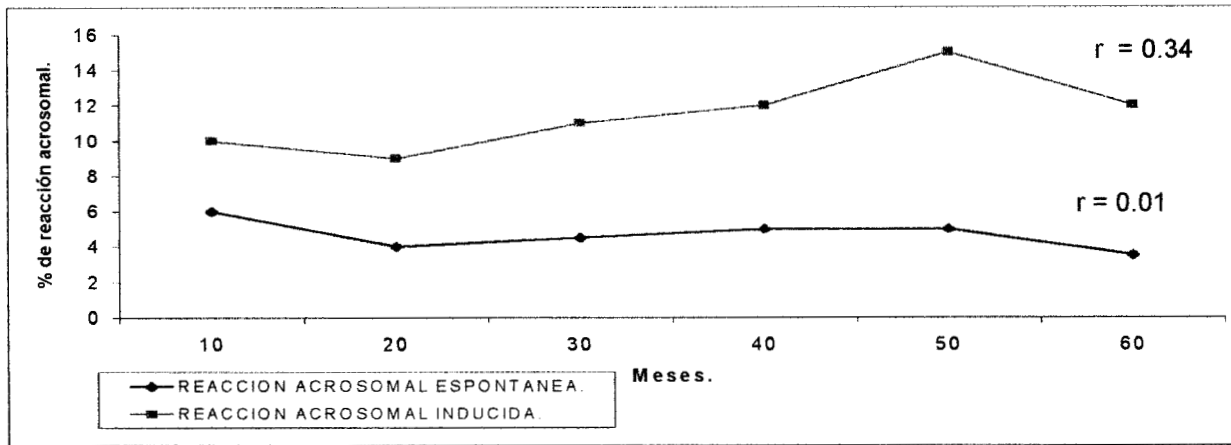


Figura 6. REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS DE DISTINTAS EDADES, SIN PROBLEMAS REPRODUCTIVOS

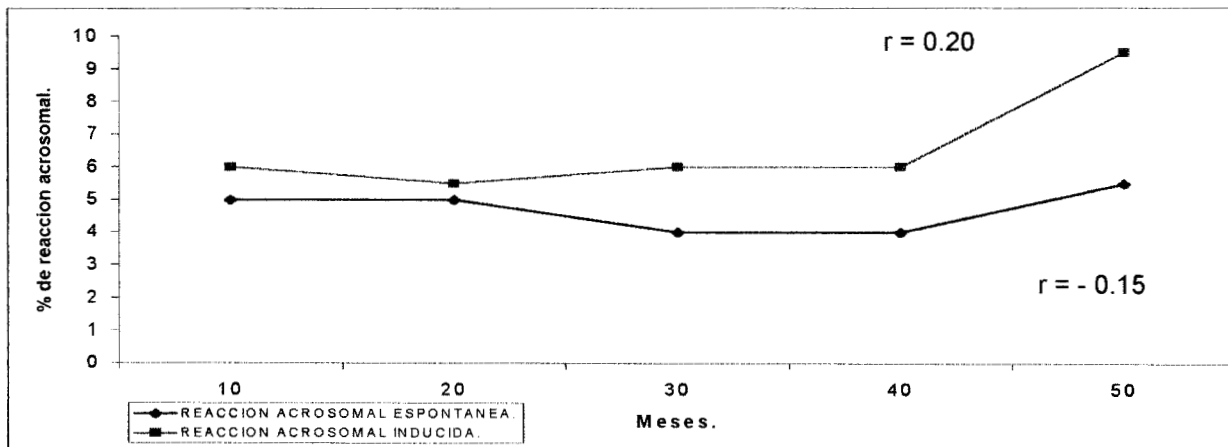


Figura 7. REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS DE DISTINTAS EDADES, CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS

9.6. Efecto del tiempo de conservación del semen en la reacción acrosomal.

El valor de "r" determinado al correlacionar las horas de conservación del semen de verracos SPR con los promedios de RAE ($r = 0.07$) y RAI ($r = 0.27$), no mostraron una interacción entre estas variables (figura 8). De igual manera, al correlacionar las horas de conservación del semen de verracos CPR y los promedios de RAE ($r = - 0.30$) y RAI ($r = 0.09$), el valor de "r" no mostró una interacción entre estas variables (figura 9).

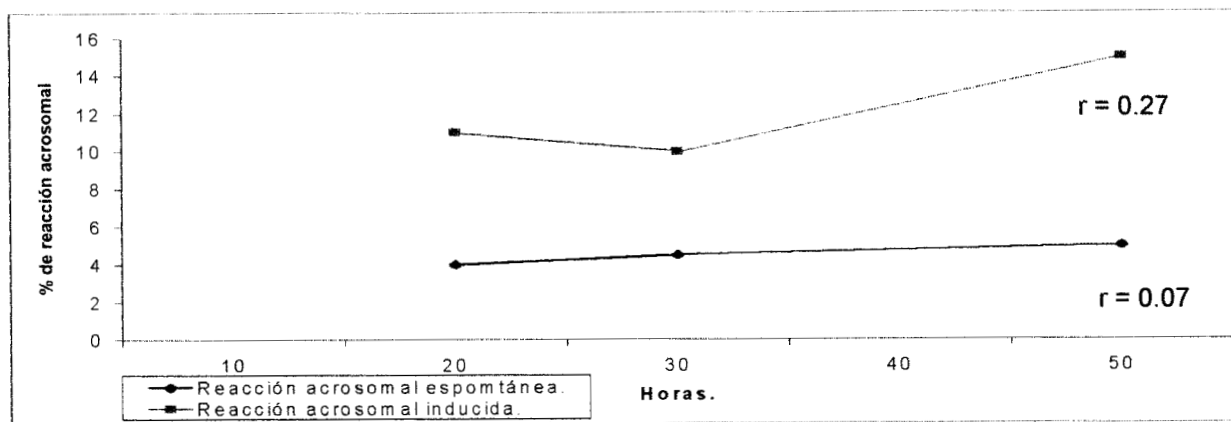


FIGURA 8. REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS SIN PROBLEMAS REPRODUCTIVOS, CON RESPECTO A LOS TIEMPOS DE CONSERVACION DEL SEMEN

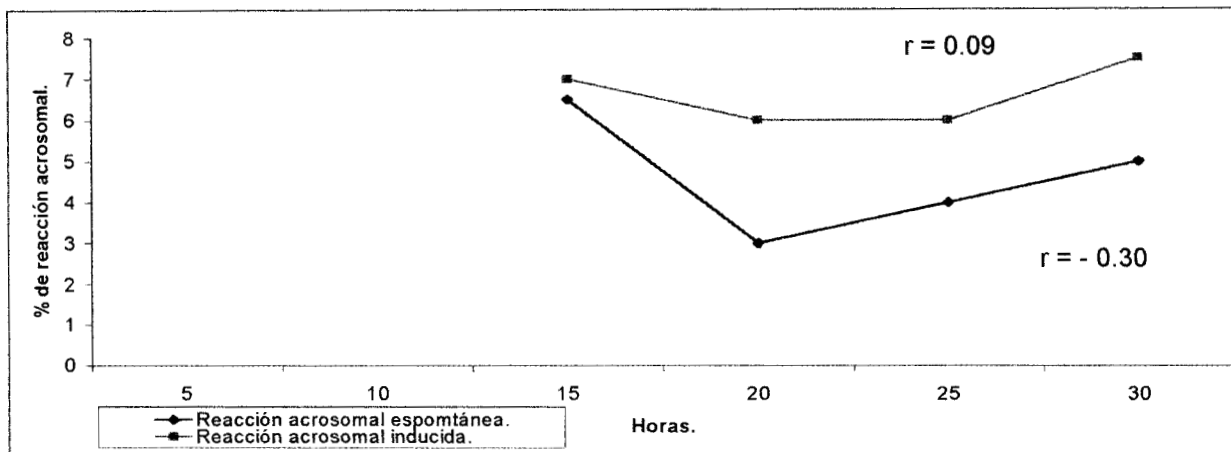


Figura 9. REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS, CON RESPECTO A LOS TIEMPOS DE CONSERVACION DEL SEMEN

9.7. Correlación entre la motilidad espermática y la reacción acrosomal.

Los porcentajes de motilidad espermática en las muestras de verracos SPR, no estuvieron correlacionados con la RAE ($r = 0.14$) y RAI ($r = -0.04$) en este grupo (figura 10). De igual manera, no se encontró una correlación con los promedios de RAE ($r = 0.17$) y RAI ($r = 0.07$) determinados en espermatozoides de verracos CPR (figura 11).

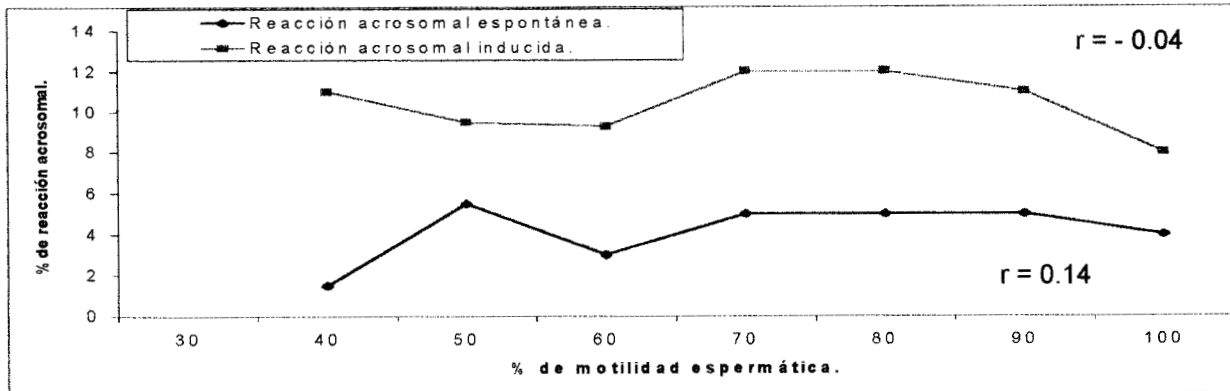


Figura 10. REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDEOS DE VERRACOS SIN PROBLEMAS REPRODUCTIVOS, CON DIFERENTE MOTILIDAD ESPERMATICA

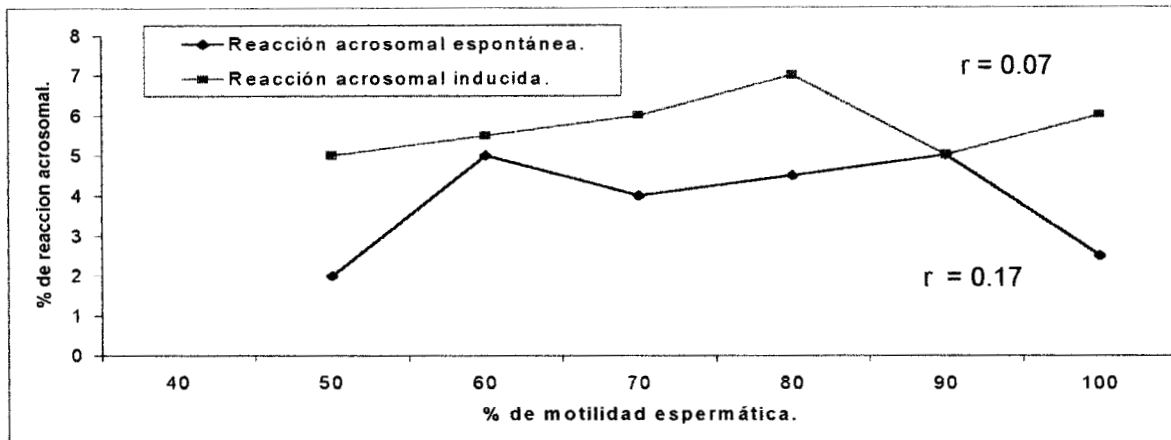


Figura 11. REACCION ACROSOMAL EN ESPERMATOZOIDEOS DE VERRACOS CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS CON DIFERENTE MOTILIDAD ESPERMATICA.

9.8. Efecto del tipo de alojamiento en la reacción acrosomal.

Al determinar si el tipo de alojamiento de los verracos, influyó en los porcentajes de RA no se encontraron diferencias entre los valores de RAE ($P > 0.05$) (figura 12) y RAI ($P > 0.05$) (figura 13).

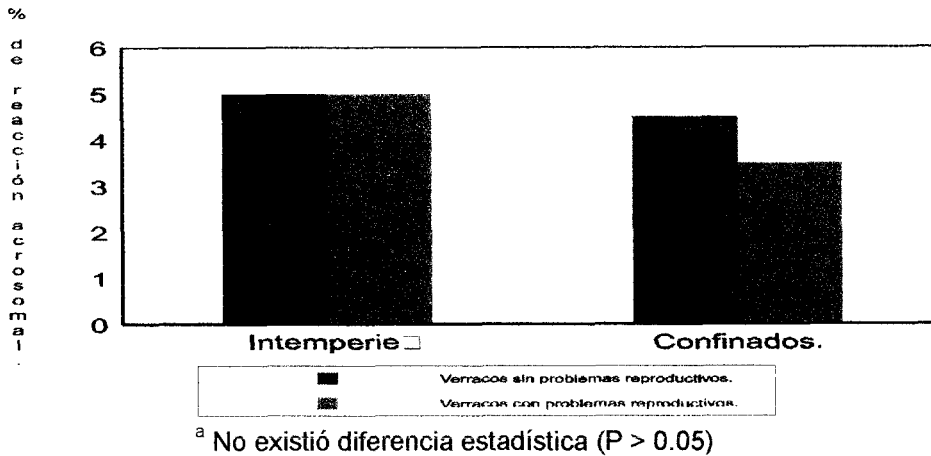


Figura 12. COMPARACION DE LA REACCION ACROSOMAL ESPONTANEA EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS ALOJADOS EN CONFINAMIENTO E INTEMPERIE, SIN Y CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS^a

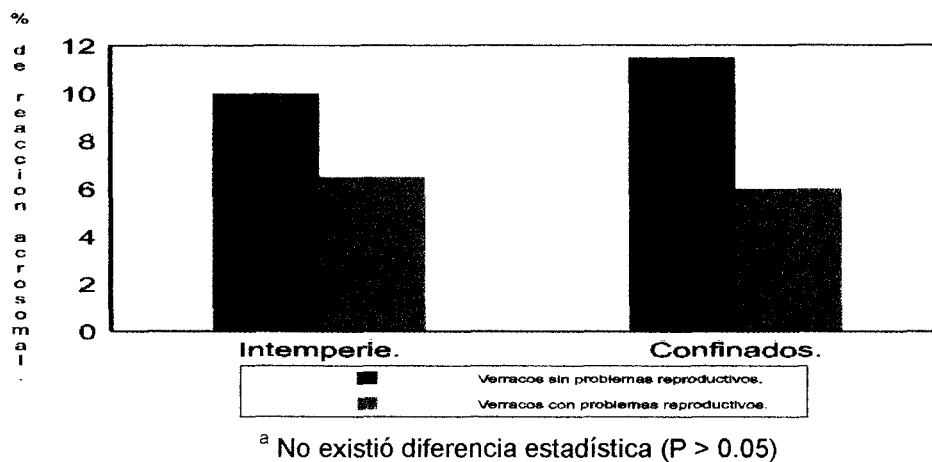
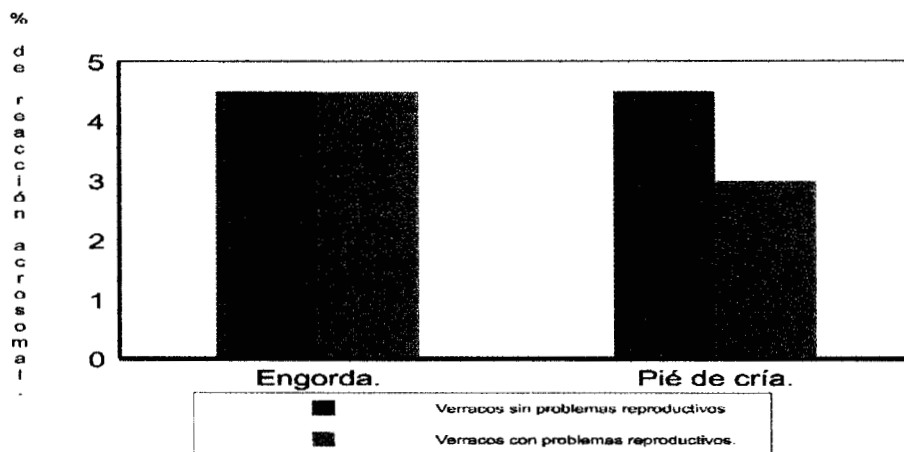


Figura 13. COMPARACION DE LA REACCION ACROSOMAL INDUCIDA EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS ALOJADOS EN CONFINAMIENTO E INTEMPERIE, SIN Y CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS^a.

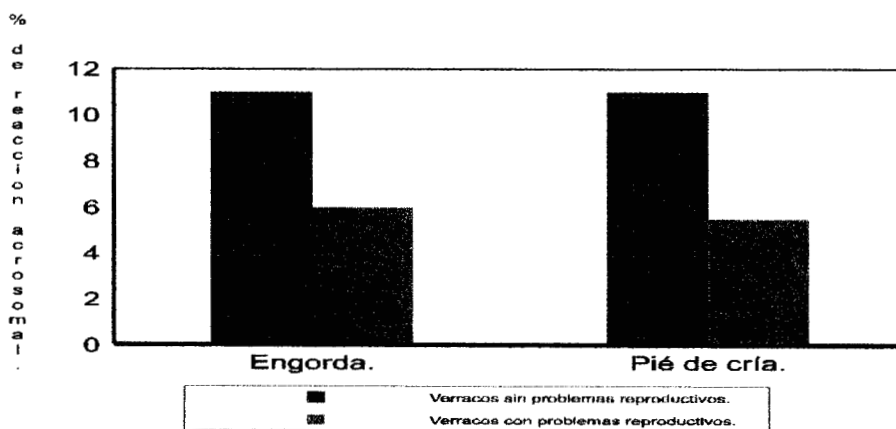
9.9. Efecto del propósito zootécnico de los verracos en la reacción acrosomal.

Por último, no se encontró que el propósito zootécnico haya influido en los valores de RAE ($P > 0.05$) (figura 14) y de RAI ($P > 0.05$) (figura 15) determinados en cada grupo formado según el propósito zootécnico (producir cerdos para pié de cría ó producir cerdos destinados a la engorda).



^a No existió diferencia estadística ($P > 0.05$)

Figura 14. REACCION ACROSOMAL ESPONTANEA EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS CON DIFERENTE PROPOSITO ZOOTECNICO, SIN Y CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS ^a



^a No existió diferencia estadística ($P > 0.05$)

Figura 15. REACCION ACROSOMAL INDUCIDA EN ESPERMATOZOIDES DE VERRACOS CON DIFERENTE PROPOSITO ZOOTECNICO, SIN Y CON PROBLEMAS REPRODUCTIVOS ^a

10. DISCUSION.

10.1. Evaluación espermática básica.

Los factores que influyen en los verracos alterando la producción y calidad espermática pueden clasificarse en: Endógenos (genética, edad, tamaño testicular, etc.) y exógenos (temperatura ambiental, nutrición, frecuencia de eyaculado, etc.) (Levis, 1999). Por tal motivo, es importante tratar de identificar hasta que grado pueden alterar la calidad espermática. Sin embargo no es factible evaluar todos por los recursos y el tiempo requerido. A pesar de ello, en las granjas con centros de IA y en los centros de producción de semen, se ha tratado de determinar la capacidad fertilizante de cada eyaculado ó dosis conservada, para decidir su utilización. Bonet *et al.* (1993^a) reportaron que la concentración, motilidad, viabilidad y morfología espermática normal, son los principales indicadores, para decidir la utilidad de cada eyaculado y/o dosis conservada.

Es importante destacar que la técnica básica de evaluación espermática solo proporciona la información esencial para tomar decisiones sobre el uso de los eyaculados y/o dosis seminales conservadas. Esto es evidente en este trabajo, ya que las dosis seminales de verracos SPR y aún de verracos CPR estuvieron dentro de los parámetros de uso que Rillo *et al.* (1996) describen. Sin embargo, las muestras de verracos CPR fueron clasificadas en este grupo por sus antecedentes de baja fertilidad y/o prolificidad. Es evidente que estos datos no solo son efecto de los verracos, por lo que se sugiere utilizar técnicas que permitan predecir la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

En casos muy evidentes como el encontrado en espermatozoides de un verraco CPR, con incidencia del 45% de gota citoplásmica, por sí mismo puede explicar el problema. Bonet *et al.* (1993^a) describen que el incremento de espermatozoides con gota citoplásmica en un eyaculado, es un indicador de estrés por agotamiento de las reservas espermáticas epididimarias en animales sometidos a un intenso trabajo o

frecuencia de eyaculado. Entonces, al ser espermatozoides inmaduros, no tendrán un desarrollo fisiológico que les permita llevar a cabo la fertilización. En este trabajo, no se encontraron diferencias al comparar la evaluación espermática básica entre los grupos de verracos. Por lo anterior, se sugiere al igual que Flowers (1998^b) que la evaluación espermática básica, no es suficiente para identificar eyaculados de verracos CPR.

Por otra parte, al igual que Alexópulus *et al.* (1996), no se encontraron diferencias al comparar la motilidad espermática en dosis seminales conservadas hasta por 24 horas, periodo dentro del cual fueron conservadas la mayoría de las muestras estudiadas en este trabajo. Tampoco se encontró una correlación entre la motilidad espermática y la RA. En contraste, Flowers (1997), reportó que la motilidad espermática, está estrechamente relacionada con tasas de penetración *in vitro* y tasas de fertilidad y prolificidad *in vivo* de los cerdos.

La concentración espermática de las dosis, no influyó en los promedios de RA determinados, tal como lo reportaron Pérez *et al.* (1991) al encontrar que en dosis de semen conservadas por 24, 72 y 120 horas, los promedios de espermatozoides con acrosoma normal fueron significativamente mayores en tasas de dilución entre 1:8 y 1:11, que en tasas menores o mayores a este rango, ya que todas ellas, como ya se describió fueron diluidas y conservadas en una misma concentración.

10.2. La reacción acrosomal espontánea como indicador de fertilidad.

En el presente trabajo, no se encontraron diferencias al comparar la RAE en espermatozoides de verracos SPR y CPR, lo cual puede indicar que bajo las condiciones de este trabajo, la RAE en esta especie no es una herramienta que ayude a identificar eyaculados de verracos CPR. El no encontrar una asociación entre estas variables, posiblemente se debió a que las muestras analizadas fueron conservadas por lo menos 13 horas antes de ser analizadas en conjunto con los componentes del diluyente y el plasma seminal, el cual contiene factores descapacitantes (Bonilla *et al.*

1996). Lo anterior pudo interferir igualando dicha variable entre los grupos. Sin embargo, no se encontró correlación entre el tiempo de conservación espermática dentro de el cual fueron analizadas las muestras y los promedios de RAE determinados.

En contraste, Berger y Parker (1989), reportaron que existe una correlación entre los porcentajes de RAE en espermatozoides recién eyaculados de verracos fértiles, con la capacidad de fertilización *in vivo*, encontrando que en verracos subfértiles, la RAE estaba incrementada, con respecto a la determinada en espermatozoides de verracos fértiles.

Por otra parte, Holt *et al.* (1997), en cerdos encontraron una asociación entre altos tamaños de camadas y una baja frecuencia de RAE en los espermatozoides de las dosis utilizadas en la IA respectivamente. En espermatozoides humanos de pacientes con infertilidad inexplicable, Esteves *et al.* (1998), determinaron altas tasas de RAE, considerándolas como anormales.

10.3. Evaluación de la reacción acrosomal inducida.

Los resultados mas sobresalientes de éste trabajo indican que en los espermatozoides de verracos CPR, la RAI *in vitro* con progesterona, es inferior a la que se induce en espermatozoides de verracos SPR. Lo anterior, sugiere que en los verracos CPR existen factores a nivel celular y/o bioquímico que alteran o impiden el que se lleve a cabo el proceso normal de RA.

Aunque este fue el comportamiento general, se encontraron cinco casos en los cuales los indicadores en los registros de producción, no mostraron antecedentes de problemas reproductivos. Sin embargo, la RAI en espermatozoides de éstos, fue inferior a la inducida en muestras de verracos sin estos antecedentes y semejante a la RAI en espermatozoides de verracos CPR, lo cual se pudiera atribuir al rango de error de esta prueba.

Se observó que el promedio de RAI en espermatozoides de verracos SPR, fue (10%) inferior al reportado por Bonilla *et al* (1994) (19%) quienes también utilizaron progesterona para inducir la RA y al encontrado por Berger y Parker (1989) (27%) quienes utilizaron ZP homóloga como inductor de la RA. En los tres casos, la RA fue inducida después de un periodo de 4 horas de capacitación en espermatozoides de verracos fértiles.

La diferencia entre los promedios de RAI determinados en este trabajo y los de otros autores (Bonilla *et al.* 1994; Berger y Parker 1989), probablemente se debió a la presencia de factores descapacitantes presentes en el plasma seminal descritos por Bonilla *et al.* (1996) aunado al efecto de los componentes del diluyente para conservar los eyaculados antes de ser analizados. Lo cual indica que estos factores interfirieron en el proceso de capacitación y por tanto también de RA. Por otra parte, debido a que la ZP es el inductor natural, es probable que el incremento en el promedio de RAI, se deba al uso de ésta como inductor de la RA *in vitro*. Explicando así las diferencias de los resultados obtenidos entre estos trabajos.

Aunque la RA puede ser inducida por medios fisiológicos (fluido folicular) ó físicos (bajas temperaturas a 4°C), en ambos casos el proceso sigue las mismas rutas o señales de transducción (Henkel *et al.* 1998). Lo anterior puede indicar que el manejo de las dosis de semen conservadas influye en los promedios de RA. Sin embargo, como ya se describió en los párrafos anteriores, los promedios de RAI podrán ser diferentes dependiendo del inductor.

En otras especies, Meyers (1996), encontró valores de RAI menores en espermatozoides de caballos subfértiles é infértiles, comparados con muestras de caballos fértiles. Por otra parte, Centola *et al.* (1997), al comparar la RAI después de cuatro horas de capacitación en espermatozoides de hombres con problemas de fertilidad encontraron valores inferiores con respecto a los de espermatozoides de hombres sin estos problemas. Chavarría *et al.* (1997^a) encontraron que en hombres el

porcentaje de espermatozoides que completa el proceso de capacitación y RA en pacientes con problemas de fertilidad, es significativamente menor que el determinado en pacientes sin éstos problemas. Los trabajos anteriores, concuerdan con los hallazgos del presente estudio. Por lo anterior, podemos afirmar que la evaluación espermática revela diferencias en la función celular entre eyaculados de animales fértiles é infértiles ó subfértiles, pudiendo entonces sugerir que la evaluación *in vitro* de la RA puede ayudar a identificar animales CPR.

10.4. Influencia genética y ambiental en la reacción acrosomal.

No se encontró una relación entre las características genéticas ó edad de los verracos con la RA a pesar de haber analizado espermatozoides de verracos con diferente línea genética y con un amplio intervalo de edades (9 a 60 meses), aunque se sabe que la genética y edad de los verracos, influyen en la calidad y producción espermática (Levis, 1999).

Kunavongkrit (1990) concluyó que en Tailandia las estaciones del año con temperatura alta (Abril - Mayo), afectan la espermatogénesis causando degeneración testicular, que se refleja en la baja eficiencia de producción espermática de los verracos. En este trabajo, no se observó que esta variable influyera en los valores de RA determinados en espermatozoides de verracos alojados en intemperie, probablemente se debió a que el clima de la región geográfica en la cual se encontraron, no es tan variable ó extremo. Por otra parte, en los verracos alojados en confinamiento, este tipo de instalaciones les proporciona una temperatura estable tanto a lo largo del día como en diferentes épocas del año, permitiendo de esta manera que no se presenten los problemas descritos por el autor.

Sin embargo Levis (1999), reporta que los verracos alojados en confinamiento, y en sí, las características generales de las cuadras y el ambiente social (ausencia de hembras) puede afectar en forma importante la producción y liberación espermática. Reflejándose en un incremento de la RAE debido a el tiempo de conservación de los espermatozoides en el epidídimo (Yanagimachi, 1994).

Por otra parte, Levis (1999) reportó que verracos seleccionados para aumentar niveles de crecimiento magro (engorda) presentaban testículos mas pequeños a los 160 días de edad que los de una línea testigo, encontrando también que la masa parenquimatosa de los testículos, es el factor más importante que contribuye a la variabilidad en la producción diaria de esperma. En este trabajo al intentar determinar la influencia del propósito zootécnico de cada verraco en la RA, no se encontraron diferencias en los porcentajes determinados en cada grupo. Sin embargo, se cuestiona que la fisiología espermática de los verracos con el propósito de producir cerdos para engorda, sea similar a los reproductores de cerdos para pié de cría. Lo anterior, basado en que la distribución celular de la grasa y en particular del colesterol en animales de engorda será homogénea. Por lo tanto la membrana espermática al presentar mayores concentraciones de colesterol membrana tendrá una mayor estabilidad (Brucker y Lipford, 1995) lo cual probablemente le impedirá llevar a cabo el proceso de RA.

11. CONCLUSIONES.

- Los indicadores de la evaluación espermática básica ayudan a decidir la utilidad de los eyaculados y/o dosis seminales conservadas, sin embargo no son suficientes para identificar mediante el eyaculado verracos CPR, por lo que requiere ser complementada con otras técnicas que identifiquen la capacidad fertilizante de los espermatozoides.

- Los espermatozoides de verracos con CPR, presentaron un impedimento celular y/o bioquímico para realizar el proceso normal de RA ante un inductor *in vitro*.

- Los promedios de RAI determinados *in vitro*, pueden explicar parcialmente los problemas reproductivos en verracos con baja fertilidad y/o prolificidad, por lo que la RA, puede ser una herramienta que ayude a identificar verracos CPR.

12. ANEXOS.

Anexo 1. Medio TALP-Hepes, para el lavado y capacitación de los espermatozoides

COMPONENTES DEL MEDIO TALP-H

| Componente. | PM. | mg / 100 ml. | mM final. |
|--|--------|--------------|-----------|
| KCl | 74.55 | 23 | 3.1 |
| NaCl | 58.44 | 584 | 100 |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 137.99 | 4 | 0.29 |
| Hepes. | 238.30 | 238 | 10 |
| NaHCO ₃ | 84.01 | 210 | 25 |
| Lactato de Na. | 60% | 0.308 ml | 21.6 |
| Rojo fenol. | — | 1 | — |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 147.02 | 31 | 2.10 |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 203.30 | 30 | 1.5 |

Fuente: Betancourt et al. 1993.

Aforar a 100 ml con agua desionizada.

Observaciones:

- 1.- Adicionar CaCl₂.2H₂O y MgCl₂.6H₂O al final.
- 2.- Ajustar el pH a 7.4 con NaOH ó HCl.
- 3.- Ajustar osmolaridad a 290 –300 mOsm/kg con NaCl (Millipore-GV®).
- 4.- Esterilizar por filtración, con filtro 0.22 µm.
- 5.- Suplementar el día de uso con:
 - _ Piruvato de sodio 1 mM (40 µl del stock/ml de medio).
 - _ Albúmina Serica Bovina fracción V (BSA) 6 mg/ml de medio.
- 6.- Mantener en refrigeración

Anexo 2. Soluciones.

- Solución Amortiguadora de Fosfato pH 7.4 (PBS)

COMPONENTES DEL PBS.

| Componente. | g /1000 ml. | g / 100 ml. |
|---|-------------|-------------|
| NaCl | 8.0 | 0.8 |
| KCl | 0.2 | 0.02 |
| Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O | 1.15 | 0.115 |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 | 0.02 |
| Agua desionizada. | Cbp | Cbp |

- Solución Salina 0.157 M.

915 mg de NaCl / 100 ml. de agua desionizada.

- Piruvato de Sodio 25 mM.

27.5 mg / 10 ml. de solución salina.

- Fluorocromo Hoechst-33258.

100 µg de Hoechst-33258 / 1000 µl de PBS.

- Progesterona.

0.0067g de sólido con 500 µg de progesterona / 1000 µl de PBS.

- Polivinilpirrolidona-40 al 2%.

2 g de substancia en un volúmen final de 100 ml. de PBS.

- Lectina. PSA-FITC.

Al recipiente con 2 mg de lectina, se adicionaron 2 ml de PBS para tener una solución de 1 µg de lectina / ml. Se tomó una alícuota de 200 µl de esta, y se adicionaron 800 µl de PBS para tener una concentración final de 200 µg / ml de PBS.

ANEXO 3. Reactivos.

Progesterona.- SIGMA cat. P-7556 Progesterone-Water Soluble.
76.0 mg de progesterona /g de sólido (HPLC).

Hoechst-33258.- SIGMA Cat. B-2883. BisBENZIMIDE.
Hoechst-33258 Trihidrochloride.

Lectina FITC.- SIGMA Cat. L-0770 (Pea) FITC labeled.
Lectina de Psillum sativum.

BSA Fracción V.- SIGMA Cat. A-4503
Albúmina bovina Fracción V.

HEPES.- SIGMA Cat. H-9163 PM. 238.3

Lactato de Sodio.- SIGMA Cat. L-1375. DL-Lactic Acid. PM. 112.1

Piruvato de Sodio.- SIGMA Cat. A-1682c Grado reactivo.

Anexo 4. Resultados de los ANDEVA.

- ANDEVA para comparar RAE en verracos SPR de diferente raza.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas | |
|---------|-----|----------|--------|--------|----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 8 | 47.02792 | 5.8785 | 1.9676 | 2.17 | 2.96 |
| E | 42 | 125.4821 | 2.9877 | | | |
| T total | 50 | 172.51 | | | | |

- ANDEVA para comparar RAI en verracos SPR de diferente raza.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas | |
|---------|-----|----------|--------|------|----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 8 | 212.6157 | 26.577 | 3.56 | 2.17 | 2.96 |
| E | 42 | 313.5314 | 7.465 | | | |
| T total | 50 | 526.1471 | | | | |

- ANDEVA para comparar RAE en verracos CPR de diferente raza.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas | |
|---------|-----|---------|--------|--------|----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 7 | 25.3932 | 3.6276 | 1.0939 | 3.79 | 7.00 |
| E | 14 | 46.425 | 3.3161 | | | |
| T total | 22 | 71.8182 | | | | |

- ANDEVA para comparar RAI en verracos CPR de diferente raza.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas | |
|---------|-----|---------|--------|--------|----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 7 | 23.2046 | 3.3149 | 0.8036 | 2.77 | 4.28 |
| E | 14 | 57.75 | 4.125 | | | |
| T total | 21 | 80.9546 | | | | |

Anexo 5. Análisis de covarianza con diferente número de repeticiones para determinar el efecto del propósito zootécnico de los verracos sobre:

La reacción acrosomal espontánea.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas. | |
|------------------|-----|-----------|-----------|----------|-----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 3 | - 19.56 | - 6.5201 | - 1.5693 | 2.76 | 4.13 |
| Propósito | 1 | 7.5045 | 7.5042 | 1.8062 | 4.00 | 7.08 |
| Problema | 1 | 5.1793 | 5.1793 | 1.2466 | 4.00 | 7.08 |
| P X P | 1 | - 32.2442 | - 32.2442 | - 7.7607 | 4.00 | 7.08 |
| $\Sigma\epsilon$ | 69 | 286.6837 | 4.1548 | | | |
| T | 72 | 249.1233 | | | | |

La reacción acrosomal inducida.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas. | |
|------------------|-----|------------|------------|-----------|-----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 3 | 25.0505 | 8.3502 | 0.5972 | 2.76 | 4.13 |
| Propósito | 1 | 0.3333 | 0.3333 | 0.0238 | 4.00 | 7.08 |
| Problema | 1 | 342.4094 | 342.4094 | 24.4912 | 4.00 | 7.08 |
| P X P | 1 | - 317.6922 | - 317.6922 | - 22.7233 | 4.00 | 7.08 |
| $\Sigma\epsilon$ | 69 | 964.6789 | 13.9809 | | | |
| T | 72 | 989.7294 | | | | |

Anexo 6. Análisis de covarianza con diferente número de repeticiones para determinar el efecto del tipo de alojamiento de los verracos sobre:

La reacción acrosomal espontánea.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas. | |
|------------------|-----|---------------|------------|----------|-----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 3 | - 3.4928 | - 1.1643 | 0.0005 | 2.76 | 4.13 |
| Alojamiento | 1 | 6.1256 | 6.1256 | - 0.0029 | 4.00 | 7.08 |
| Problema | 1 | 3.5756 | 3.5756 | - 0.0017 | 4.00 | 7.08 |
| A X P | 1 | - 13.194 | - 13.194 | - 0.0064 | 4.00 | 7.08 |
| $\Sigma\epsilon$ | 69 | - 141671.7012 | - 2053.213 | | | |
| T | 72 | - 141675.194 | | | | |

La reacción acrosomal inducida.

| | GL. | SC. | CM. | Fc. | F tablas. | |
|------------------|-----|------------|------------|-----------|-----------|------|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| T | 3 | - 179.4283 | - 59.8094 | - 3.5583 | 2.76 | 4.13 |
| Alojamiento | 1 | 0.194 | 0.914 | 0.0544 | 4.00 | 7.08 |
| Problema | 1 | 335.7203 | 335.7203 | 19.9737 | 4.00 | 7.08 |
| A X P | 1 | - 516.0626 | - 516.0626 | - 30.7032 | 4.00 | 7.08 |
| $\Sigma\epsilon$ | 69 | 1159.7571 | 16.8081 | | | |
| T | 72 | 980.3288 | | | | |

13. LITERATURA CITADA.

- Alexópulus. C., Bosco. C., Saratsis. Ph., Saoulidis. C., Kyraikis. S. 1996. The effect of storage time and number of spermatozoa per insemination dose on semen characteristics and fertilizing capacity of boar semen diluted with Beltsville Thaw Solution (BTS) extender. *Anim. Sci.* 62 : 599-604.
- Amann. P. y Hammerstedt. H. 1993. In Vitro evaluation of sperm quality: An opinion. *J. Androl.* 4 : 397-406.
- Batista. L. 1998. Importancia de la evaluación de los parámetros reproductivos. *V-Simposium Internacional de la Reproducción e Inseminación Artificial en Porcinos*: 108-114. Mayo 4-6. León Gto. México.
- Berger. T., Parker. K. 1989. Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gam. Res.* 22 : 385-397.
- Berger. T., Kenneth. O., Meizel. S., Hedrick. J. 1989. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol. Rep.* 40 : 525-530.
- Berger. T. 1990. Psium sativum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm. *Theriogenology.* 33 : 689-695.
- Betancourt. M., Fierro. R., Ambriz. D. 1993. *In vitro* fertilization of pig oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology.* 40 : 1155-1160.
- Bonet. S., Briz. M., Fradera. A. 1993^a. Estudio comparativo entre la morfología espermática del eyaculado de verracos sometidos a extracciones de semen cada dos días y la morfología del esperma procedente de las tres regiones epididimarias. *Anaporc.* 124 : 30-37.

- Bonet. S., Briz. M., Fradera. A. 1993. Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 40 : 383-396.
- Bonilla. E., Amador. A., Betancourt. M. 1994. In Vitro capacitation of boar sperm in a protein-free medium supplemented with histidine and cysteine. *Med. Sci. Res.* 22 : 725-726.
- Bonilla. E., Velasco. R., Casas. E., Ducolomb., Betancourt. M. 1996. Inhibition of the pig sperm acrosome reaction by a decapitation factor from pig seminal plasma. *Medi. Sci. Res.* 24 : 75-77
- Brucker. C. y Lipford. G. 1995. The human sperm acrosome reaction: physiology and regulatory mechanisms. *Hum. Rep. Upd.* 1 : 51-62.
- Campos. M. Sistemas de producción 22/22, en: *La producción porcícola en México*. (Ed) UAM-A. México D.F. pp 111 – 141. 1995
- Castañeda. M., Becerril. J., Valencia. J. 1996. Efecto de la adición de progesterona al semen de verraco antes de la congelación o después de la descongelación sobre la fertilidad, morfología acrosomal y motilidad de los espermatozoides. *Vet. Méx.* 27 : 11-16.
- Centola. G., Weisensel. S., Lewis. V., Andolina. E., Herko. R. 1997. Time course of spontaneous In Vitro sperm acrosome reaction. *J. Androl.* 18 : 556-561.
- Chavarría. M., Reyes. A., Rosado. A. 1997^a. El factor masculino. II. El espermatozoide. Estructura y funcionamiento. *Gin. Obst. Méx.* 65 : 413-421.
- Chavarría. E., Reyes. A., Acosta. A., Rosado. A. 1997^b. El factor masculino. III. Importancia y diagnóstico y perspectivas. *Gin. Obst. Méx.* 65 : 422-429.

- Colenbrander. B., Feitsma. H., Grooten. H. 1993. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Rep. Fert. Suppl.* 48 : 207-215.
- Decuadro. H. 1999. Control sanitario de los verracos en un centro de producción de semen. *Cerdos.* 2 : 37-40.
- Ducos. A., Berland. H., Pinton. A., Seguela. A., Darre. R. 1996. Un reproducteur porcin de qualité doit être indemne d'anomalie chromosomique. *Rev. Med. Vet.* 147 : 101-108.
- Eddy. E., O'Brien. D. The spermatozoon, en: *The Physiology of Reproduction.* (Eds) E. Knobil and J.D. Neil. Raven Press. NY. EUA. pp 29-78. 2 ed. 1994.
- El-Mulla. F., Kóhn. F., Dandal. M., Beheiry. A., Schiefer. H., Weinder. W., Schill. W. 1996. In Vitro effect of Escherichia coli on human sperm acrosome reaction. *Arch. Androl.* 37 : 73-81.
- Esteves. C., Sharma. K., Thomas. J., Agarwal. A. 1998. Effect of in vitro incubation on spontaneous acrosome reaction in fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int. J. Fertility.* 43 : 235-242.
- Fabbri. R., Porcu. E., Lenzi. A., Gandini. L., Marsella. T., Flamigni. C. 1998. Follicular fluid and granulosa cell cultures: Influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. *Fert. Ster.* 69 : 112-117.
- Flowers. W. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52 : 67-78.
- Flowers. W. 1998^a. Boar fertility and artificial insemination. *Proceedings of the 15 th IPVS Congress:* 200-208. Birmingham, England. 5-9 July

- Flowers W. 1998^b. Main of reproductive failure due to artificial insemination: Diagnosis and solutions. *V-Simposium Internacional de la Reproducción e Inseminación Artificial en Porcinos*: 16-25. Mayo 4-6. León Gto. México.
- García. A. 1994. Criterios para seleccionar cerdas de remplazo en granjas comerciales de ciclo completo. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos Méx.
- Gary. C. 1999. Orígenes y efectos de la contaminación microbiológica en el semen de porcino congelado. *VI-Simposium Internacional de Reproducción e IA. Porcina.*: 7-13. Madrid. España. del 3-5 de Mayo.
- Henkel. R., Müller. C., Miska. W. 1998. Induction of acrosome reaction by low temperature is comparable to physiological induction by human follicular fluid. *Andrologia*. 30 : 159-161.
- Holt. C., Holt. W., Moore. H., Reed. H., Curnock. R. 1997. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on farminseminations: Results of two fertility trials. *J. Androl*. 18 : 312-323.
- Jaiswal. B., Dayag. A., Kaspá. I., Eisenbach. M. 1998. Sperm capacitation is, after all, a prerequisite for both partial and complete acrosome reaction. *FEBS. Letters*. 427 : 309-313.
- Kennet. O., García. M., Meizel. S. 1994. Progesterone initiation of the human sperm acrosome reaction: the obligatory increase in intracellular calcium is independent of the chloride requirement. *Mol. Cell. Endoc*. 101 : 221-225.
- Kennet. O., Syvanen. M., Meizel. S. 1997. The human acrosome reaction is highly sensitive to inhibition by ciclodiene insecticides. *J. Androl*. 18 : 571-575.

- Köhn. F., Erdmann. I., Oeda. T., El-Mulla. F., Schiefer. H., Schill. W. 1998. Influence of urogenital infections of sperm functions. *Andrologia*. 30 (suppl. 1) : 73-80.
- Kunavongkrit. A. 1990. Influence of ambient temperature on reproductive efficiency in pigs: (1) boar semen quality. *The pig Journal*. 35 : 43-47.
- Levis. G. 1999. Mejora de la fertilidad del verraco. *VI-Simposium Internacional de Reproducción e IA. Porcina.*: 15-24. del 3-5 de Mayo. Madrid. España.
- Mattioli. M., Lucidi. P., Barboni. B. 1998. Expanses cumuli induce acrosome reaction in boar sperm. *Mol. Rep. Dev.*. 52 : 445-453.
- Meyers. S. 1996. New methods of diagnosing subfertility in stallion. *J. Equine. Vet. Sci.* 16 : 103-105.
- Méndez. R., Namihira. G., Moreno. A., Sosa. L. Diferentes tipos de estudio, en: *El protocolo de investigación*. Ed. Trillas. D.F. México. pp 11-27. 2 ed. 1997.
- Osman. R., Andria. M., Jones. A., Meizel. S. 1989. Steroid induced oxocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160 : 828-823.
- Parinaud. J., Labal. B., Vieitez. G. 1992. High progesterone concentrations induce acrosome reaction with a low cytotoxic effect. *Fert. Ster.* 58 : 599-602.
- Parinaud. M. 1995. Relevance of acrosome function in the evaluation of semen in vitro fertilizing ability. *Fert. Ster.* 63 : 598-603.

- Perez. C., Sanchez. R., Palacio. M., Pursel. V., García. P. 1991. Effects of dilution rate on the motility and acrosome morphology of boar spermatozoa stored at 15 °C. *Reprod. Dom. Anim.* 26 : 112- 116.
- Rillo. S., Martínez. E., García. A., De Alba. C. 1996. Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.* 31 : 519-526.
- Rodríguez. J. Comparaciones múltiples de medias, en *Métodos de investigación pecuaria*. Ed. Trillas. México. pp 81-89. 1991.
- Saling. P. 1991. How the egg regulates sperm function during gamete interaction: facts and fantasies. *Biol. Reprod.* 44 : 246-251.
- Sánchez. R. 1991. Control de calidad espermática. *Anaporc.* 91 : 27-33.
- Valcárcel. A., Heras. M., Pérez. L., Moses. D., Baldassarre. H. 1997. Assesment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneos lectin/hoecst33258 staining. *Anim. Rep. Sci.* 45 : 299-309.
- Vázquez. J., Martínez. E., Roca. J., Coy. P., Pastor. L. 1993. Acrosome reaction of boar spermatozoa in homologous In Vitro fertilization. *Mol. Rep. Dev.* 36 : 84-88.
- Villagómez. D. 1998. Falla reproductiva de origen citogenético en el cerdo. *Memorias del XXXIII Congreso de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos*: 165-170. Puerto Vallarta México.
- Woelders. H. 1991. Overview of In Vitro methods for evaluation of semen quality. Boar semen preservation II. *Rep. Dom. Anim. Suppl.* 1.

Yanagimachi. R. Mammalian fertilization, en: *The Physiology of Reproduction*. (Eds) E. Knobil and J.D. Neil. Raven Press. NY. EUA. pp 193-245. 2 ed. 1994.