



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“INFLUENCIA DE LA RAZA Y LA FRACCIÓN DEL  
EYACULADO, EN LA RELACIÓN ENTRE PARÁMETROS  
DE EVALUACIÓN ESPERMÁTICA Y DEL LÍQUIDO  
SEMINAL.”

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA  
REPRODUCCIÓN ANIMAL.  
P R E S E N T A  
M. V. Z. MARIA JUANA CID AGUILAR

DIRECTORAS DE TESIS:

DRA. GISELA FUENTES MASCORRO  
DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

MEXICO D.F.

DICIEMBRE DE 2002

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA  
DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

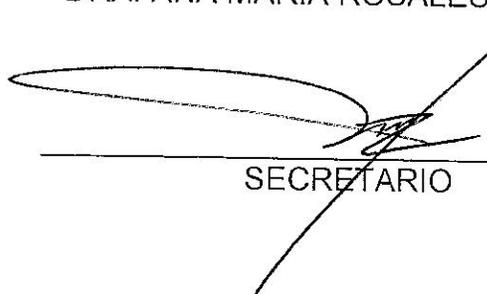
CON EL APOYO DE UNA BECA CREDITO OTORGADA POR EL CONACYT  
(REGISTRO No. 153058)

JURADO

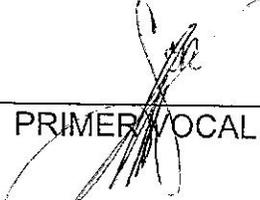
DRA. GISELA FUENTES MASCORRO

  
PRESIDENTE

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

  
SECRETARIO

DR. HECTOR FERNANDO SERRANO

  
PRIMER VOCAL

M.en C ALEJANDRO AVALOS RODRÍGUEZ

  
SEGUNDO VOCAL

A S E S O R A S

DRA. GISELA FUENTES MASCORRO

JEFE DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN REPRODUCCIÓN ANIMAL  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA BENITO JUÁREZ DE OAXACA

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

JEFE DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL  
COORDINADORA DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
INVESTIGADOR NIVEL I SNI

## AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Fuentes-Mascorro por la dirección de esta tesis, que en todo momento me comprendió y compartió sus conocimientos científicos, además por su amistad , entusiasmo y empeño que la caracterizan.

A la Doctora Rosales Torres, por la dirección de esta tesis y por compartir su sabiduría y experiencia de toda una vida de investigación.

Al Doctor Castillo, por su valiosa colaboración en el análisis estadístico de esta tesis.

A Mis compañeros de laboratorio Alejandro, Marcela, Mireya, Gerardo, Hector, Israel Ángel y Celsopor hacerme más agradable la vida de investigador.

A Mis padres y hermanos por el apoyo moral e incondicional que siempre recibí de ellos.

A Mi esposo Ramón por la comprensión en todo momento y el amor incondicional.

A MI GRAN AMOR JUAN RAMÓN POR SU TERNURA Y PAZ

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Espermatogénesis .....	2
2.2 Maduración epididimaria .....	10
2.3 Líquido seminal .....	11
2.4 Semen .....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	28
4. OBJETIVOS .....	29
5. MATERIAL Y METODOS .....	30
6. RESULTADOS .....	39
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	57
8. BIBLIOGRAFÍA .....	61
9. ANEXOS .....	68

## INTRODUCCIÓN

En el proceso natural de los animales de fertilización interna la gameta masculina es depositada en el tracto reproductor femenino en una solución a la que se denomina semen, con la finalidad de asegurar el arribo de espermatozoides sanos al sitio de fertilización y de esta manera poder preservar la especie., por lo que el hombre desde la domesticación ha venido alterando los procesos naturales, desde privar a los animales de su libertad hasta manipular sus genes, todo ello con la finalidad de proporcionarse a si mismo un modo de vida más confortable aunque no necesariamente sano. En el caso de la producción porcina se viene realizando selección genética que permite tener animales cada vez más prolíficos, con mayor velocidad de crecimiento y con menores depósitos de grasa, para poder dar agilidad a este proceso de selección se emplea desde finales del siglo XIX, la inseminación artificial (Einarsson 1980).

A pesar de que la técnica de inseminación artificial viene desarrollándose desde hace más de un siglo, la conservación del semen presenta algunas peculiaridades que han impedido hasta el momento su congelación y descongelación con resultados satisfactorios para la producción, por lo que se emplea diluido. En el mercado se encuentra una gran variedad de medios para diluir el semen, sin embargo se siguen empleando de dos a tres dosis por hembra por gestación; sin duda alguna esto puede mejorarse en la medida en que se conozca con claridad la función específica de cada componente del semen.

El cerdo presenta un patrón eyaculatorio que puede ser continuo o en ondas eyaculatorias, el semen presenta al inicio un color casi transparente acuoso, que se va haciendo blanquecino y denso, para concluir la eyaculación con un líquido nuevamente casi transparente y poco denso, acompañados de la secreción de gel cuya cantidad es más abundante en la primera y tercera fracción; por su concentración espermática se conocen como pre-espermática, espermática y post-espermática (Einarsson 1980).

En los centros de colección de semen una práctica común es tirar las fracciones pre y post-espermáticas, la primera fracción está contaminada por bacterias, tiene baja cuenta espermática y es rica en bacterias y la última presenta una baja cuenta espermática, por lo que más que beneficiar la conservación de la dosis la dificultan (Wayne 2000). Sin embargo es necesario profundizar en el conocimiento bioquímico de los componentes y características del líquido seminal de cada fracción para ayudar a explicar porque en la inseminación artificial se requieren de dos a tres dosis para obtener un promedio de 8 lechones nacidos vivos, mientras que en la monta natural es suficiente con un servicio. Aunque se sabe que emplear las tres fracciones para preparar las dosis, disminuye el tiempo de vida útil del espermatozoide (Decuadro-Hansen 1999), se desconoce si toda la fracción o solo alguno de sus componentes ocasionan este efecto.

## ANTECEDENTES

### ESPERMATOGÉNESIS

Es un proceso de diferenciación de múltiples pasos cuyo mayor cambio involucra modificaciones sustanciales en la actividad génica y el rearrreglo de la estructura de la cromatina por el cual la espermatogonia del tallo celular, entra en meiosis, produciendo finalmente una espermátide haploide, que experimenta una complicada metamorfosis, dando origen a una célula morfológicamente muy diferente, el espermatozoide (Fuentes-Mascorro, *et al.*, 2000 a), esta en el cerdo dura 39 días. Cada especie tiene una forma específica de espermatozoide (Poccia 1986).

La espermatogenesis se realiza dentro del túbulo seminífero, el cual está rodeado de tejido intersticial, donde se ubican vasos sanguíneos, linfáticos, nervios y las células de Leydig que son las productoras de andrógenos; una capa de células mioideas y material no celular que limita con la pared del túbulo, formando la barrera hematotesticular. Al interior se ubican las células germinales o del tallo celular, rodeadas por las células de Sertoli que les servirán de nodrizas, al satisfacer sus necesidades nutritivas y hormonales, durante todo el trayecto hasta su arribo a la luz del túbulo (Setchell, 1993; Sharpe, 1994) (fig 1).

El inicio de la espermatogénesis ocurre cuando una célula germinal al dividirse por mitosis origina dos células hijas, una de ellas permanecerá como célula germinal y la otra se diferenciara en una espermatogonia, la cual se caracteriza por una forma diferente de núcleo y una reproducción mitótica intensa, con lo que se inicia el desplazamiento hacia la luz del túbulo (Sharpe, 1994). La mitosis de las espermatogonias presenta la peculiaridad de que no se realiza la citocinesis, por lo que estas permanecen unidas formando puentes citoplásmicos, la última mitosis se caracteriza por tener una fase G2 muy corta, dando inicio al preleptoteno de la primera división meiótica, en este punto a la célula por presentar un núcleo característico se le denomina espermatocono primario, con un complemento genético  $4n$ . Se inicia una profase muy larga en la que se da el entrecruzamiento y se forma el complejo sinaptotémico (Setchell, 1993). Al separarse los cromosomas homólogos se origina un espermatocono secundario con un contenido cromosómico  $2n$ , en la segunda parte de la meiosis se producen las espermátides con un complemento cromosómico  $n$ , que en el cerdo corresponde a 19 cromosomas (Garner and Hafez, 2000).

La espermátide que ha concluido la meiosis es una célula esféricas de tamaño pequeño que se encuentran en la parte luminal del epitelio seminífero, tiene un núcleo redondo situado en el centro de la célula, un complejo de Golgi bien desarrollado y centriolos adyacentes; las mitocondrias se encuentran dispersas por la periferia de la membrana plasmática (Sharpe 1994). Para poder adquirir la forma reológica que le permita llegar hasta el sitio de unión con el ovocito, se inicia el proceso de espermiogénesis el que probablemente sea la reestructuración celular más impresionante de los mamíferos (Fuentes-Mascorro *et al.*, 2000b)

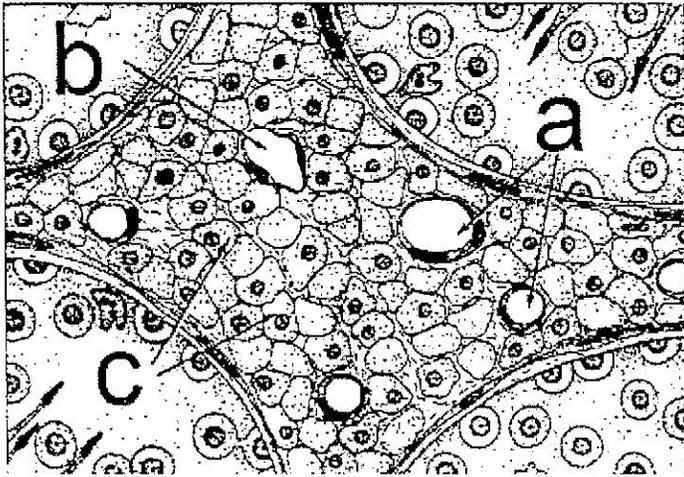


Fig. 1 La barrera hematotesticular, evita el paso de sustancias del tejido intersticial, que se forma de, a) vasos sanguíneos, b) vasos linfáticos y c) células de Leydig, hacia los túbulos seminíferos, protegiendo a las células germinales de cambios químicos ( Setchell 1994).

Durante la espermiogénesis los centriolos migran hacia polos opuestos, con el centriolo proximal migra el aparato de Golgi, en el cual se forman los gránulos proacrosómicos, que posteriormente se fusionan en uno solo, se extiende adherido a la superficie del núcleo de la espermátida, cubriéndose por una delgada membrana de doble pared que se adhiere estrechamente a la envoltura nuclear, formando el acrosoma. El centriolo distal actúa como corpúsculo basal para los componentes axonémicos del flagelo que se alargan más allá de la periferia del citoplasma celular (Huh and Li, 1999).

Dentro de este citoplasma, los microtúbulos se asocian y forman una vaina cilíndrica temporal, misma que se proyecta hacia la parte posterior del borde caudal del acrosoma donde rodea al axonema, formando una estructura anular llamada anillo. Este se forma primero cerca del centriolo proximal y después durante el desarrollo subsecuente, se traslada a lo largo de la cola (Sharpe 1994).

Las mitocondrias previamente distribuidas en todo el citoplasma de la espermátida, empiezan a concentrarse cerca del axonema y forman la pieza media de la cola. Posteriormente se forman vainas fibrosas y las nuevas fibras gruesas que cubren el axonema. Las fibras gruesas parecen asociarse en forma individual con los nueve pares de microtúbulos del axonema y se continúan con las columnas en el cuello de la pieza de conexión de la espermátida. La vaina fibrosa cubre al axonema desde el cuello hasta la punta de la cola. Las mitocondrias se unen y forman la vaina continua que se extiende desde el cuello hasta el anillo caudal (Sharpe, 1994)(Fig. 2).

Los cambios nucleares comprenden el reemplazo de las histonas por un tipo de proteínas altamente básicas conocidas como protaminas, en el cerdo el reemplazo es parcial, conservando el ADN de la periferia en estructura nucleosomal, lo que facilitará su lectura inmediata después de la primera división mitótica del cigoto, el resto del material genético se acomoda en protaminas del tipo I (Fuentes-Mascorro et al., 2000a,b). Conforme se incrementa el número de enlaces disulfuro de las protaminas adyacentes, el ADN se condensa, al mismo tiempo que los microtúbulos del anillo y la manchette, se desplazan arrastrando el citoplasma hacia el flagelo, dando a el espermatozoide su forma característica (Fuentes-Mascorro et al., 2000b ; Cole et al., 1988).

Una vez adquirida la forma característica del espermatozoide éste es liberado a la luz del túbulo, proceso al que se denomina espermiación. Las espermátidas alargadas que se orientan perpendicularmente a la pared tubular, sobresalen poco a poco hacia la luz del túbulo, en el epitelio de los túbulos queda incluido citoplasma residual a través del cual están conectados grandes grupos de espermatozoides por medio de puentes intercelulares. El rompimiento del tallo da por resultado la formación de la gota citoplasmática en el cuello del espermatozoide liberado (gota proximal) y se retienen los cuerpos residuales interconectados. Después de la liberación de los espermatozoides, los cuerpos residuales son eliminados con rapidez por las células de Sertoli. Al parecer éstas últimas contribuyen al reciclaje de los componentes protoplasmáticos. Las células

de Sertoli no solo consumen los cuerpos residuales restantes del proceso espermatogénico, sino que también deben eliminar cantidades considerables de células germinales degeneradas. Dado que el proceso de espermatogénesis es relativamente ineficiente, gran número de células espermáticas potenciales se degeneran antes de convertirse en espermatozoides (Garner and Hafez, 2000; Sharpe 1994) (fig 3).

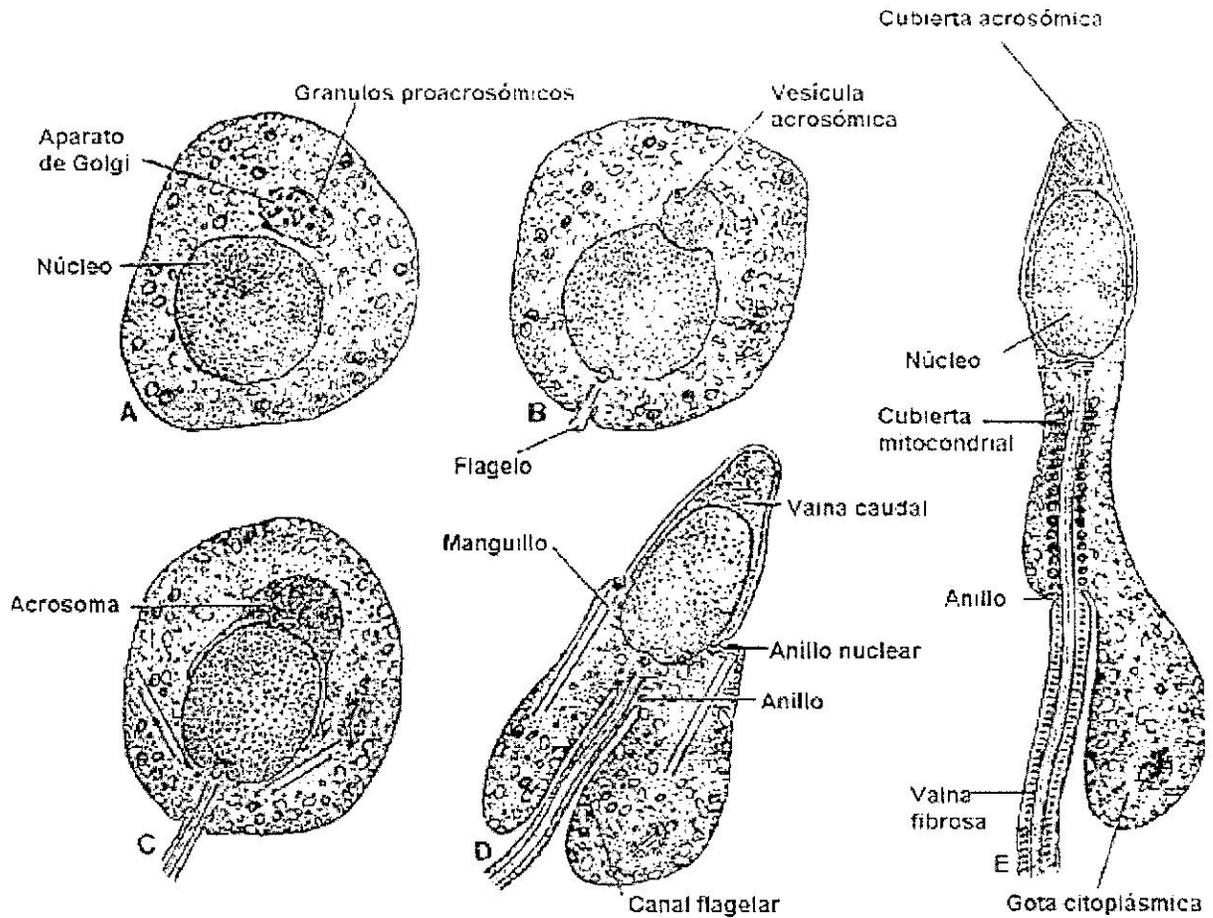


Fig. 2 Espermiogénesis, proceso que se encarga de la reestructuración celular del espermatozoide. A) formación de los gránulos proacrosómicos. B y D) Formación del acrosoma, D) remodelación del núcleo de esférico a alargado y plano. E) desplazamiento del citoplasma hacia la parte caudal del núcleo, rodeando la parte proximal de la cola en desarrollo (Setchell, 1993).

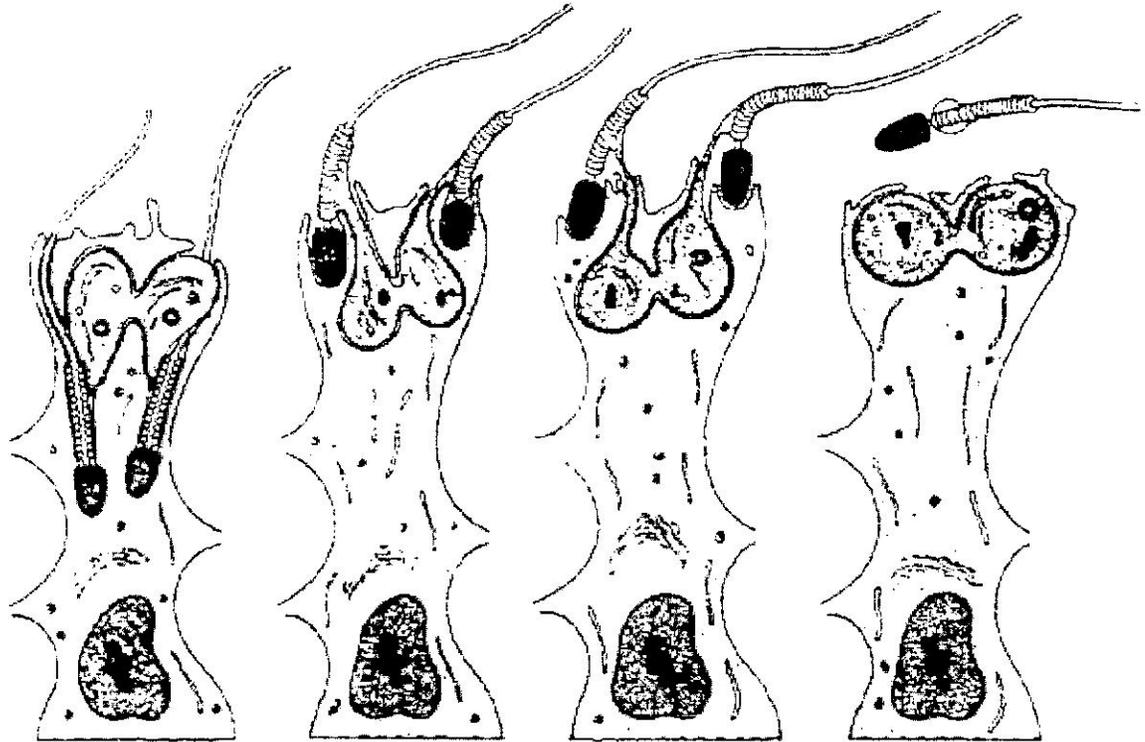


Fig.3 Las espermátidas alargadas se orientan perpendicularmente a la pared tubular saliendo poco a poco hacia la luz del túbulo seminífero

### **Anatomía y fisiología del espermatozoide**

Los espermatozoides de los mamíferos están formados principalmente por tres componentes: cabeza, pieza media y flagelo. La cabeza está constituida por un núcleo, un acrosoma y por estructuras del citoesqueleto y del citoplasma. En el núcleo del espermatozoide se encuentra la cromatina que está altamente condensada y su volumen es significativamente menor que el de las células somáticas. La organización, cantidad de DNA y la composición y arreglo de la nucleoproteínas son la característica principal de los núcleos de los espermatozoides que contienen únicamente una copia de cada cromosoma (células haploides)( Ward and Coffey 1991) . La mayoría de la proteínas del núcleo que se asocian con el DNA de los espermatozoides de mamíferos son la protaminas (Fuentes-Mascorro et al., 2000b).

El acrosoma se encuentra en la parte anterior del núcleo cubriendo la cabeza del espermatozoide. Está formado por un segmento apical, un segmento principal, un segmento ecuatorial y una región postacrosómica. El segmento ecuatorial junto con el segmento anterior de la región postacrosómica se fusionan inicialmente con la membrana del ovocito durante la fecundación. El acrosoma se

encuentra rodeado por una membrana y contiene enzimas hidrolíticas que permitirán al espermatozoide atravesar la zona pelúcida del ovocito. La pieza media o cuello forma una placa basal que se une a la superficie posterior del núcleo. Contiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través la mayor parte de la cola del espermatozoide. Estas vainas o fibras de mitocondrias proporcionan la energía necesaria para el metabolismo de la célula. El flagelo contiene un axónema central el cual esta rodeado por una capa gruesa de fibras extendidas desde la parte posterior de la cabeza hasta el final de la cola. El flagelo dará la propulsión necesaria para que el cruzamiento de la zona pelúcida se vea facilitado, permitiendo con esto el arribo del material genético del macho hasta el ovocito (Garner and Hafez ,2000) (fig 4).

La estructura del citoesqueleto está localizada en tres regiones de la cabeza del espermatozoide. El citoesqueleto subacrosomal, localizado entre el acrosoma y el núcleo. El citoesqueleto postacrosomal está entre el núcleo y la membrana plasmática posterior al acrosoma y el citoesqueleto y el citoesqueleto para- acrosomal está presente entre la punta anterior y la superficie convexa a la membrana plasmática del espermatozoide.

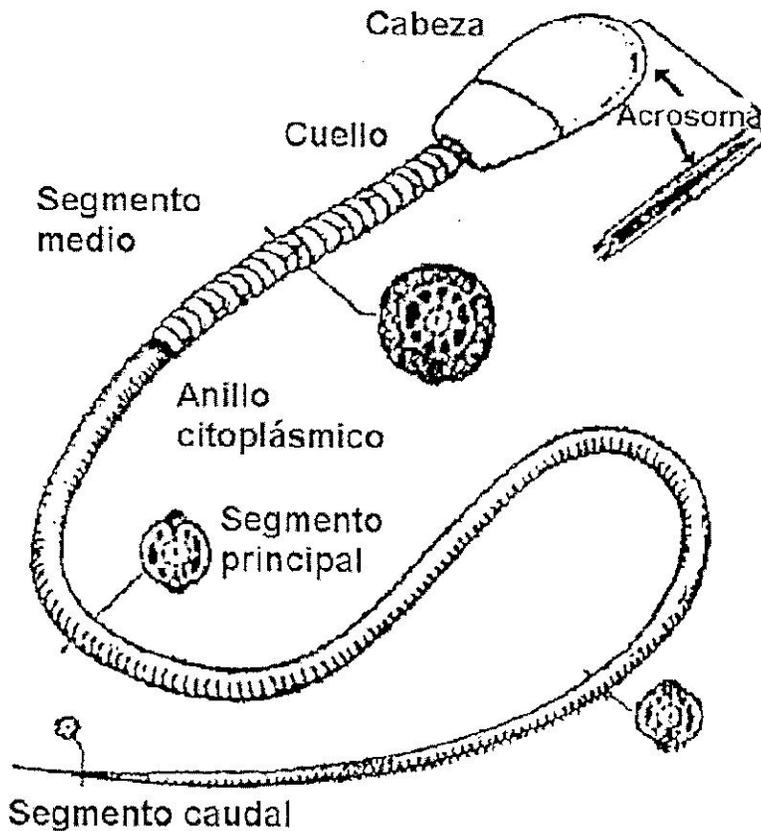


Fig.4 Espermatozoide, donde se observa, con su casquete acrosómico, cuello y la cola en sus diferentes divisiones (Garner and Hafez 2000).

## **Membrana plasmática**

La membrana plasmática del espermatozoide está compuesta de colesterol, glicolípidos, conteniendo también altas cantidades de plasmalógenos, fosfolípidos y otros lípidos de cadena alifática poliinsaturada (Eddy and O' Brien, 1994). Los fosfolípidos fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélin y fosfatidilcolina, ocupan cerca del 70% de los componentes lipídicos de la membrana plasmática del espermatozoide en el cerdo (Gadella et al., 1999). Los esteroides son los segundos lípidos más abundantes con una relación molar de colesterol/ fosfolípidos de aproximadamente 0.12 M. Estudios realizados con criofractura muestran que la cantidad de esteroles en la parte anterior del acrosoma es cuatro veces más que la encontrada en la región postacrosomal en los espermatozoides de caballo y toro (Eddy and O' Brien, 1994).

La mayoría de los glicolípidos en los espermatozoides es el sulfatogalactosilglicerolípidos (SGG), el cual también se puede encontrar en cerebro. El SGG se encuentra tanto en tallo como en la cabeza del espermatozoide. Un anticuerpo monoclonal de SGG reacciona con el segmento ecuatorial y pieza media del espermatozoide vivo (Eddy and O' Brien, 1994).

La relación fosfolípidos proteína es de 0.68 en base al peso de la membrana plasmática del espermatozoide de cerdo, sugiriendo que la cantidad de proteínas y lípidos en la membrana es aproximadamente la misma. Aunque es posible que la relación proteína/lípidos en varias partes de la membrana plasmática del espermatozoide es diferente entre ellas. Además los cambios que ocurren durante la maduración y capacitación del espermatozoide podrían tener efectos sustanciales en su composición, sobre todo en las diferentes partes que contiene (Eddy and O' Brien, 1994).

### **Asimetría de la membrana plasmática.**

En la membrana plasmática la composición lipídica de las dos caras de la bicapa lipídica es marcadamente diferente. En la membrana plasmática de espermatozoide de cerdo la mayoría de las moléculas lipídicas que contienen colina se encuentran en la cara exterior de la bicapa lipídica, mientras la mayoría de los fosfolípidos que contienen un grupo amino primario terminal se hallan en la cara interior. Puesto que las primeras presentan más cadenas hidrocarbonadas saturadas que las segundas, la asimetría en la distribución de los grupos de la cabeza está acompañada por una asimetría en la distribución de las colas hidrocarbonadas. Además la fosfatidilserina, de carga negativa, está localizada en la cara interior. Por consiguiente existe una importante diferencia de carga entre las dos capas (Harrison and Miller, 2000).

Las moléculas lipídicas que presentan la asimetría más marcada y constante, en cuanto a la distribución en la membrana plasmática, pertenecen a una clase de lípidos denominada glicolípidos, que contiene oligosacáridos. Estas moléculas únicamente se encuentran en la cara exterior de la bicapa, y sus grupos

azúcar quedan al descubierto en la superficie de la célula (Gadella et al., 1999) (fig 5).

La formación y mantenimiento de la asimetría de la membrana es importante para sus funciones y por lo tanto para el mantenimiento del espermatozoide. Los componentes estructurales de las bicapas se encuentra en equilibrio. Dicho equilibrio es un balance de dos mecanismos. Primero todos los fosfolípidos difunden sustancialmente a través de la bicapa, a una velocidad baja. Segundo los aminofosfolípidos son transportados activamente de la cara externa de la membrana hacia la cara interna por la acción de una enzima denominada translocasa de aminofosfolípidos dependiente de (ATP) y  $Mg^{2+}$ , la cual mantiene el equilibrio de la membrana (Harrison and Miller, 2000). Estudios reportados con eritrocitos han podido demostrar que los aminofosfolípidos son transportados desde la cara externa hasta la cara interna de la membrana por la aminofosfolípido translocasa, y este movimiento es responsable de la distribución asimétrica de los fosfolípidos en los eritrocito, así como en la membrana de espermatozoide de cerdo (Schroit and Zwaal, 1991). Cuando en la lamina externa de la bicapa aparece la fosfatidilserina, ésta es rápidamente devuelta hacia la cara interna por la translocasa de aminofosfolípidos. El movimiento de la cara externa hacia la interna de la membrana se denomina "flip" y el movimiento de los fosfolípidos de la cara interna hacia la externa se denomina "flop" (Kuypers et al., 1996). Los iones de calcio también tienen un importante papel en algunos procesos fisiológicos por su habilidad para regular la estructura y función de las membranas celulares.

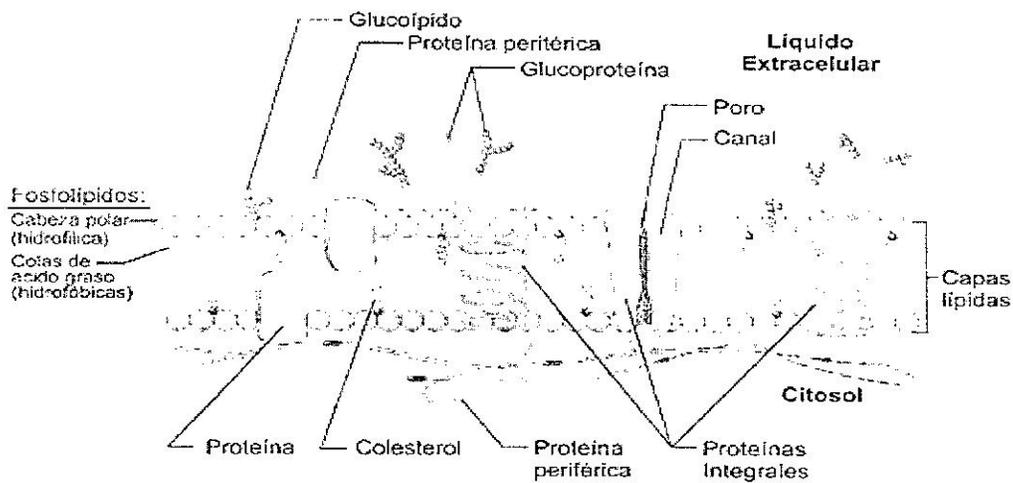


Fig. 5 Componentes de la membrana plasmática, en su diferentes capas lipídica.

## MADURACIÓN EPIDIDIMARIA

Una vez que la espermatogénesis finaliza, los espermatozoides se mantienen completamente inmóviles y son transportados pasivamente desde los tubos seminíferos hacia el interior del epidídimo por secreciones líquidas que se originan en las células de Sertoli, auxiliado por secreciones procedentes de la red testicular, por los componentes contráctiles de los testículos (células mioideas y cápsula testicular) así como por los cilios que revisten los conductos eferentes. El transporte espermático dentro y a través del epidídimo no es producido por la movilidad espermática, comienza pasivamente siguiendo el flujo de las secreciones, ayudado por el movimiento de los cilios del epitelio del lumen y las contracciones del músculo liso del conducto deferente. El tránsito espermático a través del epidídimo en el cerdo está estimado aproximadamente 8,5 días. El tiempo de transporte de los espermatozoides a través del epidídimo decrece cerca del 10% a 20% cuando se acorta el periodo entre las eyaculaciones (Settchell 1993; Garner and Hafez, 2000).

Existen 5 eventos en la vida de un espermatozoide que regulan su habilidad para fertilizar un ovocito maduro. Primero, el espermatozoide debe completar su maduración dentro del epidídimo, seguido inmediatamente por el segundo evento, que es la adición de factores de decapacitación a su superficie de membrana. El tercer evento es el transporte del espermatozoide dentro del tracto reproductivo femenino después de la monta y eyaculación. El cuarto y quinto evento son procesos que ocurren en el tracto reproductivo femenino y preparan al espermatozoide para fertilizar un ovocito, llamados capacitación y reacción acrosomal (Parrish and First, 1993).

El epidídimo (cabeza, cuerpo y cola), es el lugar donde los espermatozoides sufren el proceso de maduración cambiando, su patrón de movilidad y adquieren la capacidad de fertilizar, por medio de cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos (Bellvé et al., 1993).

Primero el espermatozoide adquiere la capacidad para fertilizar un ovocito durante su tránsito a través del epidídimo. Durante éste periodo ocurren grandes modificaciones en la membrana plasmática del espermatozoide. Modificaciones en cuanto a proteínas de la membrana incluyen tanto su aparición como desaparición. El espermatozoide pierde su habilidad de sintetizar proteínas durante la espermatogénesis. Las nuevas proteínas que aparecen son adicionadas por la interacción del espermatozoide con el fluido epididimal. La superficie del espermatozoide es también modificada por una redistribución de proteínas. Además de las modificaciones en cuanto a proteínas, también ocurren cambios en cuanto a los lípidos en la membrana plasmática. Esos cambios incluyen alteraciones en la composición de lípidos, en los coeficientes de difusión de lípidos y restricciones aumentadas para la difusión dentro de la membrana. La modificación en la membrana plasmática espermática durante la maduración

epididimal regulan la capacidad del espermatozoide de ser móvil y la capacidad del espermatozoide de unirse a la zona pelúcida; dos puntos críticos para que el espermatozoide sea fértil (Parrish and First, 1993). Los cambios pueden ser principalmente las glicoproteínas que presenta modificaciones en la superficie de la membrana plasmática del espermatozoide durante la maduración epididimaria, sin embargo en el transcurso de los espermatozoides del epidídimo al conducto eyaculatorio se agregan las secreciones de las glándulas sexuales accesorias que producen proteínas y se adhieren a la superficie del espermatozoide, para posteriormente algunas de ellas se involucran en la fertilización (Gadella, 1996).

Otro cambio del espermatozoide en el tránsito, es la organización de la cromatina involucrando pérdida de agua, enrollamiento de la protamina por puentes de disulfuro y además reducción sobre el volumen del núcleo espermático, así como una completa restricción de las facilidades para la replicación y transcripción del DNA (Fuentes-Mascorro et al., 2000). También sufre cambios en la cantidad de la gota citoplasmática (citoplasma) que migra desde la región del cuello hasta un sitio cercano al anillo citoplasmático. La presencia de la gota en una cantidad significativa de espermatozoides eyaculados es un indicio de inmadurez (Jonhson et al., 2000)

Los espermatozoides que han madurado en el epidídimo son capaces de moverse activamente, sin embargo ellos todavía no son capaces de fertilizar ovocitos (Claus 1990).

## **LÍQUIDO SEMINAL**

Una vez concluido el paso por el epidídimo, el espermatozoide debe viajar por el conducto deferente, a su paso es acompañado de sustancias ( cuadro 1 ), que le proporcionan el medio ambiente adecuado para poder abandonar el tracto masculino en las mejores condiciones de salud, facilitándole además la sobrevivencia y desplazamiento dentro del tracto femenino, son agregadas en el orden de aparición de las glándulas que las producen en el caso particular del cerdo la primer secreción que se recibe es de las glándulas bulbouretrales, seguido de las de las glándulas vesiculares y próstata para finalizar con las glándulas bulbouretrales (de Cowper) nuevamente (fig 6).

**Cuadro. 1** Componentes del plasma seminal en el cerdo

Componente	Concentración
Volumen	250-500 (ml)
Sodio	17-46 (mM)
Potasio	17-46(mM)
Calcio	1.5-4.6 (mM)
Magnesio	2.5-24 (mM)
Cloro	85-101 (mM)
Fosfato	0.4 (mM)
Fructosa	3.1-6.2 (mM)
Glucosa	0.06-0.3 (mM)
Inositol	100-134 (mM)
Ergotioneina	1.8-3.8 (mM)
Ácido Cítrico	29-32 (mM)
Ácido Glutámico	2 (mM)
Fosfoglicerolcolina	4 (mM)
Fosfoglicerolinositol	0.26 (mM)
Arginina	0.01 (mM)
Proteína	30 mg/ml.

( Hafez E. S. E. 2000; Setchell, B.P., *et al* 1994),

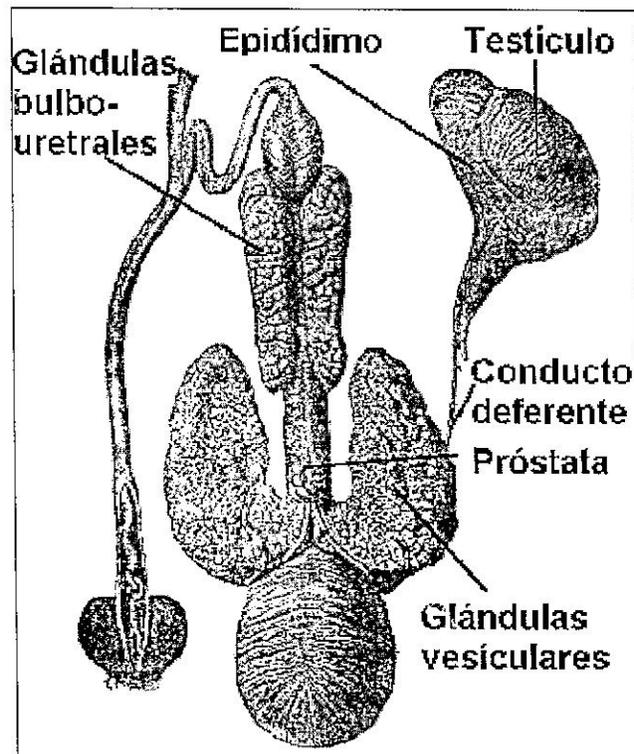


Fig. 6 Anatomía de las glándulas sexuales accesorias del cerdo (Sisson y Grossman, 1994).

El plasma es el líquido donde los espermatozoides están suspendidos en el momento de la eyaculación, proporcionando nutrientes y un medio para la movilidad de los mismos (Waberski et al.,1994); dentro del tracto reproductor femenino, el plasma favorece las contracciones uterinas, la relajación del istmo tubal y la modulación inmune en el útero. Algunos de sus componentes ayudan al espermatozoide al momento de la fertilización del ovocito, principalmente las proteínas que se unen a la membrana plasmática del espermatozoide (Jonáková et al.,1998). El líquido seminal también contiene sustancia que inhiben la capacitación. Entre los elementos decapacitantes presentes en el plasma seminal se encuentran inhibidores de la movilidad, estabilizadores del acrosoma e inhibidores de enzimas como ATPasa y la fosfolipasa A2. El plasma seminal ejerce también un papel de protector antioxidante fundamental en el mantenimiento de la integridad de los espermatozoide (Sanz et al., 2001).

El estudio de la anatomía de las glándulas sexuales accesorias es fundamental para comprender la composición del plasma.

### **Glándulas vesiculares**

Las glándulas vesiculares se encuentran en par, miden de 12 a 15 cm de largo, de 5 a 8 cm de ancho y tienen de 4 a 5 cm de grosor, pesan entre 125 y 170 g cada una y se extienden dentro de la cavidad abdominal, son de forma piramidal abarcando tres lados; el primer lado es que cubre la parte caudal de la vejiga y el ureter, el segundo lado se encuentra cubriendo al conducto deferente y el cuerpo de la próstata, el tercer lado cubre la parte craneal de la uretra y la glándulas bulbouretrales como se observa en la Fig.6 Las glándulas vesiculares tienen una estructura tubular y están incluidas en una cápsula de tejido fibroso muy delgado. A partir de ellas emergen conductos de paredes muy delgadas que convergen en un conducto excretor más pequeño (Sisson y Grossman, 1994). Estas glándulas presentan un epitelio glandular columnar simple. Los conductos excretores están revestidos por un epitelio columnar estratificado. Las subdivisiones lobulares contienen una lamina propia de la submucosa que consiste en un tejido areolar. Las glándulas vesiculares vierten sus secreciones al conducto deferente por medio del conducto excretor. Teniendo las secreciones una apariencia turbia (Sisson y Grossman, 1994) y formadas principalmente de fructosa, en una concentración de 3.1 a 6.2 mM (Settchell et al., 1994; Hafez, 2000), este compuesto nutre al espermatozoide y le permite sobrevivir, se forma a partir de la glucosa sanguínea en las vesículas seminales y de un compuesto intermediario llamado Sorbitol; en las glándulas vesiculares también hay presencia de ácido cítrico [ 29 – 32 mM ] , ergotioneína [ 1.8 – 3.8 mM ] e inositol , este último compuesto se forma en grandes cantidades [ 100-134mM ], hasta el punto que se considera a las glándulas vesiculares del cerdo la fuente más rica de inositol. Las proteínas se encuentran a una concentración de entre 80 y 112 mg / ml (Hafez 2000; Settchell et al., 1994).

## **Próstata**

La próstata se encuentra formada por cuerpo y parte diseminada. El cuerpo mide 2.5 cm de ancho y cubre el cuello de la vejiga y uretra en su unión, está oculta por las glándulas vesiculares (Sisson y Grossman, 1994). La glándula prostática es una estructura tuboloalveolar, que está revestida por células secretoras en configuración cuboidal, estas células tienen vesículas apicales que indican una actividad secretora de tipo apócrino, también hay presencia de gránulos acidófilos y gotas lipídicas. El cuerpo de la glándula está formada por una cápsula de tejido conjuntivo blanco denso que es continuo con el tejido conjuntivo areolar de la lamina propia de la submucosa. La parte diseminada forma una capa que rodea la parte pélvica de la uretra y está rodeada por un tejido conjuntivo areolar en la lamina propia de la submucosa. Los principales productos de secreción de esta glándula son: enzimas glucolíticas, nucleasas, nucleotidasas y enzimas lisosómicas incluyendo proteinasas, fosfatasas y glucosidasas (Hafez, 2000).

## **Glándulas bulbouretrales**

Las glándulas se encuentran en par y miden aproximadamente 12 cm de longitud y de 2.5-3 cm de ancho. Tienen forma ligeramente cilíndrica y descienden a los lados y sobre los dos tercios caudales de la uretra pelviana (fig 6). Están parcialmente cubiertas por una capa de músculo estriado (*m. Bulboglandularis*) y posee una superficie lobulada. Cada glándula tiene un conducto excretor que la abandona en la parte caudal, perforando la pared dorsal de la uretra en el arco isquial y se abre en saco cubierto por pliegues de mucosa (Sisson y Grossman 1994), donde vierten sus secreciones de consistencia gelatinosa, las cuales están formadas principalmente de musina (Hafez 2000; Settle et al., 1994). La musina es una glicoproteína, en la que el oligosacárido se enlaza por la unión O-glicosídica al aminoácido Serina (Ser) o Treonina (Tre), como lo muestra la (Hicks 1988).

## **PROTEINAS EN EL LIQUIDO SEMINAL**

Schellpfeffer and Hunter (1970) encontraron que las proteínas solo contribuían en el 2.7% de la composición química del plasma seminal. Y que en su gran mayoría estas son producidas por las vesículas seminales. Actualmente se conoce que las proteínas son los principales componentes del líquido seminal y que tienen importantes funciones como: mantienen la osmolaridad, nutren a los espermatozoides, están involucradas en el proceso de maduración, capacitación, protección y en la unión de los gametos (Zhu et al., 2000).

En 1970 Schellpfeffer y Hunter clasificaron a las proteínas en tres grupos de acuerdo a su origen y a su peso molecular: grupo I, las proteínas que son originadas en las vesículas seminales teniendo en promedio un peso molecular de 55,000 Da; grupo II, las proteínas de origen epididimal y en menor proporción la

participación de glándula prostática y glándulas bulbouretrales, que tienen un peso molecular de 155,000 Da; grupo III, proviene de las secreciones de epidídimo en menor cantidad que el anterior, teniendo un peso molecular de 34,000 Da.

Dostál y Veselský en 1972 dividen a las proteínas en cuatro grupos resultado de su paso por una columna de sephadex G-100, el primero agrupa a las que provienen de las vesículas seminales, de la cola del epidídimo y de la próstata, con un peso molecular de al menos 150,000 Da, (el segundo grupo fue para proteínas del suero sanguíneo, el cual no fue tomado en cuenta). El tercer grupo son proteínas de vesículas seminales, cola del epidídimo y próstata con un peso de 69,000 Da. En el cuarto grupo de 34,000 Da proveniente de vesículas seminales y próstata. El quinto de 12,000 a 14,000 Da provenientes de la cola del epidídimo y la próstata.

El avance de la tecnología en materia de cromatografía de exclusión permite hoy en día obtener a las proteínas de acuerdo con su peso molecular específico y a través de estudios *in vitro* determinar su función, por lo que se les asigna una nomenclatura acorde a la función que realizan, por lo que las describiremos de esta forma.

### **Espermadhesinas**

Las espermadhesinas de cerdo son proteínas de la familia de las que se unen a carbohidratos. Entre ellas se encuentran la AQN-1, PSP-I (Protein Seminal Plasm), PSP-II, AQN-3, AWN-1, AWN-2, pB1 estas son secretadas principalmente del epitelio de las vesículas seminales, exceptuando la AWN-1 la cual es sintetizada por el túbulo recto y las células epiteliales de la rete testis. Según Calvete et al., (1995), las espermadhesinas representan el 80% de la proteínas totales del fluido seminal ; y Yang (1998), encuentra que PSP I y PSP II, representan el 50%.

Las espermadhesinas de cerdo se adhieren a la superficie del espermatozoide en la capa del acrosoma, y tienen una importante función en la capacitación del espermatozoide y la organización y unión de los gametos (Parry et al., 1992). Las proteínas del plasma seminal de bajo peso molecular, que se originan en el epidídimo y se adhieren al espermatozoide en su paso a través del conducto deferente, son consideradas candidatos para ser el receptor de la unión primaria del espermatozoide a la zona pelúcida (Capkova and Peknicova 1997).

Las espermadhesinas tienen afinidad o no a la heparina, y pueden tener un efecto irreversible estimulando la descapacitación o estabilización de la membrana acrosomal del espermatozoide (Maxwell and Jonson, 1999; Jonákonvá et al., 1998; Calvete et al., 1997).

## Espermadhesinas que se unen a la heparina

Las cadenas de proteoglicanos parecidos a la heparina existen en el tracto reproductor femenino, particularmente en el oviducto, en los fluidos foliculares y en la matriz extracelular de las células del cumulus (Miller and Ax 1990). Sobre la similitud de heparina con cadenas de proteoglicanos se realizaron estudios *in vitro* (Sanz Libia et al., 1993), donde encuentran que la heparina se une a receptores específicos localizados sobre la superficie de la cabeza del espermatozoide y facilita la reacción acrosomal, cuando se realiza la interacción espermatozoide con la zona pelúcida del ovocito

Algunas proteínas unidas a la heparina asociadas con el esperma son originadas de plasma seminal y son denominadas colectivamente "factores de capacitación extrínsecos" (Florman and First, 1988 a.). La interacción del espermatozoide con la heparina inicia con efectos similares como los que hace la interacción de espermatozoides con la glicoproteína 3 (Zp3) de la zona pelúcida del ovocito (aumento de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y alcalinización intracelular)(Jonákova et al., 1998; Florman and Babcock, 1991).

La familia de las espermadhesinas AQN, AWN y PSP I, interactúan con la zona pelúcida, algunas tienen afinidad por la heparina y se unen a proteasas, se sabe que esta capacidad de unión es dependiente de su glicosilación (Jonákova V., et. al.; 1998). AQN-1, AQN-3 y AWN, pertenecen a la familia de las proteínas que se unen a los carbohidratos (Calvete et al., 1997, Solis et al., 1995), cubren la superficie acrosomal del espermatozoide, juegan un papel importante en la capacitación de este, en el reconocimiento del gameto y su unión a la zona pelúcida (carbohidratos-proteína o proteína- proteína) (Calvete et al., 1997).

La AWN ha sido encontrada en la cubierta del espermatozoide de cerdo en la unión útero-tubal de cerdas inseminadas, lo cual sugiere que la AWN acompaña al espermatozoide hasta el momento de la fertilización (Calvete et al., 1996).

Cuadro 2. Espermadhesinas unidas a la heparina

Heparina a la que se une	Proteína	Peso de la proteína (Kda)
BHB-2	DQH	13
BHB-3	AQN-1	13
BHB-4	AQN-2	14,16
BHB-5	AQN-3	12
BHB-6	HNK	14
	AWN-1	16,17
BHB-7	AWN-1	14
BHB-8	AWN-1	14
	P-70	70
BHB-9	AWN-2	16

(Jonákova et. al.; 1998)

La identificación y secuencia de aminoácidos(aa) de las espermadhesinas fue realizada por Calvete y Jonákova de forma independiente. La proteína AQN I tiene una secuencia de 112 aa , AQN 3 tiene una secuencia de 116 aa y AWN tiene una secuencia de 133 aa Calvete et al., 1995; Jonákova et al., 1998).

La proteína DQH (también referida como pB1) (cuadro 3), ha sido recientemente descubierta. Jonákova refiere un peso de 14 Kda. Sin embargo, Plucienniczak refiere un peso de 54 kDa para esta misma proteína. Tiene una secuencia de 130 aminoácidos. Se encuentra en la superficie del espermatozoide y es homologa a las proteínas ácidas del plasma seminal del toro y del caballo (Jonákova et al., 1998; Plucienniczak et al., 1999).

Cuadro 3. Secuencia de aminoácidos de pB1

M	A	P	R	L	G	I	F	L	L	W	A	G	V	S	V	F	L	P	L	D	P	V	N	G	D	Q	H	L	-	-	-	-	-	P	G	R	F	L	T	
-	-	-	P	A	I	T	S	D	D	K	C	V	F	P	F	I	Y	K	G	N	L	Y	F	D	C	T	L	H	D	S	T	Y	Y	W	C	S	V	T	T	
Y	Y	M	K	R	W	R	Y	C	R	S	T	D	Y	A	R	C	A	L	P	F	I	F	R	G	K	E	Y	D	S	C	I	K	E	G	S	V	F	S	K	
Y	W	C	P	V	T	P	N	Y	D	Q	D	R	A	W	R	Y	C																							

### Espermadhesinas que no se unen a la heparina

Las espermadhesinas que no se unen a la heparina están presentes en el plasma en forma de heterodímeros (PSP dímero) que son PSP I y PSP II (Leshen, et al., 1998), realizan la unión carbohidrato-proteína por lo cual también son llamadas glicoproteínas, uniéndose a polisacáridos sulfatados (Solis, D., et. al. 1998). La PSP I y PSP II son los mayores componentes del plasma, teniendo un peso molecular de 13-14 Kda (Leshen et al., 1998; Rutherford et al., 1992) y se encuentran involucradas en funciones reproductivas, como son, prevenir la reacción acrosomal y además presentan una función inmunosupresiva (Leshen et al., 1998).

La proteína PSP-I tiene la capacidad de unirse a un gran número de proteínas como la  $\alpha$ -caseína, IgA e IgG y  $\beta$ -galactosidasa (Leshin et al., 1998; Kwok et al., 1993 a). Otros autores (Kwok et al., 1993 b) indican que la PSP-I tiene la función de prevenir una reacción acrosomal prematura.

Algunas investigaciones sugieren que las PSP pueden estar involucradas en la regulación de la actividad inmune uterina en las siguientes formas:

1).- La PSP-I se une a varias proteínas incluyendo las IgG e IgA (Kwok et al., 1993 a);

2).- El plasma seminal porcino es un mediador potencial de la inflamación del útero después de la monta en el cerdo (Hadgisavas et al., 1994; Bischof et al., 1994), y

3).- Muchas proteínas que componen el plasma seminal de diversas especies son capaces de suprimir la actividad de los linfocitos *in vivo* e *in vitro* (Franken and Slabber, 1981).

Estudios realizados por Kwok et al. (1993) y por Leshin et al. (1998), demuestran que las proteínas PSP por si mismas no son antígenos mitogénicos para los linfocitos porcinos, pero tienen un efecto estimulante sobre la actividad linfocítica iniciada por PWM o por antígenos de la superficie de los linfocitos, por lo que Yang et al., (1998), sugiere la posibilidad de que las PSP estén involucradas en el mantenimiento de un medio ambiente estéril en el lumen uterino y en la eliminación de otros desechos celulares después de la fertilización.

A la determinación de las funciones de las PSP siguió la determinación de sus secuencias de aminoácidos. El peso molecular de la proteína PSP I es de 11,982 Da y tiene una secuencia de 110 aminoácidos (cuadro 4), la PSP II tiene un peso molecular de 12,410 ± 8Da con una secuencia de 116 aminoácidos (cuadro 5) (Calvete et al., 1995; Varela et al., 1997)

La secuencia de aminoácidos de la PSP-I y PSP-II son similares, encontrándose zonas específicas que se unen a la zona pelúcida ó interaccionan con la membrana del espermatozoide y que sirven para realizar la unión espermatozoide ovocito.

Cuadro 4. Secuencia de aminoácidos de la PSP

			L	D	Y	H	A	C	G	G	R	L	T	D	D	Y	G	T	I	F	T	Y	K	G	G	K	T	E	C	V	W	T	L	Q	V	D	P	K	Y
K	L	L	V	S	I	P	T	L	N	L	T	C	G	K	E	Y	V	E	V	L	E	G	A	P	G	S	K	S	L	G	K	F	C	E	G	L	S	I	L
N	R	G	S	S	-	G	M	T	V	K	Y	K	R	D	S	G	H	P	A	S	P	Y	E	I	I	F	L	R	D	S	Q	G							

Cuadro 5. Secuencia de aminoácidos de la PSP -II

A	R	I	N	G	P	D	E	C	G	R	V	I	K	D	T	S	G	S	I	S	N	T	D	R	Q	K	N	L	C	T	W	T	I	L	M	K	P	D	Q
K	V	R	M	A	I	P	Y	L	N	L	A	C	G	K	E	Y	V	E	V	F	D	G	L	L	S	G	P	S	Y	G	K	L	C	A	G	A	A	I	V
F	L	S	T	A	N	T	M	T	I	K	Y	N	R	I	S	G	N	S	S	S	P	F	L	I	Y	F	Y	G	S	S	P	G	S	E	Y				

### Proteína de 17 KDa.

La proteína de 17 kda es originada en las glándulas vesiculares, se encuentra en el plasma seminal y se adhiere a la superficie del espermatozoide (Moos et al., 1992). La presencia de esta proteína tanto en el plasma como en los espermatozoides fue demostrado utilizando como modelo membranas plasmáticas de espermatozoides provenientes de la cola del epidídimo, incubadas o no en fluidos de vesículas seminales, comparando las membranas del espermatozoide sin incubar con la incubadas; se encontró que grandes cantidades de proteína de 17 KDa son adheridas a las células espermáticas por la secreción de las vesículas seminales (Moos et al., 1992).

Otros autores (Capkova and Peknicova, 1997) realizaron estudios con la proteína de la superficie del espermatozoide de 17 Kda denominada ACR3. Para esto

incubaron ovocitos porcinos con el plasma seminal total o con la proteína ACR3 purificada. El resultado fue que se redujeron las uniones de ovocito-espermatozoide. Estos autores reportan que la unión del espermatozoide de cerdo a la zona pelúcida de ovocitos porcinos decrece significativamente después del tratamiento con plasma seminal o con ACR3 purificado. Por lo que se observó que el plasma seminal puede tener efectos inhibidores para la unión de los gametos. Además la proteína de 17 kDa tiene una importante función en regular la capacitación del esperma y la sobrevivencia de éste en el tracto genital femenino (Capkova and Peknicova 1997)

### **Proteína anti-aglutinación de 25 kDa.**

La proteína antiaglutinación está presente en el plasma seminal, y se produce en el epidídimo en sus tres porciones. Fue determinada por observaciones inmunohistoquímicas del espermatozoide, detectando la proteína uniformemente sobre la región acrosomal y el segmento ecuatorial, en la pieza media y en el tallo de algunos espermatozoides. La función de esta proteína es inhibir la aglutinación de cabeza con cabeza de los espermatozoides, para que pueda realizarse la capacitación y con ella la reacción acrosomal (Harayama et al., 1999; Harayama et al., 2000).

### **Proteína de 100- 110 kDa.**

La proteína de 100-110 kDa se origina en las vesículas seminales (Kwok et al., 1993) y tiene una función inmunosupresora que protege al espermatozoide del ataque inmunológico durante el transporte a través del tracto reproductor femenino. Su función es similar a la que desempeña la PSP1 sin embargo la diferencia de pesos molecular es muy grande, algunos autores (Kwok et al., 1993) sugieren que existe la posibilidad que sea un agregado de la PSP I, pero aún no es claro. La proteína de 100-110 kDa presente en el plasma seminal actúa previniendo un ataque inmunológico temprano por parte del sistema inmunológico de la hembra contra el ovocito fertilizado. La adición de esta proteína a la dosis de inseminación artificial en el cual el plasma ha sido diluido, puede mejorar la prolificidad (Claus 1990).

### **Enzimas**

Los espermatozoides de cerdo son muy sensibles a la oxidación por peroxidación de lípidos (Brzezińska- Ślebodzińska et al., 1995). En un estudio realizado utilizando ascorbato ferroso para inducir la peroxidación de lípidos, se encontró que existe variación estacional en la sensibilidad del semen de cerdo, ya que durante el invierno hay una alta peroxidación de lípidos y en primavera es muy baja. Aun sin la intervención del ascorbato ferroso, el espermatozoide presenta niveles altos de peroxidación de lípidos (Brzezińska- Ślebodzińska et al., 1995).

La peroxidación de lípidos es determinante en el tiempo de vida del espermatozoide, afectando la preservación de semen para la inseminación

artificial. El proceso de peroxidación induce alteraciones estructurales, particularmente en la región acrosomal del espermatozoide, causando una movilidad baja y un cambio en el metabolismo (Beconi et al., 1993). Para disminuir estas alteraciones en el semen, existen enzimas en el plasma seminal provenientes del epididimo, que tienen la función de prevenir el daño oxidativo, tales como catalasa, glutatión peroxidosa y superóxido dismutasa (Williams, et al., 1998).

## **FUNCIONES DEL LÍQUIDO SEMINAL.**

### **Como diluyente:**

El plasma seminal al funcionar como diluyente y vehículo para los espermatozoides, tiene un efecto estimulante sobre la movilidad espermática en el momento de la eyaculación, esto se conoce como "efecto dilución " y es otorgado por la presencia de sustancia como iones, cationes y proteínas de alto y bajo peso molecular, las cuales son secretadas por las glándulas sexuales accesorias. Sin embargo dichas sustancias no detienen el deterioro de los espermatozoide por un tiempo prolongado, por lo que para la inseminación artificial se utilizan compuestos exógenos incluidos en los diluyentes para interrumpir el daño a la membrana acrosomal espermatozoide; como los amortiguadores del pH, principalmente el Citrato de Sodio y el Bicarbonato de Sodio (Maxwell and Jonson, 1999).

Los requerimientos de un medio de almacenamiento (ó diluyente) ya han sido establecidos y fueron compilados por Watson (1990). Los factores importantes del medio ó diluyente son el pH, potencial iónico y tipo de iones. Sustancia antimicrobianas también son comúnmente incluidas en los diluyentes.

Los diluyentes tienen la función de prolongar el tiempo de vida del espermatozoide, pero cuando se realiza una dilución excesiva hay alteraciones en la estructura y función del espermatozoide afectando la integridad de membrana y disminución en la tasa de fertilidad (Watson 1995). Para poder conocer el daño en el espermatozoide por dichas alteraciones se realiza la prueba *in vitro* de calidad del esperma a través de la capacidad fertilizante, midiendo los parámetros de viabilidad, movilidad, morfología acrosomal, integridad de la membrana, actividad de enzimas específicas y la interacción esperma ovocito (Waberski et al., 1994). Para prevenir el daño de los espermatozoides ocasionado por la cantidad de diluyente agregado al semen, se toma en cuenta tres importantes factores: A) calidad del semen, B) concentración de espermatozoides por dosis en IA, C) cantidad y tipo de diluyente (Waberski et al., 1994). Sin embargo, algunos diluyentes no son completamente aptos para prevenir futuros cambios esenciales en el espermatozoide que pueden ocurrir en condiciones *in vitro* (Alexopoulos et

al., 1996). Algunos de los cambios estructurales y bioquímicos de los espermatozoides pueden dar como resultado una reducción significativa en la eficiencia para inseminar y capacidad para fertilizar (Korniewicz et al., 1996). Los mecanismos moleculares responsables del deterioro del espermatozoide durante el almacenamiento *in vitro* no están claros. Los cambios estructurales en la membrana del esperma así como las propiedades de la membrana son las responsables del decremento en la habilidad para almacenarse y fertilizar células (Lyczynski and Kolat, 1996).

### **Función del plasma en la fertilidad**

La cerda es una especie polítoca con ovulación espontánea. La ocurrencia del reflejo de la cerda de quedarse inmóvil al aplicarse presión sobre el área de la cadera es visto como el principal signo de ovulación y se da al mismo tiempo que la cascada de eventos fisiológicos que tienen como fin la fertilización.

El plasma seminal adelanta la ovulación de las cerdas aumentando las probabilidades de fertilización. La infusión de plasma seminal en un cuerno uterino adelanta la ovulación en el ovario contiguo, actuando además como un promotor del transporte pasivo de los espermatozoides y aumentando las contracciones uterinas y la relajación del istmo tubal (Waberski, 1996).

La  $PGF2\alpha$  del líquido seminal una vez dentro del tracto femenino, pasa a la arteria ovárica, se desplaza hasta el folículo incrementando la cantidad de ella en el líquido folicular y con ello provocando la ruptura de éste, de la misma manera el estradiol incrementa la contractilidad del útero con lo que se logran contracciones de la pared que favorecen el desplazamiento de los espermatozoides a través de los canales de subida del moco vaginal, ambos mecanismos favorecen la fertilización (Claus, 1990).

Se ha reportado una reducción en la fertilidad de los espermatozoides de cerdo después de exponerlos al líquido seminal, sin embargo también se reporta un efecto favorable en la movilidad espermática (Waberski et al., 1994 b, por lo que la presencia o ausencia de ciertos componentes (probablemente proteínas) en él, pueden ser los responsables de los efectos en la fertilidad de los espermatozoides (Maxwell and Johnson 1999).

### **SEMEN**

Se denomina semen al fluido que es eyaculado del tracto masculino de los mamíferos, en el cerdo tiene un volumen promedio de 150-250 ml; del 20 al 30% consiste de espermatozoides y el resto es fluido de las glándulas (Ax et al., 2000).

Por su apariencia se divide en tres fracciones; la primera es la fracción pre-espermática con un volumen de 5-15 ml, de apariencia translúcida y fácilmente identificable, mezclado con una sustancia gelatinosa llamada "tapioca", proveniente principalmente de las secreciones de las glándulas bulbouretrales y

próstata, la segunda fracción es un fluido de coloración cremosa y es denominada espermática, mezclada con secreciones de las glándulas vesiculares y próstata, la tercera es translúcida, poco densa y mezclada con secreciones de glándulas vesiculares y glándulas bulbouretrales (Einarsson, 1980; Ax et al., 2000).

El semen para fines prácticos se ha manejado en fracciones. Se han realizando diferentes estudios sobre la división del eyaculado. Johnson et al., (1981) lo dividen en tres fracciones, desechando la primer fracción, la segunda la recolecto y la tercera la modifico al unirla con una parte de la fracción 2 al momento de la eyaculación, obteniendo 2 fracciones de alta concentración. Fraser (1982) divide en cuatro fracciones al eyaculado, las tres primeras son divididas como pre-espermática, espermática y post-espermática y la ultima es solamente el gel "tapioca". En trabajos posteriores (Xu et al., 1996) dividen al eyaculado en tres fracciones, observando que la primera y segunda fracción son la de mejor calidad y concentración, esto es porque al dividir el eyaculado desechan la porción pobre en espermatozoides, y toma como primera fracción el inicio de la segunda fracción (espermática), la segunda fracción para ellos es el intermedio entre la fracción espermática y post-espermática y por último la tercera fracción obtenida es la restante fracción postespermática, coincidiendo en esta última con estudio realizados por Einarsson (1980). Zhu J. et al (2000) toman este misma técnica para separar su fracciones, y realizan fertilización *in vitro* obteniendo como resultados que la primera y tercera fracción tiene una alta tasa de penetración en el ovocito en relación a la segunda fracción.

La variabilidad e de las diferentes fracciones puede ser afectada por el volumen total del eyaculado y su la concentración de espermatozoides pueden estar influenciadas por las edad, medio ambiente, salud, proceso de colección del semen, frecuencia de colección y raza. Estos factores pueden actuar negativamente sobre la producción espermática del semental provocando ciertas alteraciones cualitativas y cuantitativas repercutiendo a corto plazo en la productividad del semental (Ax et al., 2000).

### **Concentración espermática y pH del eyaculado.**

El eyaculado del cerdo generalmente se divide en tres fracciones, siendo la segunda la que es más útil, ya que es la que más espermatozoides contiene tanto en total como por mililitro (Ciereszko et al., 2000).

El eyaculado del cerdo, en comparación con otras especies presenta características diferentes, como puede observarse en el cuadro 6.

Cuadro 6. Comparación de las características del semen.

	Toro	Cerdo	Carnero
Volumen (ml)	4 (2-10)	250 (50-400)	1.0 (0.2-3.0)
Color	Blanco	Turbio	Cremoso
Consistencia	Crema fluida	1) fluido claro 2) gel en pequeña cantidad 3) Fluido opaco 4) Gel en gran cantidad	Viscoso
pH	6.4-6.8	7.3-7.9	6.2-6.8
Concentración mill/ml	1000	100	2000
Vida fértil <i>in vitro</i>	Algo mas de 3 días	1 día	1-2 días
Observaciones	El volumen eyaculado tiende a incrementarse respecto a la edad hasta los 5 años (jóvenes 2 ml y 5 años 6 ml)	El fluido opaco es rico en espermatozoides, la segunda y la última fracción contienen un gel coalescente como tapioca	La morfología del esperma puede deteriorarse ligeramente fuera de la estación de cría

(Fraser 1982).

Cuadro7. características normales del eyaculado de cerdo

	Garner 2000	Bearden 1995
volumen (ml)	150-200	225
Concentración (millones/ml)	200-300	200
pH	7.3-7.8	6.8-7.5

Tal como se observa en el cuadro 6, el volumen del eyaculado del toro y del carnero presenta una cantidad considerablemente menor en relación al cerdo que es inversamente proporcional a la concentración espermática en todas y cada una de las especies anteriormente citadas.

En el semen humano se han hecho diversos estudios referentes a su composición y se ha encontrado que presenta sustancias específicas que se encargan de balancear el pH, pero aun no hay nada claro sobre la presencia de dichas sustancias en el semen de cerdo. En dichos estudios se ha observado la presencia de estructuras membranosas con un diámetro de entre 150 a 200 nm, llamadas prostasomas; secretadas por la glándula prostática, conteniendo grandes cantidades de colesterol, esfingomiélin,  $Ca^{++}$ , proteínas (algunas de las cuales son enzimas) y pequeñas moléculas que se cree, participan en la respuesta inmune, la composición del líquido seminal y la movilidad espermática (Sanz et al., 2001). Estudios anteriores plantearon que las prostasomas ejercen un efecto protector sobre los espermias frente a las condiciones de acidez de la secreción vaginal, incrementando los porcentajes de movilidad espermática, sin afectar el tipo de movilidad de estos (rectilíneo) (Arienti et al., 1999). Este mismo autor anteriormente observó que los prostasomas pueden fusionarse a los

espermatozoides presentes en un pH ácido de aproximadamente 4.5, pero esta fusión no ocurre con un pH de 7.5; la forma en que las prostasomas protegen a los espermatozoides presentes en un semen de pH ácido es modificando la composición de la membrana adicionando colesterol, esfingiomelina y glicorofosfolípidos saturados, lo que proporciona mayor estabilización, previniendo la reacción acrosomal prematura (Arienti et al., 1998).

### **Factores descapacitantes**

Al momento de la eyaculación, los espermatozoides pasan de un medio ambiente estable benéfico en el epidídimo a un medio ambiente agresivo en el tracto reproductivo femenino. Los eventos que ocurren en ese momento (llamados capacitación y reacción acrosomal) desestabilizan la membrana plasmática del espermatozoide y conducen finalmente a la muerte del espermatozoide si no encuentra un ovocito. Para prevenir que estos eventos ocurran, factores estabilizantes son absorbidos por la superficie del espermatozoide en el epidídimo y/o cuando el espermatozoide se mezcla con el plasma seminal. Esos factores, conocidos como factores de descapacitación, estabilizan la membrana plasmática del espermatozoide, previniendo la capacitación prematura que puede ocurrir en el tracto reproductivo masculino o femenino. Esos factores de descapacitación se ha demostrado que son glicoproteínas, esteroides y posiblemente lípidos. Al parecer una proteína en el plasma seminal es absorbida por el espermatozoide *in vitro* y produce la reacción acrosomal inducida por la zona pelúcida (Parrish and First 1993).

Este termino fue originado por Chang (1957) quien demostró que los espermatozoides que habían sido capacitados podían ser descapacitados por la adición de plasma seminal .

Sobre la presencia de factores de descapacitación presentes en el plasma seminal, se estudió *in vitro* la capacidad fertilizante de espermatozoides epididimarios de cerdo congelados y se encontró que fue mejor que la de espermatozoides de eyaculado completo. Este estudio demuestra la ausencia del factor de descapacitación en el epididimo, se sugiere que este factor puede ser adicionado a los espermatozoides en el plasma seminal ( Rath and Nieman, 1997). Sin embargo, la presencia del plasma seminal incrementa la resistencia del espermatozoide para sobrevivir al congelamiento y posterior descongelamiento, observándose que cuando los espermatozoides de cerdo fueron descongelados en presencia del plasma seminal previo a la inseminación, su intervalo de retención en el oviducto fue más prolongado, comparándose con los que no presentaban plasma seminal al momento de la descongelación, encontrándose en estos últimos aumento de daño acrosomal, después del choque por frío (Maxwell and Johnson 1999). El plasma seminal desempeña un papel importante en el momento de la inseminación artificial; ya que promueve el transporte pasivo del espermatozoide y mejora las contracciones uterinas y relajación del istmo tubal (Wabersky 1996).

## **Transporte del espermatozoide en el tracto reproductivo femenino.**

El lugar donde el semen es depositado en la cerda es en el cérvix. El movimiento del espermatozoide por el tracto reproductivo femenino después de la deposición de semen ha sido referido como transporte espermático. Este ha sido dividido clásicamente en dos fases, una fase rápida y una fase lenta sostenida. La fase lenta sostenida puede ser además dividida por la adición de una fase oviductal de transporte espermático. La fase rápida es caracterizada por contracciones del tracto femenino que impulsan al espermatozoide a través del útero y hacia arriba del oviducto. Esta fase dura de 5 a 15 minutos después de la deposición del semen (Parrish and First, 1993).

Durante la fase lenta sostenida de transporte espermático, los espermatozoides se mueven del cérvix hacia el istmo del oviducto. En contraste al transporte espermático rápido, la fase lenta sostenida puede tomar horas. Después de su entrada al útero, los espermatozoides involucrados en el transporte lento sostenido rápidamente se unen a las células epiteliales uterinas. Muchos de esos espermatozoides pueden después separarse y moverse hacia arriba de 2 a 3 centímetros del istmo cerca de la unión útero-tubal. Aquí se localiza el más importante reservorio espermático en las hembras de mamíferos domésticos. La restricción de espermatozoides a esta región del istmo puede ser debido al medio ambiente iónico del fluido del oviducto ó a la unión del espermatozoide a las células ciliadas del oviducto (Parrish and First, 1993).

La última fase del transporte espermático es la fase oviductal. Esta involucra movimientos del espermatozoide de la parte baja del istmo hacia el sitio de fertilización. Está demostrado que los espermatozoides involucrados en la fertilización se encuentran localizados en el reservorio espermático del istmo antes de la ovulación en la vaca, cerda y oveja (Parrish and First, 1993).

## **CAPACITACIÓN ESPERMÁTICA.**

Los espermatozoides adquieren la capacidad de fertilizar, después de haber permanecido en el tracto reproductor femenino por un tiempo determinado de 6-24hrs, y durante este lapso los componentes estructurales del espermatozoide cambian, a este proceso se le conoce como capacitación (Claus, 1990).

En 1951 se observó que la fertilización no ocurría hasta algunas horas (10-12h) después de que los espermatozoides fueron colocados dentro del útero de ratas y conejos. A este periodo de tiempo y a todos los eventos que le ocurren al espermatozoide antes de la fusión del espermatozoide con el ovocito, se le llamó capacitación (Parrish and First, 1993).

El fluido del oviducto de animales en estro parece ser capaz de causar la capacitación, en bovinos, un glicoaminoglucano parecido a la heparina presente en las secreciones del oviducto induce la capacitación de espermatozoides de toro.

(Gadella et al., 1999; Parrish and First 1993). Por lo que este proceso no se realiza en un punto exacto, sino a través de todo el tracto femenino.

El cambio inicial en la membrana espermática durante la capacitación se propone es una remoción de las proteínas periféricas de origen epididimal y/o del plasma seminal, también llamados factores de descapacitación (Tardif et al., 1999). Si bien los cambios en la membrana espermática son importantes para la capacitación, otros cambios en movilidad, metabolismo celular, niveles de cAMP e iones intracelulares también ocurren y pueden estar directamente e indirectamente relacionados con los cambios en la membrana plasmática. El único cambio visible en el espermatozoide durante la capacitación es una alteración en la movilidad tanto *in vitro* como *in vivo* que ha sido reportado en varias especies y que consiste en movimientos de látigo del flagelo. Los cambios de la membrana también afectan la permeabilidad iónica y subsecuentemente el medio ambiente intracelular del espermatozoide, regulando la actividad enzimática involucrada en los movimientos del flagelo. De estudios realizados principalmente *in vitro* se concluye que al parecer la capacitación esta asociada con un incremento general del metabolismo espermático. Es posible que los cambios en la membrana plasmática del espermatozoide durante la capacitación directamente regulen los cambios en el medio ambiente iónico intracelular. En espermatozoides de bovino, un aumento de  $Ca^{2+}$  y un incremento del pH intracelular se ha reportado durante la capacitación. Esos cambios pueden también alterar la actividad enzimática. El calcio extracelular es requerido para completar la capacitación, aunque también es requerido para realizar la exocitosis acrosomal. La concentración de calcio intracelular aumenta durante la capacitación mediada por una ATPasa dependiente de calcio (Iwamoto et al., 1992; Harrison et al., 1996).

En el plasma seminal existen proteínas para la capacitación, las cuales son de la familia de la heparina ligada a la espermadhesina (Calvete et al., 1997). Para la descapacitación existen factores en el plasma seminal que revierten la capacitación espermática, y dan como resultado mayor cantidad de eventos que previenen la fertilización. En un experimento se adicionó plasma seminal de cerdo a espermatozoides previamente capacitados, posteriormente se pusieron en contacto con óvulos *in vivo*, y se observó que el plasma reduce los índices de óvulos penetrados y poliespermia. Estos datos indican que los espermatozoides capacitados asociados con plasma seminal reducen la capacidad de los mismos para fertilizar al ovocito tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* (Maxwell and Jonson, 1999).

## REACCIÓN ACROSOMAL

La reacción acrosomal es un proceso exocitótico e involucra la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa. Los contenidos del acrosoma son entonces expuestos al medio ambiente extracelular. Las enzimas en el acrosoma son activadas y ayudan al

espermatozoide en su movilización hacia la zona pelúcida. La reacción acrosomal es visible inicialmente en micrografías electrónicas por la aparición de pequeñas vesículas (Parrish and First 1993)

La reacción acrosomal es un proceso fisiológico natural que se presenta en el espermatozoide después de la capacitación. Mientras que la capacitación es un proceso reversible, la reacción acrosomal es un proceso irreversible (Harrison and Miller 2000).

En los espermatozoide capacitados de la mayoría de las especies puede inducirse la reacción acrosomal por zona pelúcida solubilizada y/o intacta. En espermatozoides de algunas especies como el hamster puede inducirse la reacción acrosomal por células del cumulus. La mayoría de la información sugiere que la reacción acrosomal ocurre en la zona pelúcida (Parrish and First 1993).

Los eventos moleculares exactos de la reacción acrosomal aún no están claros, solo el hecho de que es absolutamente dependiente de  $Ca^{2+}$ . La fusión entre la membrana plasmática y acrosomal externa, comienzan en un área limitada entre el borde y segmento ecuatorial y anterior del acrosoma y continúa extendiéndose de lado por enzima de la cabeza. Esto produce una desestabilización del capuchón acrosomal y la liberación del contenido acrosomal. La liberación de enzimas facilita la penetración del espermatozoide a la zona pelúcida (Bucker et al., 1995).

Se ha demostrado que existen diferencias importantes en la concentración espermática relacionado con la raza de cerdos . en un estudio en el que se comparó el efecto de la raza sobre la concentración espermática, estudiando las razas Landrace, Pietrain y una cruce de Pietrain-Duroc, se determinó que la que presenta mayor concentración espermática es la raza Pietrain con 547.8 millones por mililitro, seguida de la cruce de Pietrain-Duroc con 467.8 millones por mililitro, y por último la raza Landrace con 373.9 millones por mililitro. De este estudio puede concluirse que existe una marcada diferencia respecto a la concentración espermática determinado por la raza de la cual se ha extraído el semen (Ciereszko, A.; et. al. 2000).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunas Investigaciones reportan que los cerdos presentan un eyaculado en tres fracciones: preespermática, espermática y postespermática (Einarsson 1980). El plasma seminal de estas fracciones contiene varios componentes, entre ellos se encuentran las proteínas que pueden participar en la movilidad del espermatozoide, capacitación, descapitación y fertilización del ovocito. Las espermadhesinas son el principal grupo de proteínas presentes en el plasma seminal y están involucradas en la prevención de la reacción acrosomal prematura (Zhu et al., 1999).

Se ha demostrado que un péptido promotor de la fertilización está presente en la próstata de los mamíferos en altas concentraciones y se encarga de aumentar el potencial de fertilización de los espermatozoides. Al menos dos factores inhibidores de la motilidad espermática fueron identificados y purificados del semen porcino. En el eyaculado porcino, se ha descrito un grupo de proteínas que se unen a la zona pelucida del ovocito (ZBPB, 16-23 kDa). Masuda et al. (1979) citado por Zhu et al., 1999 ) que tienen concentraciones variables, así como de ácido cítrico y zinc, los cuales posiblemente están relacionados con la actividad de aglutinación del plasma seminal (Zhu et al., 1999).

Un parámetro importante del plasma seminal es el pH, que tiene efectos sobre el espermatozoide. En un estudio se encontró que los espermatozoides en un medio de pH 6.0-8.5 se obtienen porcentajes aceptables de movilidad; y en medios de pH por debajo de 6.0 la movilidad se reduce de un 20 al 100% (Makler et al. 1981).

Durante el coito de los animales de granja, el tracto femenino recibe el eyaculado completo del semental, sin embargo, en cerdos, durante la IA una práctica común en el campo es tirar la primera y tercera fracción del eyaculado, perdiéndose con ello aproximadamente el 30% de las células espermáticas, esta práctica se ha hecho de manera cotidiana sin tener fundamento de los beneficios o perjuicios del uso de las tres fracciones. En la literatura se carece de información sobre la composición química de cada una de ellas que pudieran orientar la decisión sobre su uso.

Sin duda, el pH y las proteínas del plasma son de los elementos más importantes para dotar al espermatozoide de un medio óptimo para su nutrición, transporte, supervivencia y capacidad fertilizante, por lo cual en este trabajo pretendemos contribuir al estudio de estos dos elementos químicos en el plasma seminal de las tres fracciones así como la composición y participación que estos tengan sobre las características espermáticas en cuatro razas de cerdos.

## OBJETIVO GENERAL:

Conocer el efecto del pH y la composición de la proteína de cada una de las tres fracciones de eyaculados de cerdo, sobre la concentración de espermatozoide, viabilidad, morfología e integridad acrosomal de los espermatozoides, así como las posibles variaciones que al respecto se tengan por efecto de raza.

## OBJETIVOS PARTICULARES:

-Evaluar los parámetros espermáticos, concentración espermática, viabilidad, morfología e integridad acrosomal de cada fracción del eyaculado en cuatro diferentes razas de cerdos.

-Medir el pH de cada fracción de eyaculado en cuatro razas diferentes.

-Determinar la concentración proteica y establecer el patrón electroforético de cada fracción de líquido seminal del eyaculado en cuatro diferentes razas.

-Evaluar el efecto de la composición química del eyaculado sobre la características espermáticas

-Evaluar el efecto de la raza sobre la composición química del plasma seminal y las características espermáticas

## HIPÓTESIS:

Los parámetros espermáticos de cada fracción dependen de la composición del líquido seminal y la raza del Cerdo.

## MATERIAL Y METODOS

### Material Biológico:

Se utilizaron cerdos sanos de raza pura y fertilidad probada, provenientes de centros de inseminación artificial de los estados de Puebla, Hidalgo, México y Distrito Federal. Los eyaculados incluidos en el estudio fueron aquellos con movilidad mayor al 75%, color y olor "sui generis". En total se emplearon 10 eyaculados de las razas Duroc, Yorkshire y Landrace y 9 Hampshire.

### OBTENCIÓN DE EYACULADOS

Empleando la técnica de la mano enguantada (Einarsson, 1980), se colectó cada fracción del eyaculado en el termo correspondiente, las primeras gotas no fueron colectadas, para evitar contaminación bacteriana.

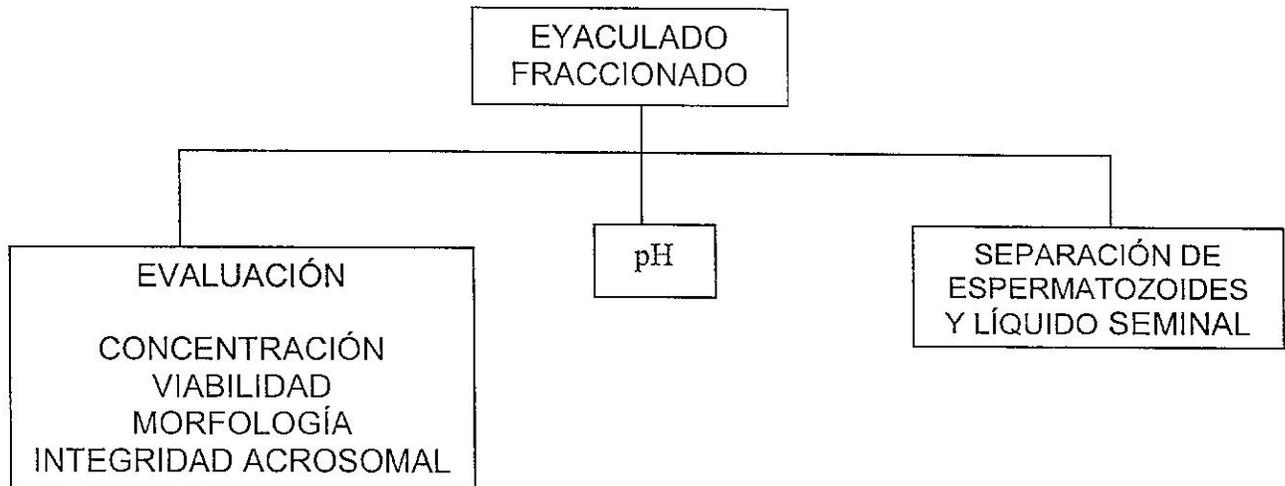
El referente visual de separación es:

Primera fracción: Líquido claro, poco denso acompañado de gel, cuando se empieza a perder la claridad del líquido se retiró el termo.

Segunda fracción: Una vez que el eyaculado es un líquido lechoso y denso se colectó aproximadamente 10 ml

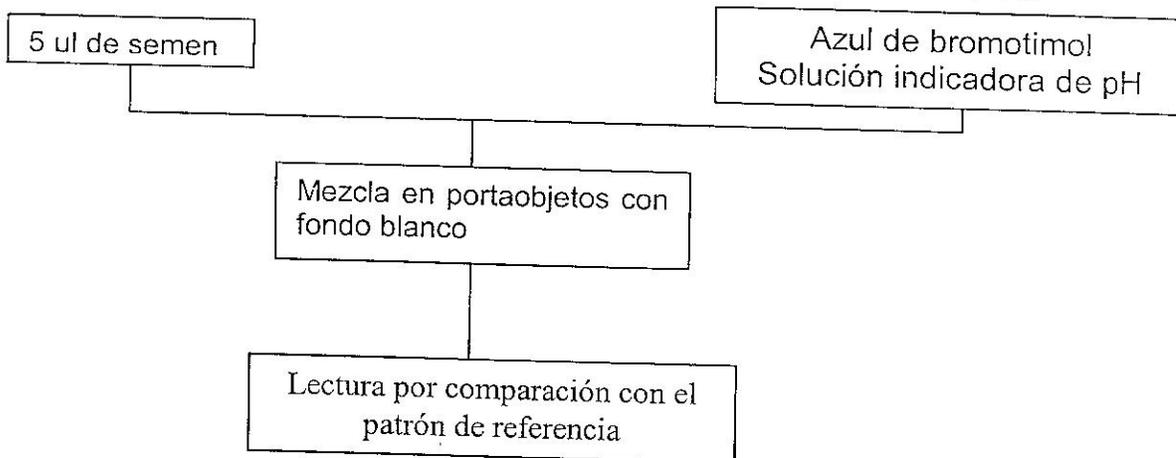
Tercera fracción: Cuando el eyaculado se vuelve a tornar claro, poco denso y se incrementa la cantidad de gel se colectó hasta que concluye la eyaculación.

### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS



Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y obtenidos a través de Sigma Chemical Co., JT Baker SA de CV., Merk Chem Co., Bio-Rad Laboratories, ICN Flow y Boehringer.

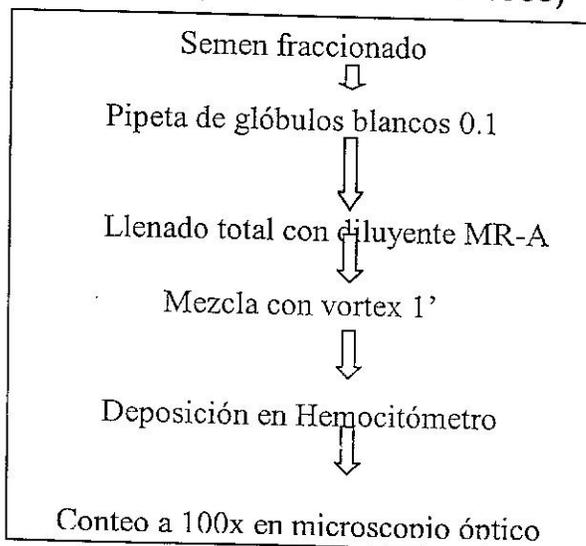
### DETERMINACIÓN DE pH



En un portaobjetos colocado sobre un fondo blanco, se colocan 5µl de semen y 5 µl de azul de bromotimol, se mezclan con ayuda de la micropipeta y se compara el color obtenido de la mezcla contra el patrón de referencia y se registra el pH.

El azul de bromotimol 3-3' – dibromotimol sulfonftaleína  $C_{27} H_{28} Br_2 O_5 S$ , se utiliza como indicador de pH, que cambia de color desde amarillo a un pH de 6 hasta azul a un pH de 7.6. Se prefirió su empleo a el de tiras indicadoras ya que este reactivo permite lecturas con incrementos de 0.1.

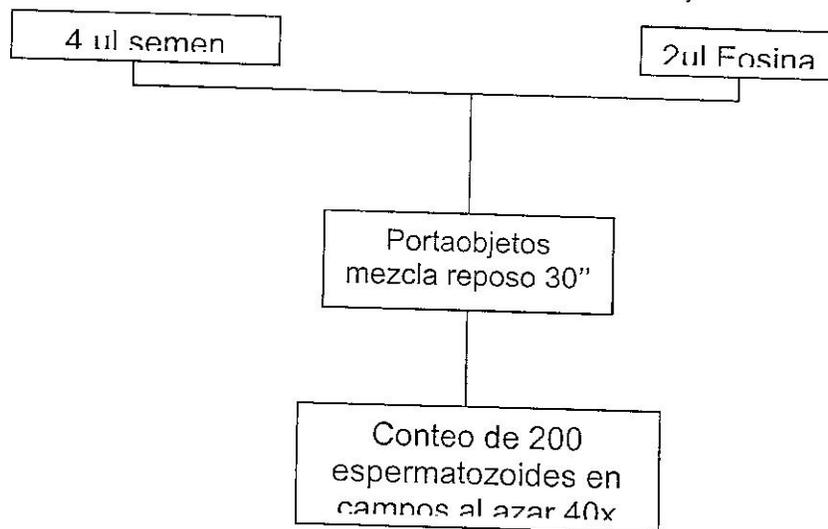
### CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA (Manual de la OMS 1989)



Se llenó la pipeta de glóbulos blancos hasta la marca de 0.1, con diluyente MR-A se finalizó el llenado, se tapó con parafilm los extremos de la pipeta y se colocó en el vortex 1' en agitación, al finalizar se retiró el parafilm, dejando escapar las primeras gotas y se realizó el llenado de las cámaras del hemocitómetro, se contaron en el microscopio óptico bifocal con un lente objetivo a 100x, se sumaron los datos obtenidos de las dos cámaras se dividen entre dos y se multiplican por  $10^6$ . En fracciones muy concentradas se hizo una dilución empleando un diluyente comercial MR-A (Kubus S.A. España).

### EVALUACIÓN DE VIABILIDAD

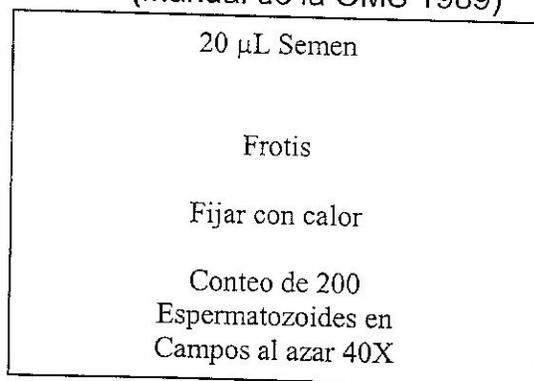
Tinción supravital eosina - nigrosina  
(Manual de la OMS 1989)



En un portaobjetos se colocaron 4µl de semen, se mezclaron con 2 µl de eosina y se dejó reposar por treinta segundos, adicionando 4µl de nigrosina, se mezcló y se realizó un frotis, que se seca al aire. En el microscopio óptico se cuentan 200 espermatozoides en campos al azar con el objetivo de 40X, considerándose como muertos aquellos que presentan una coloración rosa y vivos los que permanecen traslúcidos.

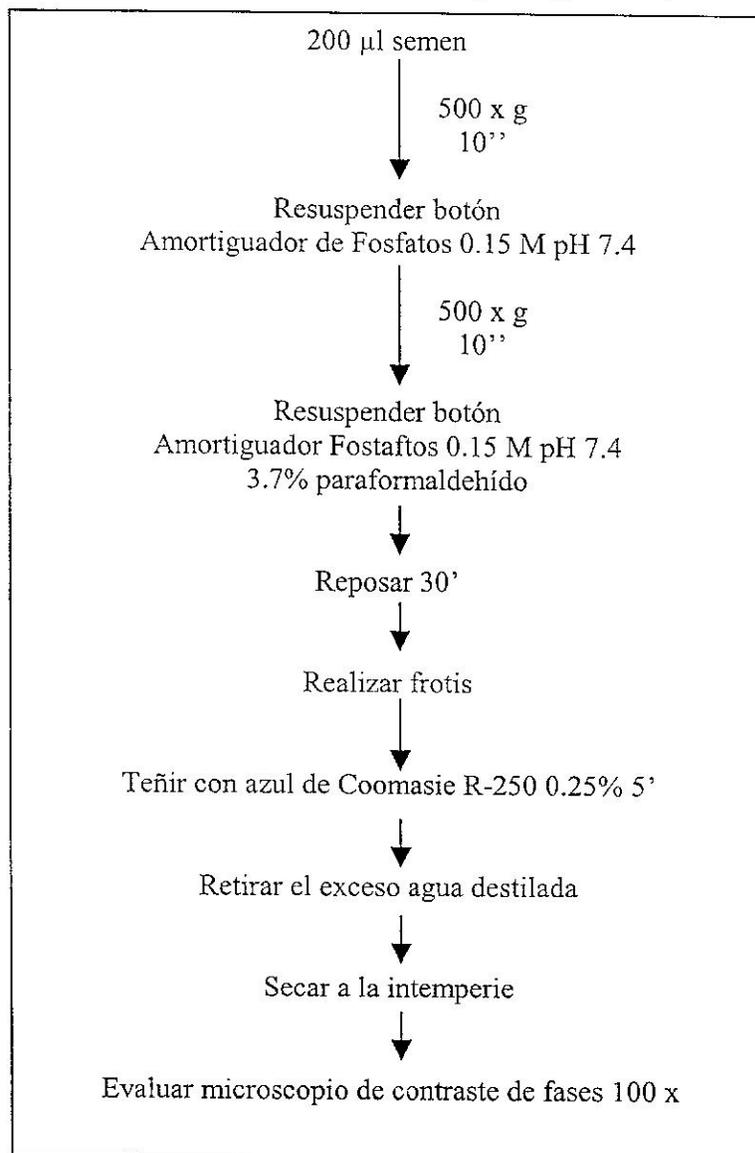
### EVALUACIÓN DE MORFOLOGÍA

(Manual de la OMS 1989)



En un portaobjetos se colocaron 20  $\mu$ l de semen, se hizo un frotis que se fijó con calor y se evaluaron al microscopio contando 200 espermatozoides en campos al azar

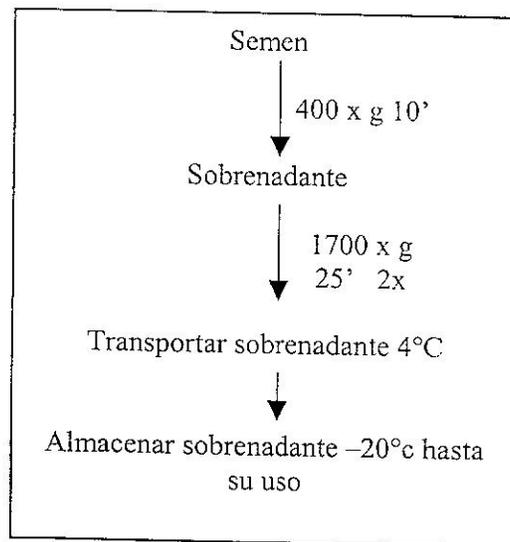
### EVALUACIÓN DE INTEGRIDAD ACROSOMAL (Chun-Xia and Zeng-Ming 2000)



Se centrifugaron 200 $\mu$ l de semen a 500 x g 20'', el precipitado se lavó 2 veces con amortiguador de fosfatos durante 10'', resuspendiéndose finalmente en 100 $\mu$ l de amortiguador de fosfatos y formaldehído 3.7%, se dejó en reposo durante 30 minutos, se hace un frotis, se secó al aire y una vez seco se tiñó con Azul de Coomasie durante 5 minutos, se lavó con agua destilada y una vez seco se evaluó en microscopio de contraste de fases, se contaron 200 espermatozoides en

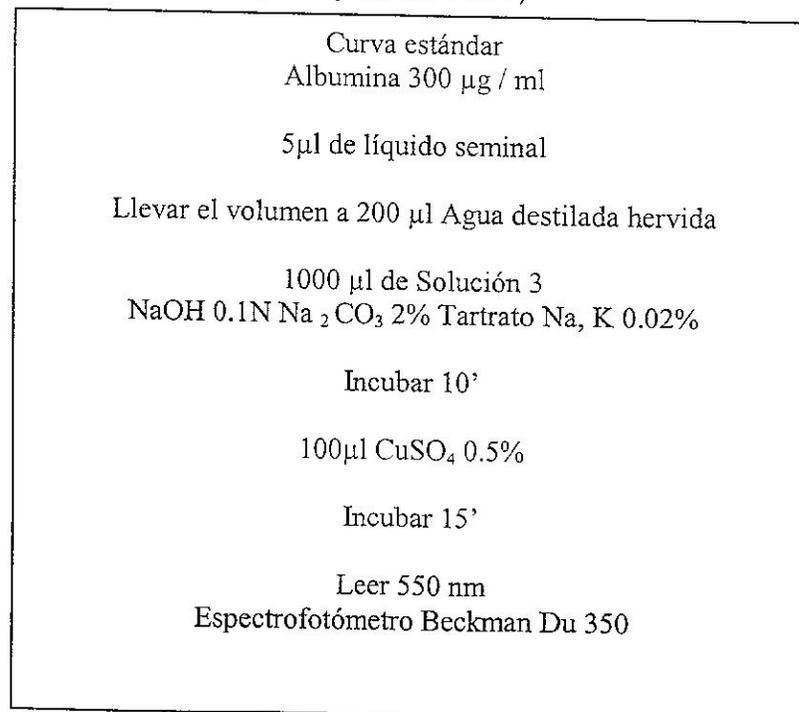
campos al azar, donde se observó claramente teñidos de azul los acrosomas intactos.

### OBTENCIÓN LÍQUIDO SEMINAL (Rozeboom., et al, 1999)



El semen se centrifugó a 400 x g durante 10', para retirar los espermatozoides, se clarificó centrifugandolo dos veces a 1700 x g 25' y se transportó a 4°C al laboratorio donde se almacenó a -20°C hasta su uso.

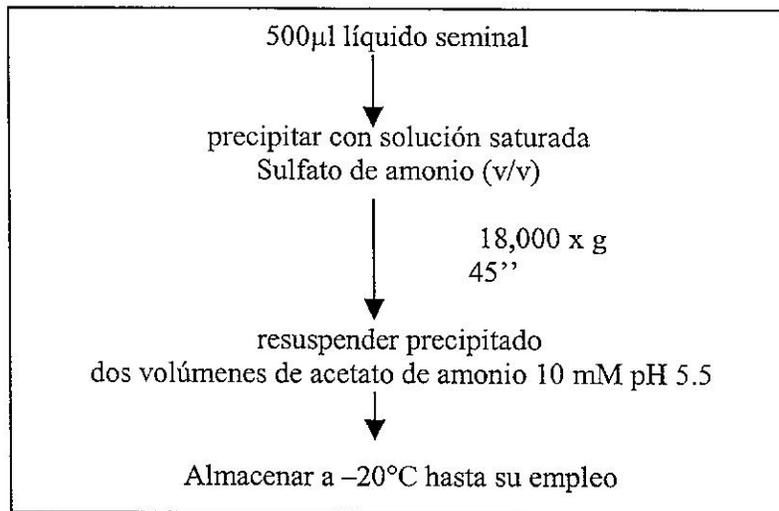
### DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS (Lowry et al., 1951)



A cada cerdo del estudio se le hizo su curva estándar, en la que se agregaron 5 µl de líquido seminal, para determinar por su lectura a 500nm, la concentración de proteínas de la muestra

### PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

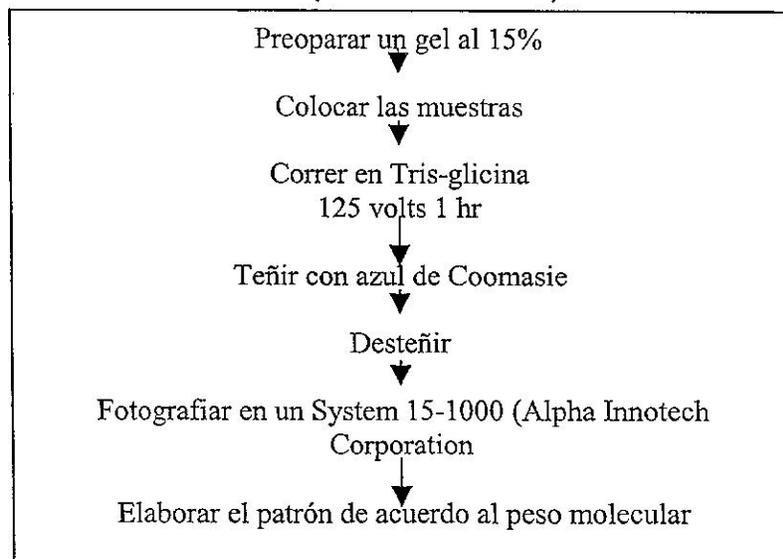
(Rutherford et al. 1992)



Se tomarón 500µl a la que se le agregó una solución concentrada de sulfato de amonio v/v, se centrifugó a 18,000 x g 45'', se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en dos volúmenes de Acetato de amonio 10mM pH5.5, con vortex y se almacenó a -20°C.

### DETERMINACIÓN DEL PATRÓN ELECTROFORÉTICO DE PROTEINAS

(Sambrook 1989)



Se preparó un gel de acrilamida al 15%, donde se colocaron 5 µg de las proteínas de líquido seminal que estaban resuspendidas en Acetato de amonio, se

corrieron en Tris-glicina a 125 volts durante una hora, empleando el marcador de peso Bio-Rad 161-0317 con un rango de peso molecular 6,500 a 200,000 Daltones. Al concluir la corrida se tiñó con azul de Coomasie, destiñó y fotografió el gel en un Analizador de imagenes System 15-1000 (Alpha Innotech Corporation).

Se imprimió la imagen empleando el programa Microsoft Photo Editor, se midieron los centímetros de desplazamiento de las bandas de los pesos moleculares y se hizo un coeficiente de correlación entre el logaritmo del peso molecular y los centímetros de migración, se intrapolaron los centímetros migrados por las bandas del líquido seminal, se calculo el antilogaritmo, para conocer el peso molecular aproximado de las proteínas que integran cada fracción.

Con los pesos moleculares calculados se hizo el patrón de la fracción y de la raza, se realizaron gráficas comparativas de los patrones de proteínas por fracción, raza e interracial.

Los resultados se analizaron estadísticamente usando el siguiente modelo:  
$$Y_{ij} = \mu + C_i + \sum_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Variable dependiente (Parámetros del líquido seminal y espermáticos)

$\mu$  = Media general

$C_i$  = i-esimo efecto de la categoría

$\sum_{ij}$  = residuo Nniid ( $\sigma, \sigma^2e$ )

Se trato de un modelo con datos desalineados (n es diferente en cada categoría) y la prueba de comparación de medias es la de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ).

Para realizar el análisis se empleo el paquete estadístico SysStat.

Tomando en cuenta que la segunda fracción es la que mayor concentración espermática, presentando una alta variabilidad en los datos obtenidos, por lo que se clasificaron en concentraciones altas, medianas y bajas de acuerdo a una distribución normal (distribución Z).

$$Z = \frac{(x_i - \bar{x})}{s}$$

Donde:

$x_i$  = es cada evento

$\bar{x}$  = media grupal

$s$  = desviación estandar

Los cerdos de alta concentración tienen valores  $> 0.43$ , cerdos con valores de 0.43 hasta  $-0.43$  se consideraron de concentraciones media y cerdos con valores a  $-0.43$  se consideraron de concentración baja.

## RESULTADOS

Se emplearon las siguientes abreviaturas para facilitar la presentación de las tablas y gráficas:

Fracción 1 del eyaculado o pre-espermática = F1  
Fracción 2 del eyaculado o espermática = F2  
Fracción 3 del eyaculado o post-espermática = F3  
Espermatozoide = Epz  
Concentración = Conc  
Normales = Norm  
Integridad Acrosomal = Int A  
Gota citoplásmica = Gota  
Cola doblada = C/d  
Sin cola = S/c  
Potencial de Hidrógeno = pH

Las unidades de medida empleadas fueron las siguientes:

Volumen = ml  
Concentración espermática = millones de espermatozoides por mililitro  
Los parámetros normales, Integridad acrosomal, Gota citoplásmica, cola doblada y sin cola están expresados en porcentajes.  
El Potencial de Hidrógeno está expresado en escala de 1 a 14  
El volumen del eyaculado está expresado en mililitros y representa el volumen que se colecto y no el volumen total de la fracción.

En las tablas y graficas los colores empleados son los siguientes:

Raza Duroc   
Raza Hampshire   
Raza Landrace   
Raza Yorkshire 

Fracción 1   
Fracción 2   
Fracción 3 

De tal manera que la combinación  
Fracción 2



Debe leerse Raza Yorkshire

En este capítulo se presentan las tablas y gráficas correspondientes a medias y desviaciones estándar, los concentrados de datos se encuentran en los anexos.

### PARÁMETROS ESPERMÁTICOS

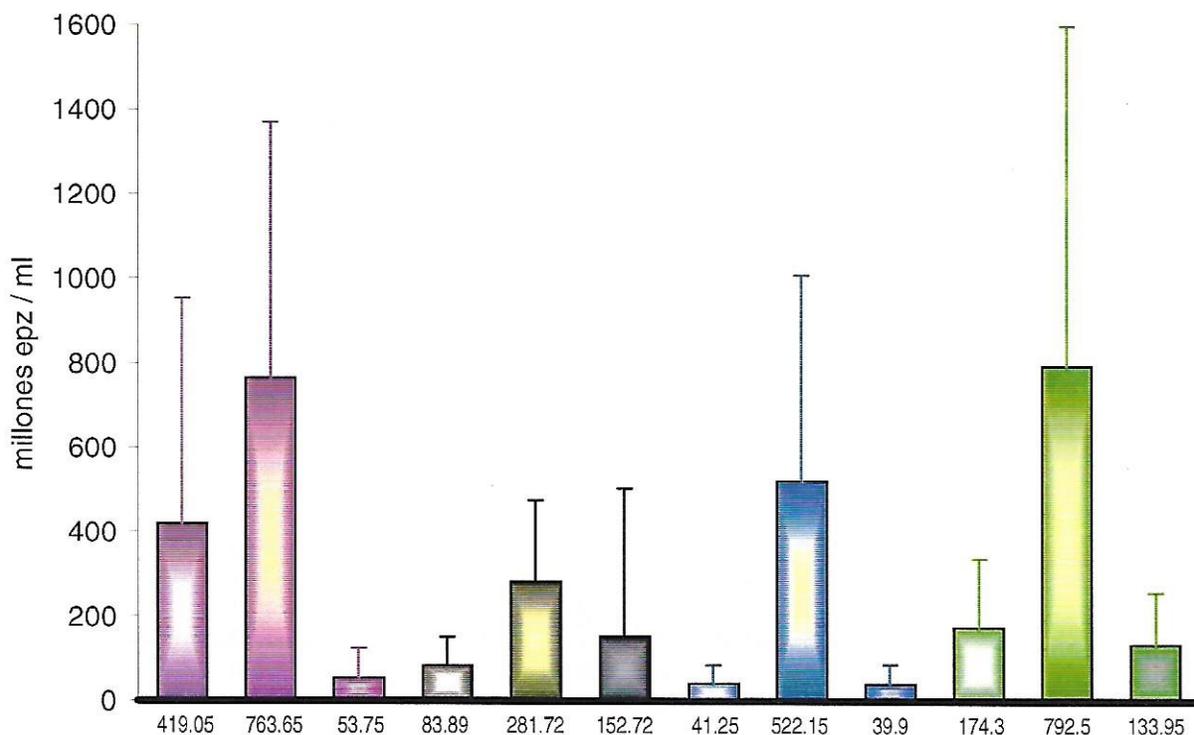
Concentración espermática millones de Epz / ml			
Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	419.05	533.46
	2	763.65	606.57
	3	53.75	70.8

HAMPSHIRE n=9	1	83.89	66.95
	2	281.72	193.23
	3	152.72	351.04

LANDRACE n=10	1	41.25	43.89
	2	522.15	486.95
	3	39.9	46.85

YORKSHIRE n=10	1	174.3	162.49
	2	792.5	809.37
	3	133.95	123.04

Concentración espermática millones de Epz / ml



Gráfica 1 Distribución de la concentración espermática. En todas las razas la fracción 2 es la de mayor concentración espermática. Además puede apreciarse que la fracción 1 de la raza Duroc presenta una concentración elevada, siendo aun mayor que la fracción 2 de la raza Hampshire. No se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los grupos.

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS

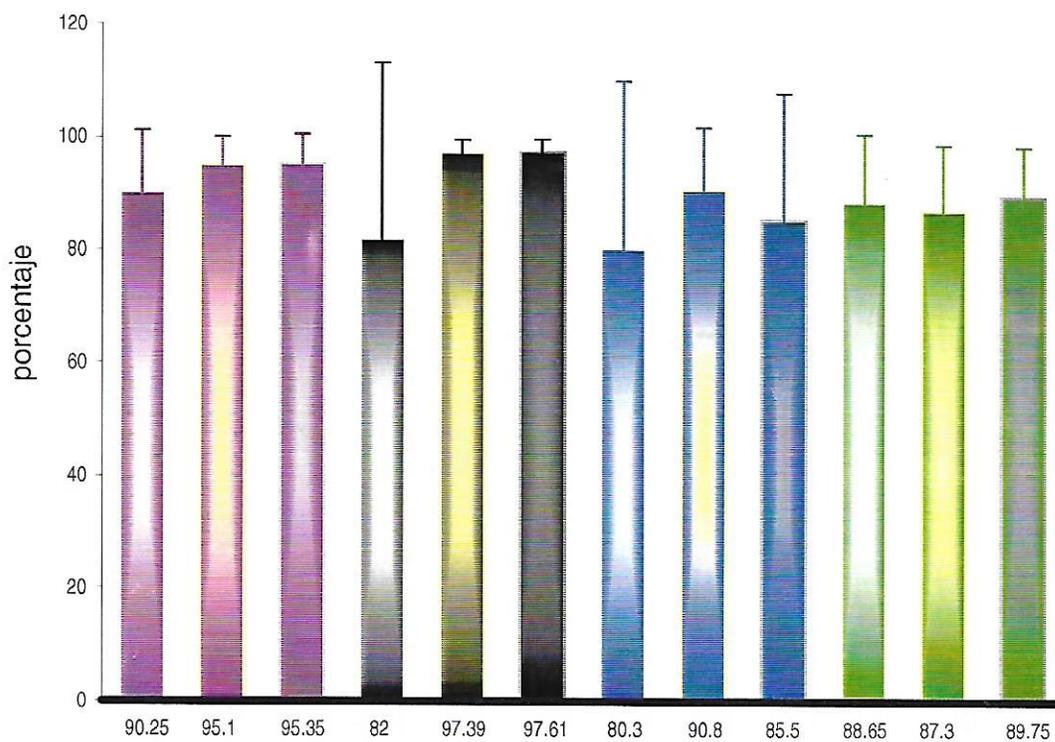
Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	87.45	22.31
	2	91.2	9.7
	3	87.74	30.92

HAMPSHIRE n=9	1	75.67	37.15
	2	95.83	2.96
	3	98.33	1.9

LANDRACE n=10	1	80.3	29.8
	2	90.8	11.1
	3	85.5	22.44

YORKSHIRE n=10	1	88.65	12.15
	2	87.3	11.67
	3	89.75	8.85

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS



Gráfica 2 La gráfica no muestra diferencias significativas en cuanto a viabilidad con respecto a la fracción y la raza, lo que significa que todas las fracciones presentan espermatozoides de la misma calidad.

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES NORMALES

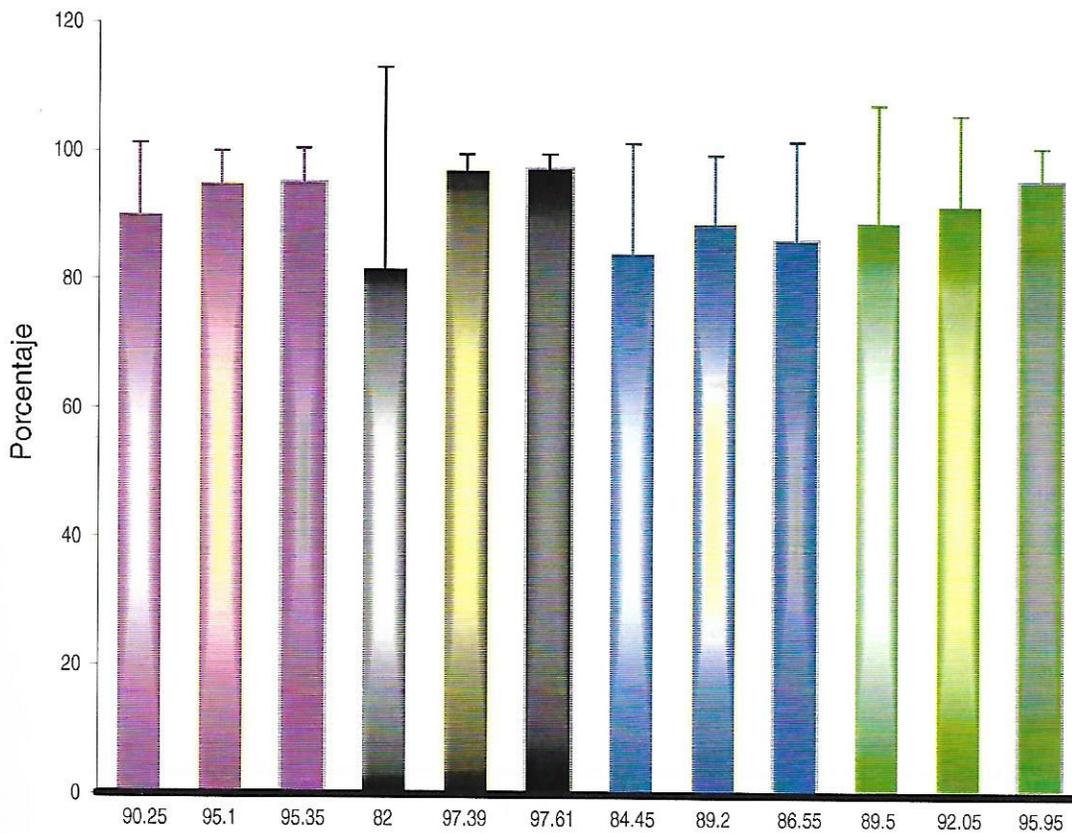
Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	90.25	10.99
	2	95.1	4.98
	3	95.35	5.17

HAMPSHIRE n=9	1	82	3.13
	2	97.39	2.2
	3	97.61	2.12

LANDRACE n=10	1	84.45	16.97
	2	89.2	10.43
	3	86.55	15.21

YORKSHIRE n=10	1	89.5	18.12
	2	92.05	13.98
	3	95.95	5.01

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES NORMALES



Gráfica 3 No existe diferencia en el porcentaje de espermatozoides normales en cada raza, independientemente de la fracción.

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON INTEGRIDAD ACROSOMAL

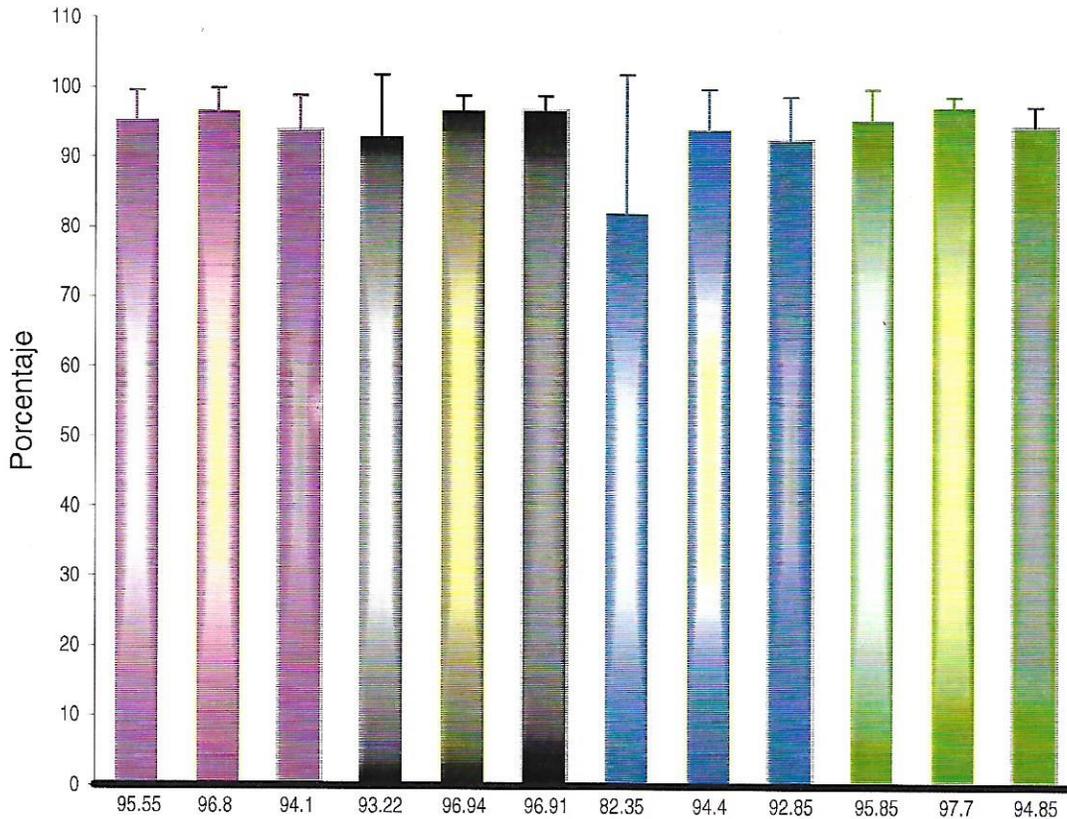
Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	95.55	4.06
	2	96.8	3.17
	3	94.1	4.78

HAMPSHIRE n=9	1	93.22	8.7
	2	96.94	2.01
	3	96.91	2.02

LANDRACE n=10	1	82.35	19.71
	2	94.4	5.6
	3	92.85	6.09

YORKSHIRE n=10	1	95.85	4.16
	2	97.7	1.32
	3	94.85	2.8

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES CON INTEGRIDAD ACROSOMAL



Gráfica 4 Los espermatozoides de las tres fracciones, presentan similitud en cuanto a valores de integridad acrosomal.

## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES QUE PRESENTAN GOTA CITOPLÁSMICA

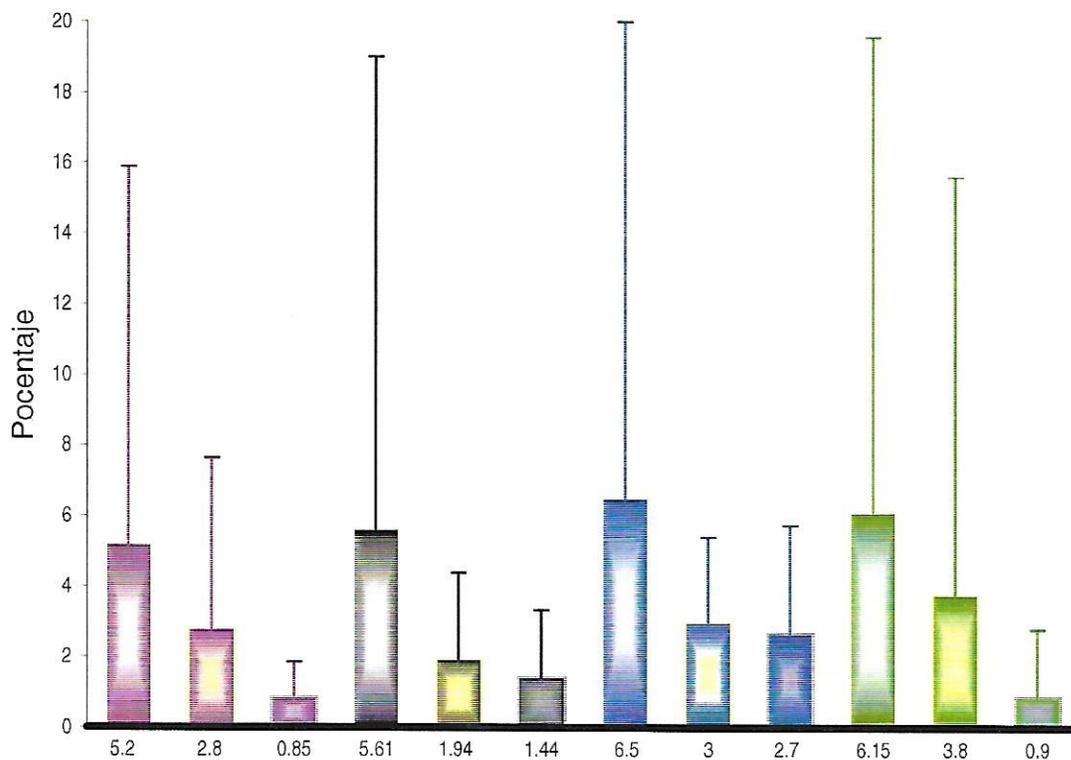
Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	5.2	10.7
	2	2.8	4.84
	3	0.85	1

HAMPSHIRE n=9	1	5.61	13.42
	2	1.94	2.44
	3	1.44	1.88

LANDRACE n=10	1	6.5	13.54
	2	3	2.4
	3	2.7	3.04

YORKSHIRE n=10	1	6.15	13.47
	2	3.8	11.84
	3	0.9	1.91

### PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES GOTA CITOPLÁSMICA



Gráfica 5, Aunque no hay diferencias significativas existe tendencia a disminuir la presencia de gota citoplásmica, conforme se avanza en la fracción igual en las cuatro razas.

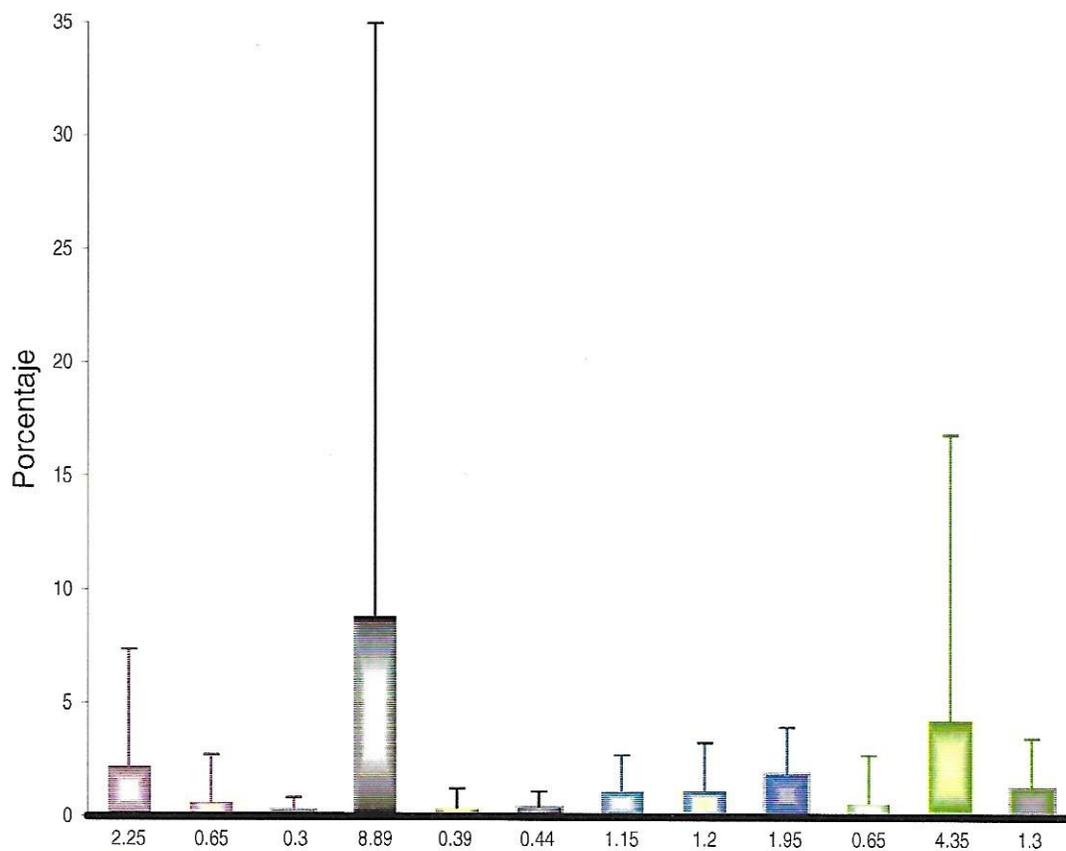
## PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES SIN COLA

Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	2.25	5.1
	2	0.65	2.06
	3	0.3	0.54

HAMPSHIRE n=9	1	8.89	26.11
	2	0.39	0.82
	3	0.44	0.68

LANDRACE n=10	1	1.15	1.58
	2	1.2	2.08
	3	1.95	1.99

YORKSHIRE n=10	1	0.65	2.06
	2	4.35	12.55
	3	1.3	2.18



Gráfica 7 La razas Duroc y Hampshire en la primera fracción presentan los porcentajes más altos de espermatozoides sin cola y las razas Landrace y Yorkshire en la tercera fracción, sin embargo dadas las desviaciones estándar tan elevadas no se aprecian diferencias significativas

## PARÁMETROS DEL LIQUIDO SEMINAL

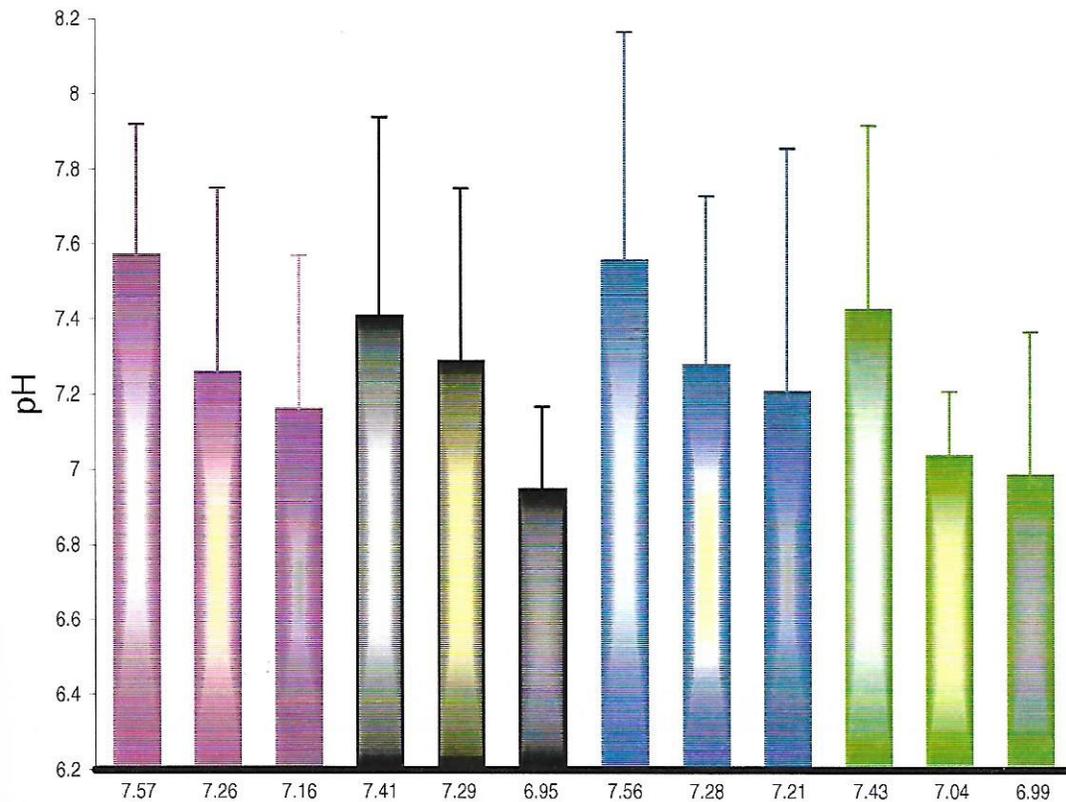
### pH DEL LÍQUIDO SEMINAL

Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	7.57	0.35
	2	7.26	0.49
	3	7.16	0.41

HAMPSHIRE n=9	1	7.41	0.53
	2	7.29	0.46
	3	6.95	0.22

LANDRACE n=10	1	7.56	0.61
	2	7.28	0.45
	3	7.21	0.65

YORKSHIRE n=10	1	7.43	0.49
	2	7.04	0.17
	3	6.99	0.38

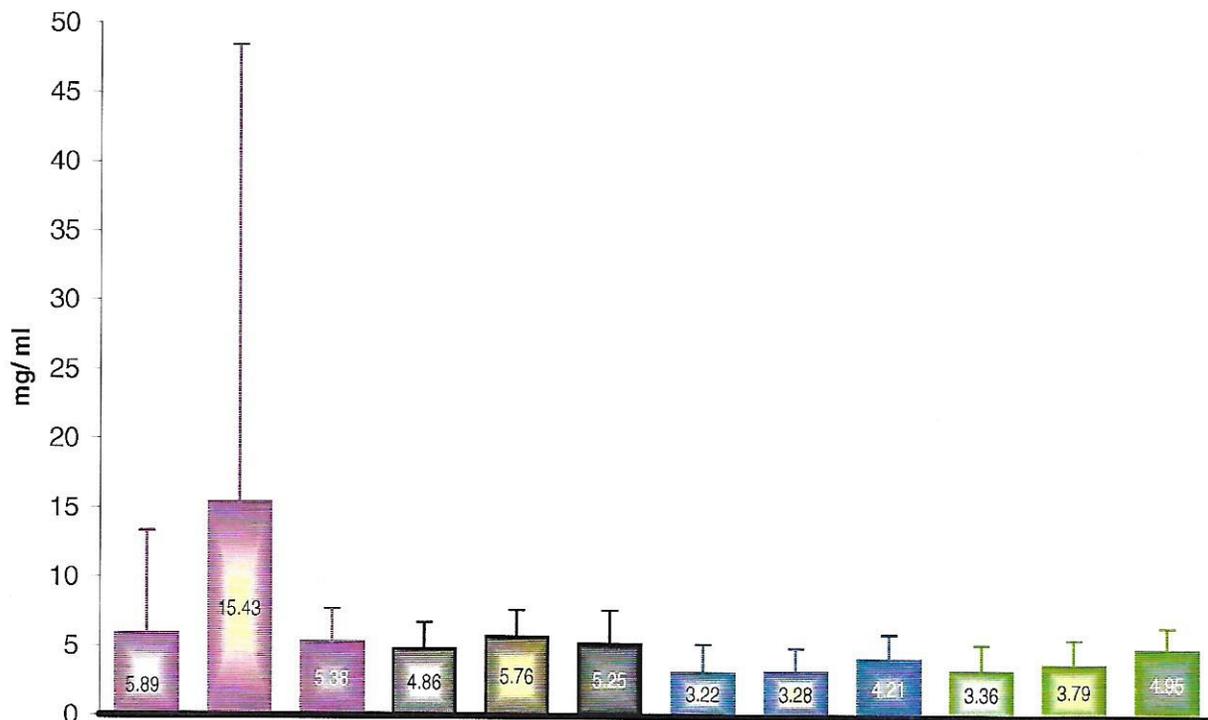


Gráfica 8 Se nota una tendencia a disminuir el pH, conforme al número de fracción.

## CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS EN mg / ml

Raza	Fracción	Media	Desviación estándar
DUROC n=10	1	5.89	7.45
	2	15.43	33.02
	3	5.38	2.36
HAMPSHIRE n=9	1	4.86	1.91
	2	5.76	1.89
	3	5.25	2.41
LANDRACE n=10	1	3.22	2.0
	2	3.28	1.68
	3	4.21	1.76
YORKSHIRE n=10	1	3.36	1.85
	2	3.79	1.83
	3	4.95	1.57

## CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

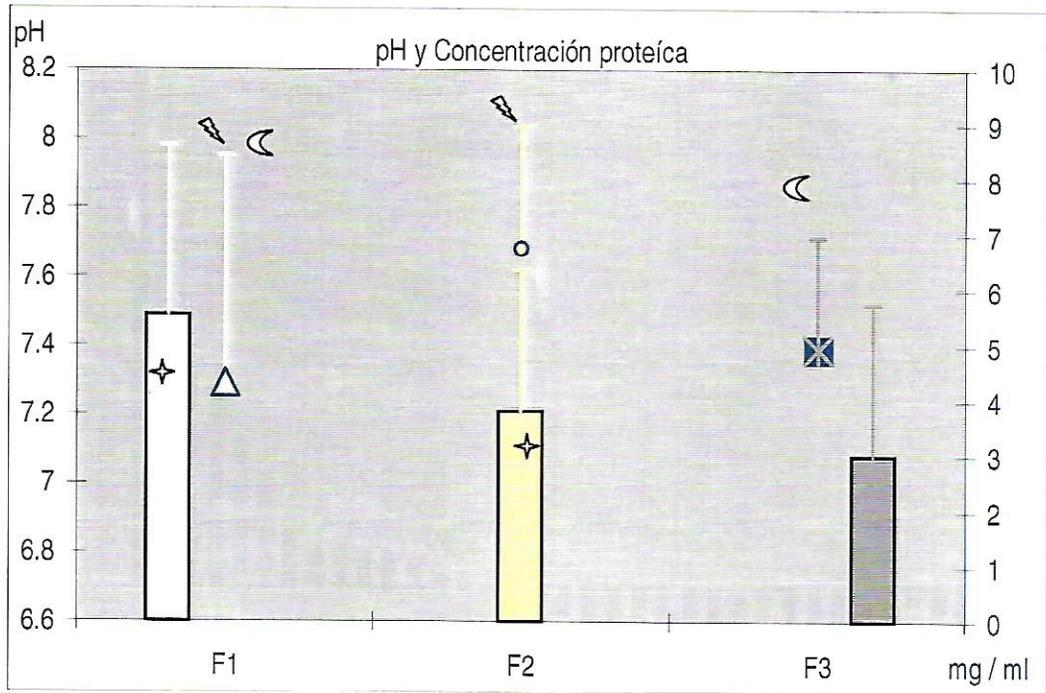


Gráfica 9 No existen diferencias significativas en la concentración de proteínas entre fracciones y razas, sin embargo, en las razas Duroc y Hampshire se observa una elevación en la fracción 2, y en las razas Landrace y Yorkshire se incrementa la concentración conforme se avanza en la fracción. En la raza Duroc se observa una alta variabilidad entre individuos.

Se analizaron los datos para buscar si existe efecto de la fracción independientemente de la raza, se realizo un coeficiente de Pearson para buscar la correlación entre variables y se aplico una prueba de Tukey con una alfa de 0.05. Se muestran únicamente los resultados que mostraron diferencias significativas.

Parámetro	Fracción	Media	Desviación estándar
pH	1	7.49	0.49
	2	7.21 $\star$	0.41
	3	7.08 $\star$	0.44

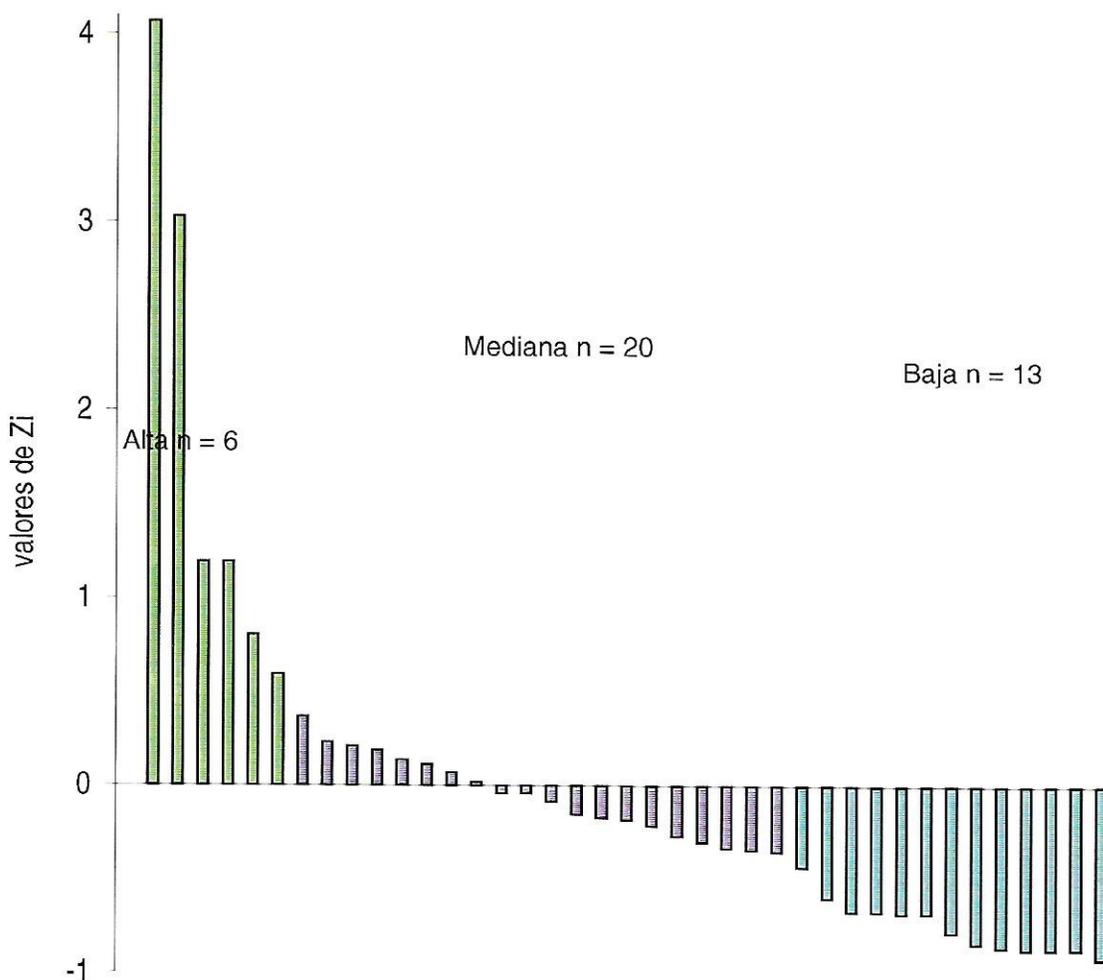
Concentración de proteínas mg/ml	1	4.32 $\curvearrowright$	4.17
	2	6.76 $\curvearrowleft$	15.9
	3	4.94 $\curvearrowleft$	2.02



Gráfica 10. Existe una correlación negativa (-0.37) entre el pH de la fracción 2 y la tres  $\star$ , Existe una correlación positiva (0.59) altamente significativa entre la concentración de proteínas de la fracción 1 con la 2  $\curvearrowleft$ , del mismo modo una correlación positiva (0.54) entre las proteínas de la fracción 1 y 3  $\curvearrowleft$

Considerando que la fracción 2, se utiliza rutinariamente en los centros de inseminación artificial para preparar las dosis, se consideró una distribución normal, con un valor de z igual a 0.43, definiendo como cerdos de alta concentración aquellos cuyos valores de Zi fueron mayores de 0.43, concentraciones medias para valores de 0.43 hasta -0.43 y baja producción para valores menores a -0.43, donde  $Z_i = (X_i - \bar{x}) / s$ , donde  $X_i$  es cada evento x es la media grupal y s es la desviación estándar.

Distribución de acuerdo a la concentración espermática de la fracción 2

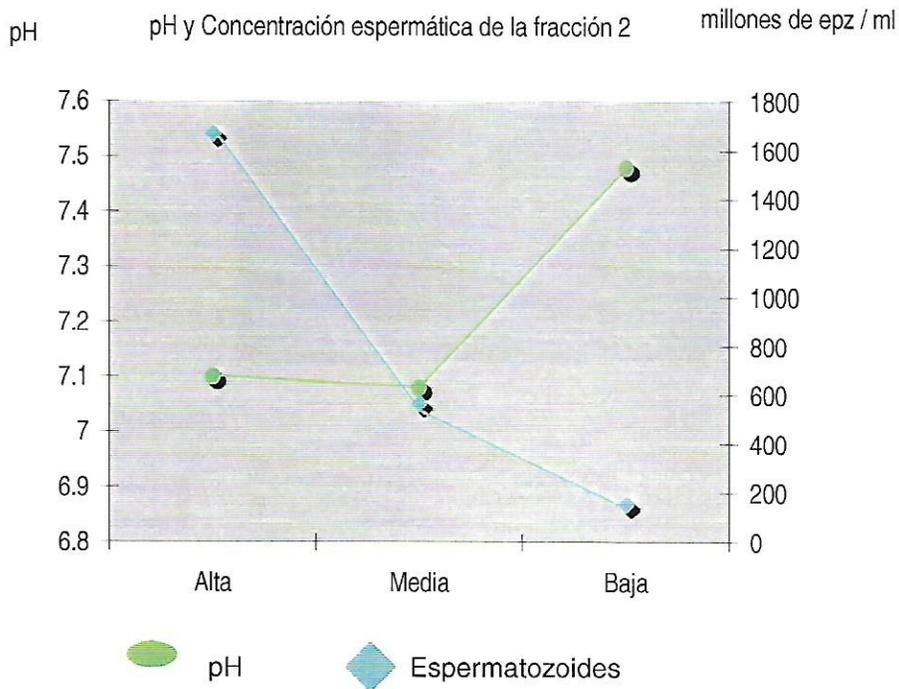


Gráfica 11 Distribución de las 39 muestras de acuerdo a los valores de Zi.

Considerando las categorías de concentración se aplicó una Prueba de Pearson en busca de correlación entre variables, encontrándose los siguientes resultados.

Categoría	Media Concentración espermática	Desviación estándar	Media Valores de pH	Desviación estándar
Alta	1666.67	757.13	7.5	0.49
Media	564.80	124.21	7.22 *	0.41
Baja	155.58	80.10	7.08 *	0.44

Se encontraron diferencias en los valores de pH de la fracción 2 entre las categorías de concentración espermática media y baja (0.41) para una  $p < 0.05$ .



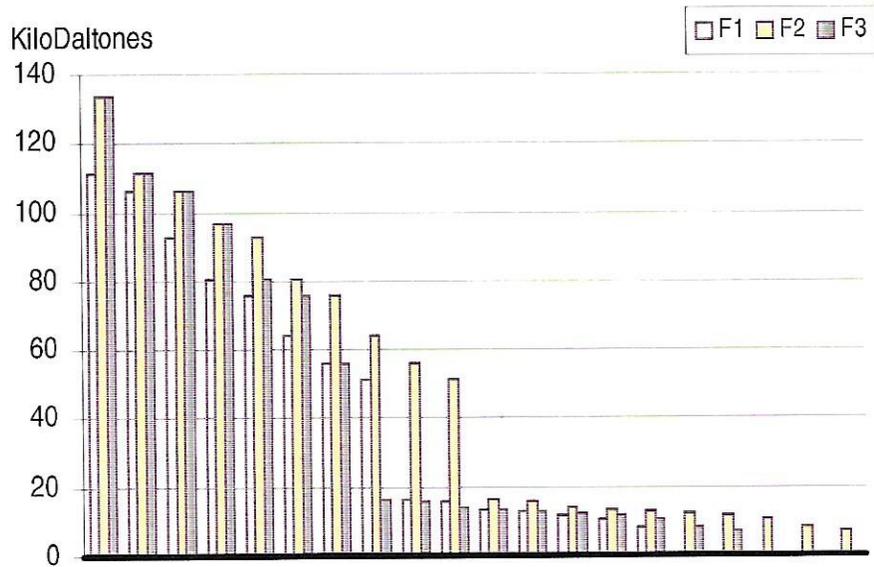
Gráfica 12 Se encuentra una correlación significativa ( $p < 0.05$ ) entre categoría media y baja, claramente se muestra que al disminuir la concentración espermática (millones x ml.) el pH tiende a ser más alcalino.

## PATRÓN DE PROTEINAS

Se presenta un gel representativo de la raza y la gráfica de las bandas que se presentaron en todos los geles que corresponden a la raza, se tuvieron problemas con algunas bandas que se aprecian en el gel pero no en la impresión, estas bandas no fueron incluidas para evitar confusiones.

### RAZA DUROC

1 ATENCO                      12 CERCA  
F3    F2    F1    PM    F3    F2    F1



Gráfica 13. Cada barra corresponde a una banda del gel, se representan todas las bandas que se pudieron medir con precisión, de las 10 muestras.

# RAZA HAMPSHIRE

COMBO JAL

TOPS JAL

F1

F2

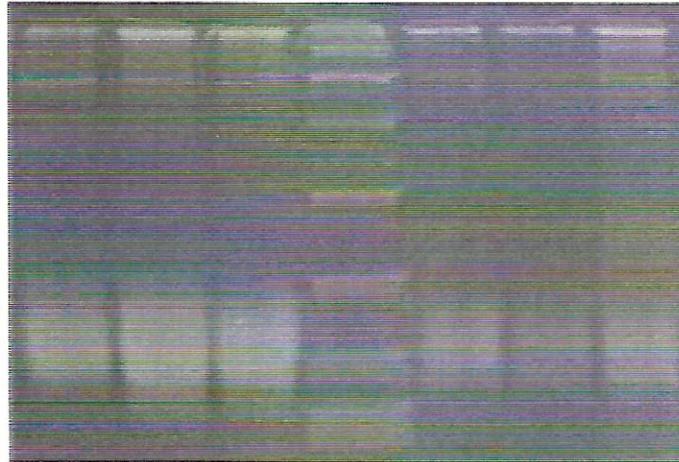
F3

PM

F1

F2

F3

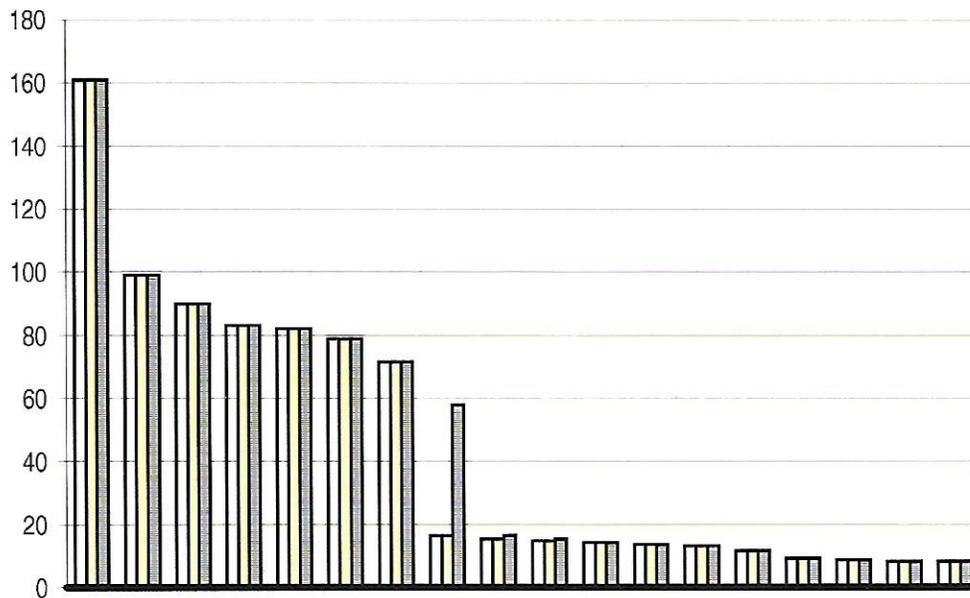


KiloDaltones

□ F1

□ F2

■ F3



Gráfica 14. Se muestran todas las bandas que pudieron ser calculadas con precisión, se puede apreciar una agrupación de la proteína de 160.95 Kda, otro grupo de entre 60 a 100 Kda y las menores de 20Kda.

# RAZA LANDRACE

280-8 JAL

280-5 JAL

F3

F2

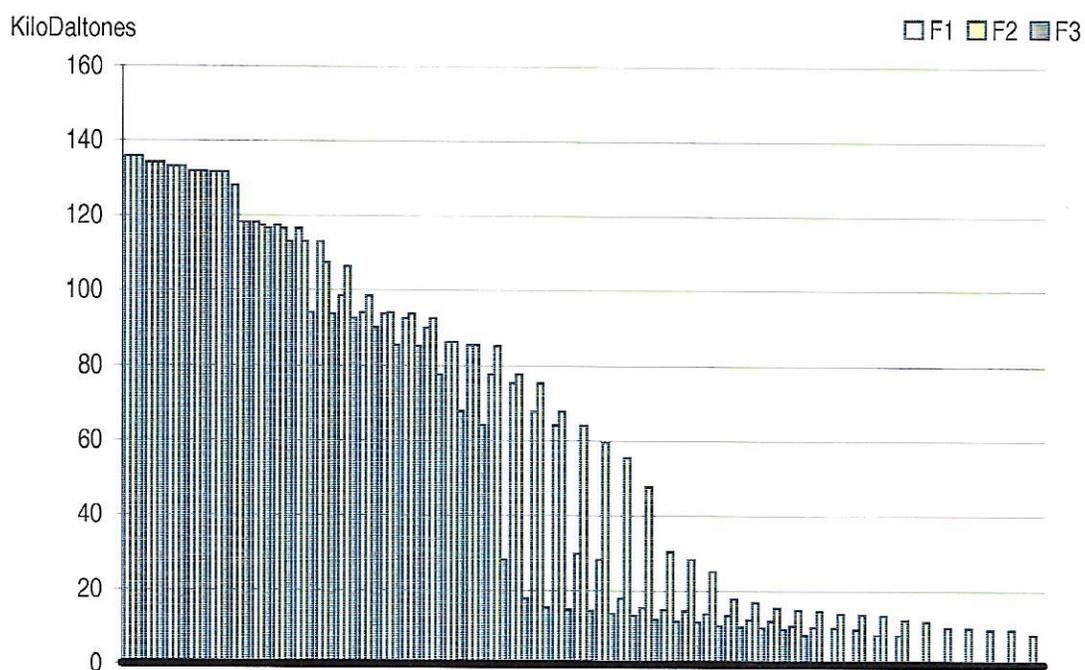
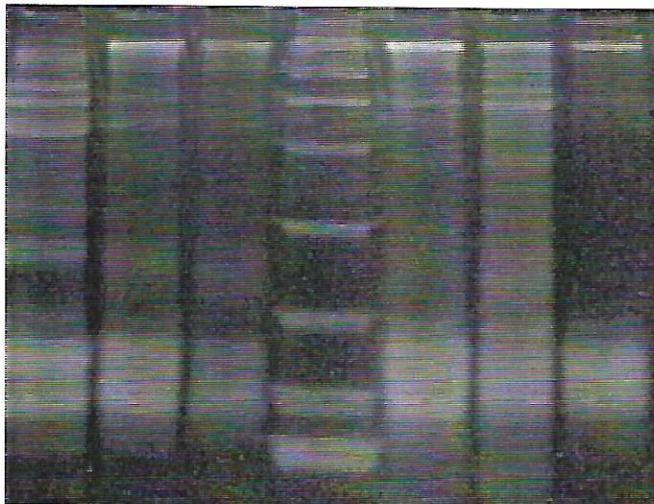
F1

PM

F3

F2

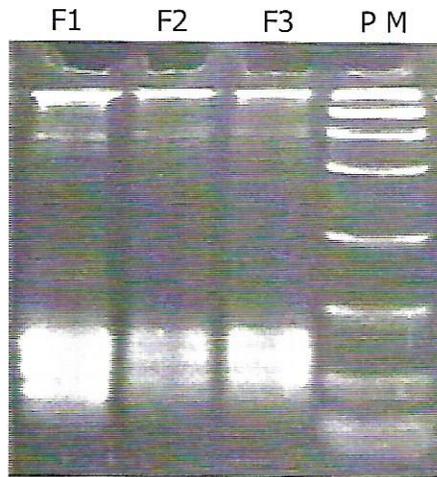
F1



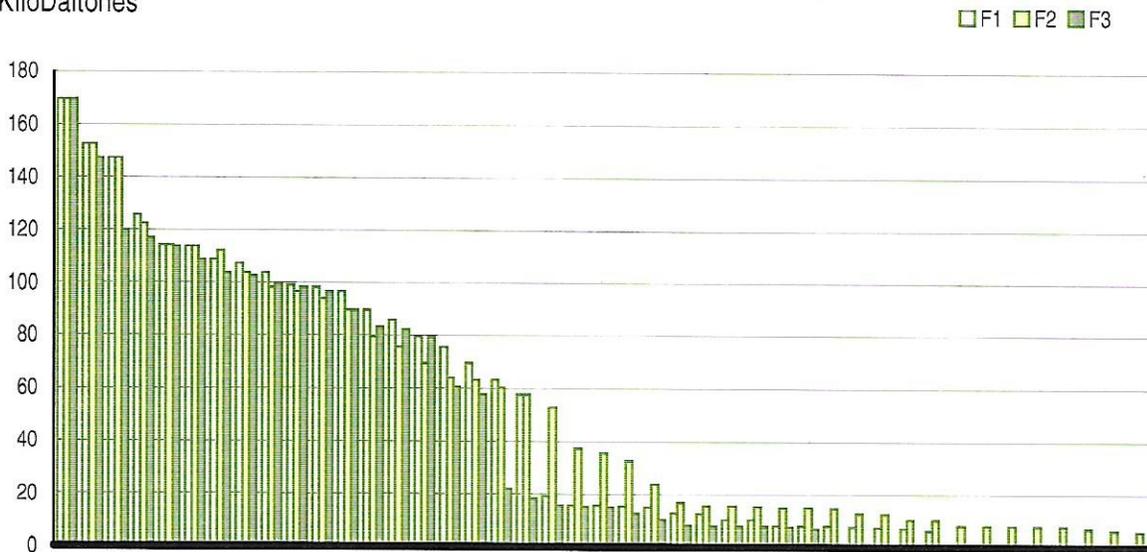
Gráfica 15 Se presentan las bandas de las diez muestras que pudieron medirse con precisión.

# RAZA YORKSHIRE

5 CERCA

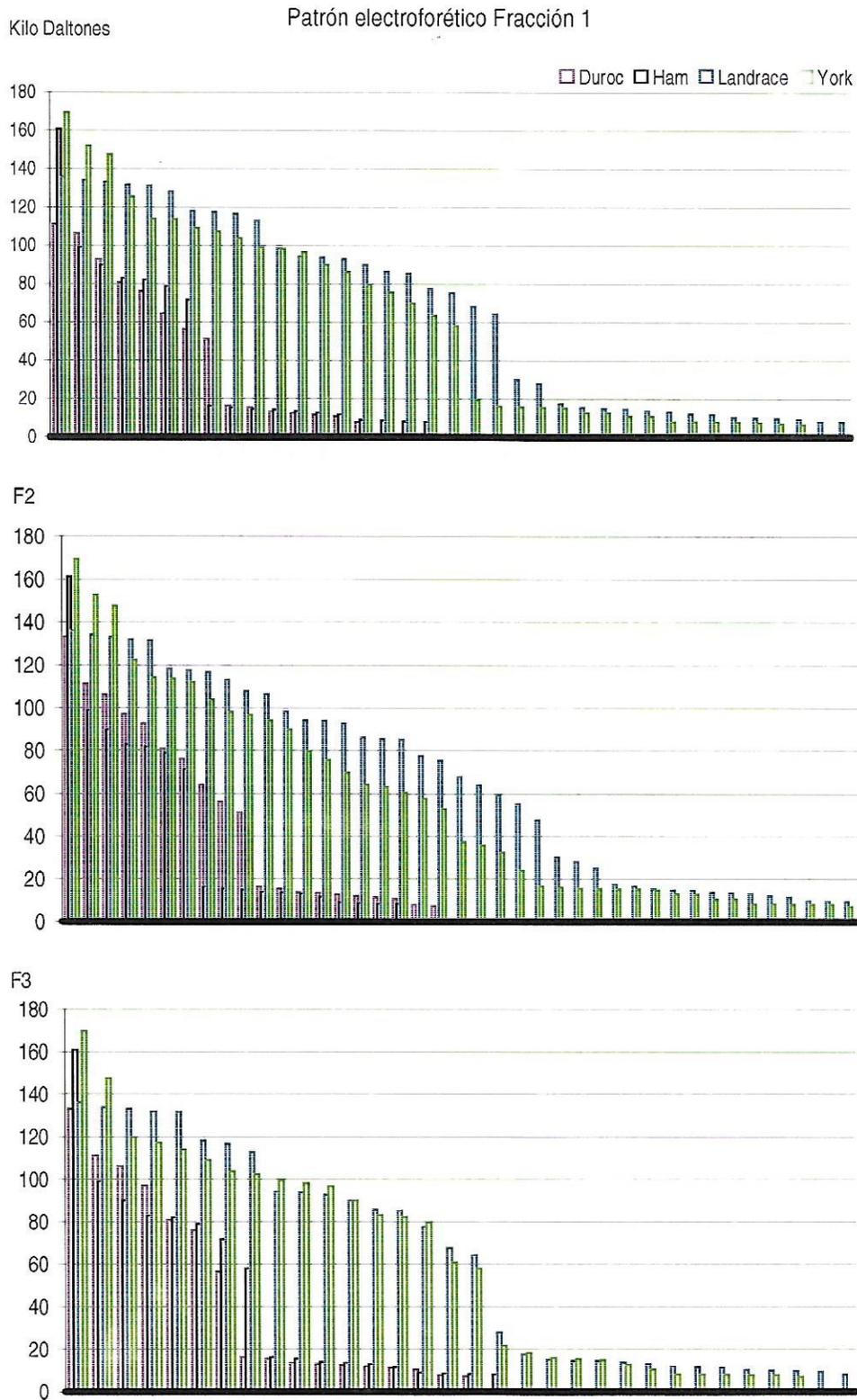


KiloDaltones



Gráfica 16. Se representan las bandas de las 10 muestras que pudieron medirse con precisión. Se pueden considerar tres grupos uno de entre 120 – 170 Kda, otro de mayores de 60 y menores a 120 y el tercer grupo de menores de 20 Kda.

## Comparativo entre razas



Gráfica 17. Debido a los problemas de resolución no se puede afirmar que existan diferencias raciales o de fracción sobre el patrón de proteínas.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La técnica de elección para obtener una mejora genética rápida en cualquier piara, es sin duda la inseminación artificial, sin embargo para que sea exitosa se requiere entre otras cosas una buena detección de celos, la deposición del semen en el momento adecuado, un buen estado de salud de la hembra y el uso de semen de buena calidad entre otros. Para evaluar la calidad del semen se miden parámetros tanto del líquido seminal como del espermatozoide, los más frecuentemente empleados son el color que varía de transparente a lechoso blanquecino y nuevamente transparente Wayne 1980, un olor "sui generis", sin distinción de raza, por lo que los eyaculados empleados en este trabajo fueron aquellos que cubrieron estas características. Los valores de pH para eyaculado total varían de 7.3 a 7.9 (Fraser 1982 , Garner 2000), al trabajar con las fracciones naturales del eyaculado encontramos que la fracción 3 de la raza Hampshire y las fracciones 2 y 3 de la raza Yorkshire Gráfica 8 , son más ácidas, pero no presentan ninguna diferencia estadísticamente significativa.

En trabajos anteriores se reportan valores de espermatozoides normales entre 85.4 hasta 99.1% (Rigau et al., 1996; Pinart et al., 1999); en las tres fracciones se cuenta con porcentajes similares Gráfica 3, independientemente de la fracción y la raza. Otros investigadores reportan una concentración que va desde 200 hasta 600 millones de espermatozoides por mililitro (Bearden 1995; Pinart 1999), en cuanto a razas Ciereszko et al., 2000, encontraron que existen diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) en la concentración espermática entre las raza Large White ( $373.9 \pm 83.5$ ), Pietrain ( $547.8 \pm 74.7$ ) y Pietrain – Duroc ( $467.8 \pm 65.9$ ); nuestros resultados (gráfica 1) no encuentran diferencias entre fracciones, razas y manejo, por lo que difieren de los de Ciereszko et al., 2000; sin embargo ellos emplean un tamaño de muestra más pequeño (3 Large White, 3 Pietrain y 5 Pietrain – Duroc) y basan su análisis estadístico en los eyaculados de estos animales, en comparación con este estudio en el que cada muestra está representada por un animal diferente, dando con esto un mayor acercamiento a la población, a pesar de que son razas diferentes no consideramos que este factor influya ya que nosotros no hemos encontrado diferencias significativas entre razas.

Tomando como base los datos de Decuadro-Hansen 1999, en los que propone que la fracción 1 y 3 representan el 20 % del volumen total y que la fracción 2 constituye el 60% del eyaculado, y los resultados obtenidos por nosotros en los rubros de concentración, viabilidad, normalidad e integridad acrosomal, que están dentro de los parámetros considerados de calidad (cuadros 6 y 7), para el espermatozoide de cerdo y que al análisis estadístico no muestran diferencias significativas, podemos afirmar considerando las concentraciones más bajas de nuestros datos que se desechan para la fracción 1  $1,237.5 \times 10^6$  epz y para la fracción 3  $1,197 \times 10^6$  epz , lo que significa que alrededor de  $2,000 \times 10^6$  espermatozoides normales, vivos y con una adecuada integridad acrosomal son tirados por eyaculado, si una dosis de inseminación de  $2.5 \times 10^6$  epz Alexopoulos et al., 1996, produce buenos porcentajes de fertilidad,

se pierde por cada eyaculado que se obtienen una dosis con un costo mínimo de \$100.00.

Las anomalías primarias encontradas en este estudio fueron gota citoplásmica y colas dobladas y secundarias solamente cabezas sueltas, no hubo ninguna tendencia ni de fracción ni de raza y se encuentran dentro de los parámetros de anomalías reportados que no deben ser mayores al 14.6% Rigau et al 1996.

El análisis estadístico de los datos con una prueba de correlación de Pearson, no mostró influencia significativa de los parámetros del líquido seminal en los parámetros del espermatozoide, por lo que se concluye que en cerdos de fertilidad probada los espermatozoides de las tres fracciones son iguales independientemente de la raza y granja a la que pertenezcan.

En base a lo anterior se analizó el conjunto de datos, sin considerar la raza, para saber si las características del líquido seminal por fracción, tenían influencia en los parámetros espermáticos o entre ellos mismos, los resultados obtenidos muestran que con una prueba de Tukey para  $\alpha = 0.05$ , existe una correlación negativa (-0.37), del pH de la fracción 2, con el pH de la fracción 3 (gráfica 10), que puede explicarse como un efecto compensatorio que evita una reducción de la movilidad y del metabolismo del espermatozoide Johnson et al 2000. Existe también una correlación positiva (0.59) altamente significativa entre la concentración de proteínas de la fracción 1 con la fracción 2, del mismo modo una correlación positiva (0.54) entre las proteínas de la fracción 1 y la fracción 3 (gráfica 10), a pesar de no existir una correlación cabe hacer notar que la fracción con mayor concentración espermática es también la de mayor concentración proteica (gráfica 12), lo que puede significar la presencia de alguna proteína que influya en el metabolismo espermático o en los mecanismos de protección de este dentro del tracto femenino, lo que es apoyado con las observaciones de Maxwell y Johnson 1999, quienes proponen que un componente proteico puede ser el responsable de los efectos en la fertilidad del espermatozoide y los resultados de Claus 1990, quién indica que proteínas de entre 100 y 110 Kda, tienen un efecto inmunosupresor en el tracto femenino y que podrían estar involucradas en la protección del espermatozoide y en la protección del embrión durante la migración hacia el útero, por lo que quedan diluidas en las dosis de inseminación, con la consecuente desprotección del espermatozoide.

Debido a que la fracción 2, se utiliza rutinariamente en los centros de inseminación artificial para preparar las dosis, se consideró una distribución normal, se aplicó una prueba de Z, con un valor igual a 0.43, definiendo como cerdos de alta concentración espermática aquellos cuyos valores de  $Z_i$  fueron mayores de 0.43, concentraciones medias para valores de 0.43 hasta -0.43 y baja producción para valores menores a -0.43, donde  $Z_i = (X_i - \bar{x}) / s$ , donde  $X_i$  es cada evento  $x$  es la media grupal y  $s$  es la desviación estándar.

Se encontraron diferencias en los valores de pH de la fracción 2 entre las categorías de concentración espermática baja y media para una  $p < 0.05$  (gráfica 11), estos datos concuerdan con el pH del eyaculado total que tiene 7.3 – 7.8 Hafez 2000, es posible que la modificación del pH, de acuerdo a la concentración espermática, este relacionada con el efecto neutralizante requerido al ingresar al tracto femenino.

En el semen de Toro y Carnero cuyas concentraciones son de 1,000 y 2,000 x 10<sup>6</sup> epz / ml, y el pH es de 6.4 – 6.8 y 6.2 – 6.8, respectivamente (Fraser 1982), por lo que puede plantearse que concentraciones altas presentan pH ligeramente ácidos, en el caso del cerdo nuestros resultados no muestran esta tendencia, ya que las concentraciones alta y media conservan pH neutros y la concentración baja de espermatozoides muestra una tendencia a la basicidad de casi 0.3 unidades de pH, por lo que esta relación entre concentración espermática y pH debe ser revisada cuidadosamente con experimentos que permitan establecerla con claridad.

Los trabajos de Arianti et al (1997, 1998 y 1999), describen la presencia de unas vesículas membranosas con un diámetro de 150 – 200  $\mu\text{m}$  que son secretadas por la próstata y contienen grandes cantidades de colesterol, esfingomielina, calcio, proteínas (algunas son enzimas) y pequeñas moléculas que se cree participan en la respuesta inmune, la movilidad espermática y la licuefacción del líquido seminal. Estos “prostasomas”, pueden fusionarse a los espermatozoides en condiciones de pH ácido (4.5), pero no en un pH de 7.5, modificando la composición de la membrana plasmática del espermatozoide al enriquecerlo con colesterol, esfingomielina y glicofosfolípidos saturados, proporcionando una mayor estabilidad membranal y previniendo con esto la reacción acrosomal prematura. Estructuras similares no han sido reportadas en otras especies, la membrana plasmática en el cerdo tiene altos contenidos de fosfatidiletanolamina y esfingomielina; un índice de colesterol / fosfolípidos de 0.12M (Eddy and O'Brien, 1994; Johnson et al 2000), el colesterol está presente en mayor cantidad en la capa externa que la interna, dando como resultado una capa interna vulnerable, esto hace que el espermatozoide sea especialmente frágil a la oxidación de sus lípidos, al choque frío y se dificulte su congelación por lo que nuestro hallazgo de que concentraciones espermáticas bajas estén acompañadas de pH que tienden a la basicidad debe ser estudiada detalladamente como mecanismo de defensa similar al que los prostasomas brindan al espermatozoide de los humanos, pero a través de un mecanismo en el que se proporciona un medio ambiente que pueda actuar tanto en el pH vaginal o permite un grado de basicidad en el que algunas de las proteínas del líquido seminal pueden proteger de manera más eficiente al espermatozoide, ya que nuestros resultados demuestran que no existe una correlación entre la concentración espermática y la concentración de proteínas, entonces el mecanismo debe estar activando o desactivando enzimas, que pueden estar presentes en cualquiera de las tres fracciones del eyaculado, ya que en los patrones electroforéticos de nuestras muestras no se presentan diferencias entre fracciones; solamente se aprecia una

tendencia en las razas Duroc y Hampshire a presentar proteínas de más bajo peso molecular (gráfica 17). Sin embargo, es necesario utilizar técnicas que proporcionen más información sobre el patrón de proteínas y así poder corroborar la presencia de estas en las diferentes fracciones. Las técnicas a utilizar podrían ser una precipitación de proteínas diferencial en concentraciones del agente precipitante (sulfato de amonio) y no tomar solo una concentración para todas las proteínas de precipitación total del sulfato de amonio. Otra técnica es utilizar el precipitado a una sola concentración, para posteriormente pasar las proteínas a través de una cromatografía en fase sólida (Rutherford et al., 1992) y esta separación de proteínas por pesos moleculares dará mejores resolución e identificación de estas, obteniendo una mayor confiabilidad en el patrón electroforético.

La evidencia que mostramos demuestra claramente que las fracciones 1 y 3 del eyaculado tienen influencia sobre factores tan importantes en la regulación del metabolismo como lo es el pH, de la misma manera se demuestra que las concentraciones de proteínas de la fracción 1 están relacionadas de manera altamente significativa con las concentraciones de la fracción 2 de manera positiva y también de manera positiva con las de la fracción 3, por lo que las relaciones proteínas, concentración espermática y pH son fundamentales para el buen desarrollo del metabolismo del espermatozoide y al retirar las fracciones 1 y 3 de las dosis de inseminación se pierden los efectos benéficos que proporcionan al espermatozoide, de la misma manera al diluir la fracción 2 se ocasiona un desbalance importante en la relación entre proteínas y concentración que ocasiona la poca vida útil de las dosis, por lo que concluimos este trabajo recomendando a los centros de inseminación el empleo de las tres fracciones para la preparación de las dosis, o bien la colección separada de las fracciones 1 y 3 y su empleo en el momento de la inseminación artificial.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alexopoulos, C.; Boscos, C.; Saratsis, P.; Saoulidis, C. and Kyriakis, 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. *Animal Science* 62: 599-604
- Alvarez, J. G. and Storey, B. T. 1982 Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.*; 27: 1102-1108.
- Arienti, G.; Carlini, E. and Palmerini, C.A. 1997 Fusion of human sperm to prostosomes at acidic pH. *J. Membr. Biol.*; 155 (1) 89-94.
- Arienti, G.; Carlini, E.; Nicolucci, A.; Cosmi, E. V.; Santi, F. and Palmerini, C. A. 1999 The motility of human spermatozoa as influenced by prostasomes at various pH levels. *Biol. Cell*; 91 (1) 51-54
- Arienti, G.; Carlini, E.; Polci, A.; Cosmi, E. V. and Palmerini, C. A. 1998 Fatty acid pattern of human prostasome lipid. *Arch. Biochem. Biophys.*; 358 (2): 391-395
- Ax, R. L.; Dally, M.; Didion, B. A.; Lenz, R. W.; Love, C. C.; Varner, D. D.; Hafez B. and Bellin M. E. 2000 Semen Evaluation. Hafez, B. and Hafez, E. S. E. *Reproduction in farm animals* 7<sup>th</sup> edition p.p. 365-375 .
- Bearden (1995) Evaluation of glucose as a cryoprotectant for boar semen. *Vet. Rec* 151 (61) 447-480.
- Beconi, M. T.; Francia, C. R.; Mora, N. G. and Affranchino, M. A. 1993 Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology*; 40 :841-851.
- Bellvé, A. R. and O'Brien, D. A. 1993 The mammalian spermatozoon: Structure and temporal assembly in: *Mechanisms and control of animal fertilization*, Hartman, J. F. (Ed) New York. Academic p. p. 55-137
- Bischof, R.J.; Lee, C.S.; Brandon, M.R. and Meeusen, E. 1994. Inflammatory response in the pig uterus induced by seminal plasma. *J. Reprod. Immunol.*; 26: 131-146.
- Brezińska, E.; Ślebodziński, B. A.; Pietras, B. and Wieczorec, G. 1995 *Biological Trace Element Research*; 47: 69-74.

- Calvete, J. J.; Raida, M.; Gentzel, M.; Urbanke, C.; Sanz, L. and Töpfer-Petersen, E. 1997 Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine-binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. FEBS letters 407: 201-206
- Calvete, J. J.; Mann, K.; Schäfer, W.; Raida, M.; Sanz, L. and Töpfer-Petersen, E. 1995 Boar spermadhesin PSP-II: location of posttranslational modifications, heterodimer formation with PSP-I glycoforms and effects of dimerization on the ligand-binding capabilities of the subunits. FEBS letters 365: 179-182
- Calvete, J. J.; Sanz, L.; Enßlin M. and Töpfer-Petersen, E. 1996 Reprod. Domest. Anim.; 31(1) : 101-104.
- Čapková, J. and P knicová, J. 1997. Binding of boar spermatozoa to porcine aocytes: effect of low molecular weight 17-kDa protein. . Mol. Reprod. Devel.; 46:168-175.
- Chun-Xia, Z. and Zeng M. Y. 2000 Evaluation on sperm quality of freshry ejaculated boar semen during in vitro storage under diferent temperatures. Theriogenology; 53:1477-1488.
- Ciereszko, A.; Ottobre, J. S. and Glogowski, J. 2000 Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. Anim. Reprod. Sci.; 64: 89-96.
- Claus, R. 1990 Physiological role of seminal components in the reproductive tract of the female pig. J. Reprod. Fert. Suppl.; 40: 117-131.
- Cole, A.; Meistrich, M. L.; Cherry, L. M. and Trostle-Weige, P. K. 1988 Nuclear and manchett development in spermatids on normal and *azh-azh* mice. Biol. 38:385-401
- Dostál, J. and Veselsk , L. 1972 Proteins in the seminal plasma and the accesory sexual gland fluids of the boar. J. Reprod. Fert.; 30: 255-267.
- Decuadro-Hansen 1999 Avances en la inseminación artificial porcina. Technologies. 1-11
- Eddy, E. M. and O'Brien; D. A. 1994. The spermatozoon. In The Physiology of Reproduction. Second Edition, Ed. Knobil, E. and Neill D. J. Raven Press, Ltd , New York. 1063-1090.
- Einarsson, S. 1980 Artificial Insemination; in Morrow, A. D. Current Therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in animals. p.p. 1021-1037.

- Flesch, F. M.; Colenbrander, B.; van Golde, L. M. G. and Gadella, B. M. 1999 Capacitation induces tyrosine phosphorylation of proteins in the boar semen plasma membrane. *Bioch. Bioph. Res. Comm.*; 262: 787-792
- Florman, H. M. and Babcock, D. F. 1991 Progress toward understanding the molecular basis of capacitation. In PM Wassarman(ed): "Elements of mammalian fertilization." Vol. I: "Basic concepts." Boca Raton, Florida: CRC Press, p.p. 105-132
- Franker, D. R. and Slabber, C. F. 1981. Reproductive immunology: I. the effect of different protein concentrations of seminal plasma on in vitro lymphocyte cultures. *Andrologia*; 13: 504-507.
- Fraser, D. H. 1982 Reproductive examination of the boar. *Theriogenol.* 8:1-48; F.A.O. p.p. 4-9
- Fuentes-Mascorro. G. (a); Vergara, O. M.; Mercado, E., Hernández, P. O. and Rosado, A. 2000 Participation of DNA structure on sperm chromatin organization. *Archives of Andrology*; 45:61-71
- Fuentes-Mascorro. G. (b); Serrano, H. and Rosado, A. 2000 Sperm chromatin. *Archives of Andrology*; 45:215-225.
- Gadella, B. M. 1996 Lipid changes in the plasma membrane of capacitating boar spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*; 31(1): 63-73
- Gadella, B. M.; Miller, N. G. A.; Colenbrander, B.; van Golde, L. M. G. and Harrison, R. A. P. 1999 Flow cytometric detection of transbilayer movement of fluorescent phospholipid analogues across the boar sperm plasma membrane: elimination of labeling artifacts. *Mol. Reprod. Devel.*; 53: 108-125
- Garner, D. L. and Hafez, E. S. E. 2000 Spermatozoa and seminal plasma. Hafez, B. and Hafez, E. S. E.. *Reproduction in farm animals 7<sup>th</sup> edition* p.p. 96-109.
- Hadjisavas, M. (A); Laurenz, J. C. and Bazer, E. W. 1994 Seminal plasma (SPL); a potential mediator of inflammation in the uterus following mating in the pig. *Biol. Reprod*; 50: 73-76.
- Hadjisavas, M. (B); Armstrong, D.T. and Seamark, R. F. 1994 Purification of cell-cell adhesion regulator from porcine seminal vesicle fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 205: 1206-1216.
- Hafez, E. S. E. 2000 Semen evaluation. In Hafez B. and Hafez, E. S. E. *Reproduction in farm animals 7<sup>th</sup> edition.* p.p. 365-373

- Harayama, H.; Liao, P.; Gage, D. A.; Miyake, M.; Kato, S. and Hammerstedt, R. H. 2000 Biochemical characterization of sialoprotein "anti-agglutinin" purified from boar epididymal and seminal plasma;. Mol. Reprod. Devel.; 55: 96-103.
- Harayama, H.; Miyake, M. and Kato, S. 1999 Immunolocalization of anti-agglutinin for spermatozoa in boars. Mol. Reprod. Devel.; 52: 269-276.
- Harrison, R. A. P. and Miller, N. G. A. 2000 cAMP-dependent protein kinase control of plasma membrane lipid architecture in boar sperm. Mol. Reprod. Devel.; 55: 220-228
- Harrison, R. A. P. ; Ashworth, P. J. C. and Miller, N. G. A. 1996 Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. Mol. Reprod. Devel.; 45: 378-391
- Hicks, J. J. 1988 Glicoproteínas y proteoglicanos. Hicks, J. J. y Díaz Zagoya, J. C. Bioquímica e inmunología. 1ª edición p.p. 149-167.
- Huh, K. and Li, L. S. H. 1999 Purification and partial peptide séquence análisis of the boar proacrosin binding protein. Mol. Reprod. Devel.; 55: 220-228
- Iwamoto, T., Tsang, A.; Luterman, M.; Dickson, J.; Lamirande, E.; Okuno, M.; Mohri, H. and Gagnon, C. 1992 Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. Mol. Reprod. Devel.; 54: 76-80
- Johnson, L. A.; Weitze, K. F., Fiser, P. and Maxwell, W. M. C. 2000 Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci. ;62: 143-172.
- Johnson, L. A.; Aalbers, J. G.; Willems, C. M. T. and Sybesma, W. 1981 Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. J. of Anim. Sci.; 52 (5) 1130-1136
- Jonáková, V.; Kraus, M.; Veselsk , L.; Cechova, D.; Bezouška, K. and Ticha, M. 1998 Spermadhesin of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. J. Reprod. Fert.; 114: 25-34
- Korniewicz, D.; Szczesniak-Fabianczyk, B. and Smorang, Z. 1996 The survival rate and fertilizing capacity of boar semen diluted with different diluents III. Reprod. Domest. Anim. 31(1)273-274

- Kwok, S. M. C. (a); Soares, M. J.; McMurtry, J. P. and Yurewicz, E. C. 1993 Binding characteristics and immunolocalization of porcine seminal protein, PSP-I. *Mol. Reprod. Devel.*; 35: 244-250
- Kwok, S. M. C. (b); Yang, D.; Dai, G.; Soares, M. J.; Chen, S. and McMurtry, J. P. 1993 Molecular cloning and sequence analysis of two porcine seminal proteins, PSP-I, PSP-II: new members of spermadhesin family DNA. *Cell Biol*; 12: 605-610
- Kuypers, F.A., Lewis, R.A., Hua, M., Schott, M.A., Discher, D., Ernst, J.D., Lubin, B.H., 1996 Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cell using fluorescently labeled annexin V. *Blood*; 87 (3) 1179-1187.
- Leshin, L. S.; Raj, S. M. P.; Smith, C. K.; Kwok, S. C. M.; Kraeling, R. R. and Li, W. I. 1998 Immunostimulatory effects of pig seminal proteins on pig lymphocytes. *J. Reprod. Fert.*; 114: 77-84
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951 Protein measurement with folin phenol reactive. *J. Biol. Chem.*; 193: 265-269
- Lyczynski, A. and Kolat, K. 1996 Boar semen preservation in MR-A Diluted. III International conference on boar semen preservation. *Reprod. Domest. Anim.*; 31 : 271-272
- Maxwell, W. M. C. and Johnson, L. A. 1999 Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*; 52: 1353-1362.
- Meijer, J. C. and Vlissingen Van, F. J. M. 1993 Gross Structure and development of reproductive organs. *Reproduction in domesticated animals*. 9 edition, ed. King, G. J. 28-34.
- Miller, T. J. and Ax R. L. 1999 Carbohydrates and fertilization in animals,. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 184-198
- Moos, J.; Veselský, L.; P knicová, J. and Drahorád, J. 1992 Purification and partial characterization of the kDa sperm coating protein from boar seminal plasma. . *Mol. Reprod. Devel.*; 33: 165-171.
- OMS. manual de examen de semen humano. 1989.
- Parry, R. V.; Barker, P. J. and Jones, R. 1992 Characterization of low Mr zona pellucida binding proteins from boar spermatozoa and seminal plasma. *Mol. Reprod. Devel.*; 33:108-115.

- Parrish, J. J. and First, N. L. 1993 Fertilization. Reproduction in domesticated animals. 9 edition, ed. King, G. J. 195-203.
- Petrounkina, A. M.; Harrison, R. A. P.; Petzoldt, R.; Weitze, K. F. and Töpfer-Petersen, E. 2000 Cyclical changes in sperm volume during *in vitro* incubation under capacitating conditions: a novel boar semen characteristic. J. Reprod. Fert.; 118: 283-293
- Pinart, E.; Sancho, S.; Briz, M. D.; Bonet, S. and García, N. 1999 Characterization of the semen quality of postpuberal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. Anim. Reprod. Sci; 55: 269-278.
- Poccia, D. L. 1986. Remodeling of nucleoprotein during gametogenesis, fertilization and early development. Int Rev Cytol, 105: 1-10
- Plucienniczak, G; Jagiello, A.; Plucienniczak, A; Holody, D. and Strzezek, J. 1999 Cloning of complementary DNA encoding the pB1 component of the 54-kilodalton glycoprotein of boar seminal plasma. Mol. Reprod. And Dev.; 52: 303-309
- Rath, D.; Johnson, L. A.; Drabrinsky, J. R.; Welch, G. R. and Niemann, H. 1997 Production of piglets preselected for sex following *in vitro* fertilization with x and y chromosome – bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. Theriogenology; 47: 795-800.
- Rigau, T.; Piedrafita, J.; Reverter, A.; Canal, M. and Rodríguez Gil, J. E. 1996 Reprod. Domest. Anim; 31(1) : 253-254.
- Rozeboom, K. J.; Troedson, M. H. T.; Hodson; H. H.; Shurson, G. C. and Grabo, B. G. 1999 The importance of seminal plasma in the fertility of subsequent artificial insemination in swine. J. Animal Sci.; 78: 443-448.
- Rutherford, K. J.; Swiderek, K.M.; Green, C. B.; Chen, S.; Shivele, J. E. and Kwok, S. C. M. 1992 Purification and characterization of PSP-I and PSP-II Who major proteins from porcine seminal plasma. Arch. Biochem. Biophys; 295:352-359.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Manials, T. 1989 Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Volume 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press p. p. 18.48-18.58
- Sanz, E.; Avila, L. M.; Gaitán, P.; Escobar, M.; Santos, A.M.; Fernández, A.; Ruiz, J. A. y Madero, J. I. 2001 Importancia de las glándulas sexuales accesorias en el eyaculado. Andrología; 1-8

- Sanz, L.; Calvete, J. J.; Mann, K.; Gabius, H. J. and Töpfer-Petersen, E. 1993 Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role for spermadhesin in fertilization. *Mol. Reprod. Devel.*; 35: 37-43.
- Schellpfeffer, D. A. and Hunter, A. G. 1970 Electrophoretic and gel filtration behaviour of boar seminal plasma proteins before and after removal of accessory sex glands. *J. Reprod. Fert.*; 23: 291-298
- Schroit, A. J. and Zwaal, R. F. A. 1991 Transbilayer movement of phospholipids in red and platelet membranes. *Biochim. Biophys. Acta*; 331: 313.
- Setchell, B. P. 1993 Male Reproduction. *Reproduction in domesticated animals*. 9 edition, ed. King, G. J. 83-91
- Setchell, B. P. and Maddocks, S. 1994 Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction*. Second Edition, Ed. Knobil, E. y Neill D. J. Raven Press, Ltd , New York. 1063-1090.
- Sharpe, M. R. 1994 Regulation of spermatogenesis. *The Physiology of Reproduction*. Second Edition, Ed. Knobil, E. y Neill D. J. Raven Press, Ltd , New York. 1363-1385.
- Sisson, S. y Grossman, J. D. 1994 *Anatomía de los animales domésticos* . 5ª edición, editores Salvat pp 1430-1434.
- Solís, D.; Romero, A.; Jiménez, M.; Díaz-Mauriño, T. and Calvete, J. J. 1998 Binding of mannose-6 phosphate and heparin by boar seminal plasma PSP-II, a member of the spermadhesin protein family. *FEBS letters* 431: 273-278.
- Tardif, S.; Sirard, M.; Sullivan, R. and Bailey, J. L. 1999 Identification of capacitation –Associated phosphoproteins in porcine sperm electroporated with ATP  $\gamma$ -<sup>32</sup>P. *Mol. Reprod. Devel.*; 54: 292-302
- Varela, F. P.; Romero, A.; Sanz, L.; Romão, J. M.; Töpfer-Petersen, E. and Calvete, J. J. 1997 The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *J. Mol. Biol.* ; 274: 635-649.
- Waberski D. 1996 Boar seminal plasma and fertility. *Reprod. Domest. Anim.*; 31 (1) : 87-90

- Waberski, D. and Weitze, K. F. 1996 Correct timing of artificial insemination in pigs. *Reprod. Domest. Anim*; 31 : 527-530.
- Waberski, D. ; Weitze, K. F.; Lietmann, C.; Lübbert zur Lage, W.; Bortolozzo, F. P.; Willmen, T. and Petzoldt, R. 1994 The initial fertilizing capacity of longterm-stored liquid boar semen followinig pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology*; 41: 1367-1377.
- Ward, W. S. and Coffey, D. S. (1991) DNA packagin and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cell . *Biol. Reprod.* 44: 569-574.
- Watson, P. F. 1995 Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of the post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891
- Wayne, L. S. 2000 Guía básica para la recolección del semen porcino: evaluación y procesamiento. Universidad de Purdue, West Lafavette pp 1-5
- Williams, K.; Frayne, J.; McLaughlin, E. A. and Hall, L. 1998 Expression of extracellular peroxide dismutase in the human male reproductive tract, detected using antisera raisen against a recombinant protein. *Mol. Hum. Reprod.* 4(3)235-242
- Xu, X; Ding, J.; Seth, P. C. Harbison, D. S. and Foxcrot, G. R. 1999 In vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes: effects of boar and ejaculated fraction. *Theriogenol.*; 45: 745-755
- Yang, W. C.; Kwok, S. C. M.; Leshin, S.; Bollo, E. and Li, W. I. 1998 Purified porcine seminal plasma protein enhaces *in vitro* inmune activities of porcine peripheral lymphocytes. *Biol. Reprod.*; 59: 202-207
- Zhu, J.; Xu, X.; Cosgrove, J. R. and Foxcroft, G. R. 2000 Effects of seminal plasma from different fractions of individual ejaculates in IVF in pigs. *Theriogenology*; 54: 1443-1452.

Anexos

DUROC	F1 pH	F2 pH	F3 pH	F1 Conc	F2 Conc	F3 Conc	F1 Vivos	F2 Vivos	F3 Vivos	F1 Norm	F2 Norm	F3 Norm
Chapingo	22/06/2001	8	7.6	6.9	730	2385	246	87.5	90	87.5	65	85
Reyes 26	18/07/2001	7.7	6.9	6.9	180	550	24	87.5	66	90.5	92.5	92.5
Sn Carlos 1	26/07/2001	7.6	7.5	6.9	31.5	710	18.5	100	92	88.5	88	88
Sn Carlos 2	26/07/2001	8	7	6.9	70	945	3	100	95.5	96.5	98	98
Tepa 20	27/07/2001	7.8	8	6.8	12.5	135.5	55.5	26	97	87	97	97
Jal 239-4	01/08/2001	7.5	8	7	1205	680	25.5	100	100	99	97	97
Jal Dex	03/08/2001	7.5	7.2	7	1415	576	24.5	91.5	99.5	99	97	97
Cerca 11	05/09/2001	7.6	6.8	8	3	575	29.5	98.5	100	97.5	99	99
Cerca 12	05/09/2001	7	6.6	7.6	3.5	420	31	97	88	99.5	100	100
Atenco 1	03/12/2001	7	7	7.6	540	660	80	86.5	91.5	80	97.5	100

F1 Int	F2 Int	F3 Int	F1 A	F2 A	F3 A	F1 Gota	F2 Gota	F3 Gota	F1 C/d	F2 C/d	F3 C/d	F1 S/c	F2 S/c	F3 S/c	F1 vol	F2 vol	F3 vol
Chapingo	90	89	88	35	15	3	0	0	0	0	0	0	0	0	5	61	97
Reyes 26	98	98.5	92.5	6.5	7.5	1.5	1	0	0	0	0	0	0	0	14	12	70
Sn Carlos 1	96	95	86	5	1	0.5	5	4.5	2.5	1.5	6.5	0	0	0	9	11	33
Sn Carlos 2	99	97.5	95	1.5	1	0.5	2	1	2.5	0	0	0	0	0	1	17	12
Tepa 20	89.5	95	90	1.5	0	1.5	9	3	8.5	2.5	0	0	0	0	2	60	7
Jal 239-4	99	98.5	98.5	1	2	1.5	0	1	3.5	0	0	0	0	0	1.5	5	6
Jal Dex	90	97.5	99	0	1.5	0	1	1.5	1	1	0	0	0	0	15	40	25
Cerca 11	99	100	98.5	1.5	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	11.2	15.7	19.5
Cerca 12	98	99	98.5	0	0	0	0.5	0	2	0	0	0	0	0	11.9	26	57
Atenco 1	97	98	95	0	0	0	3.5	2.5	0	16.5	0	0	0	0	8.5	8.7	7.3

HAMPSHIRE	F1pH	F2pH	F3pH	F1 Conc	F2 Conc	F3 Conc	F1 Viv	F2 Viv	F3 Viv	F1 Nor	F2 Nor	F3 Nor	
Reyes 295	20/06/2001	6.93	6.83	6.71	31.5	610	34	92.5	95.5	96	86.5	96	94
Reyes 296	18/07/2001	7.3	7.2	6.7	84	475	162	100	100	100	99.5	98	100
Reyes	25/07/2001	7.5	7.8	6.9	127	195	9	78	96.5	98.5	59	92.5	94.5
Jal Exe 1	01/08/2001	7.9	8	6.8	110	85	17.5	100	93.5	100	99.5	99	99.5
Jal Combo	01/08/2001	8	7.6	7	189	200.5	16.5	91	96.5	99	100	98.5	99
Jal Tops	03/08/2001	8	7.5	7.1	2	345	1080*	23	96	94.5	7	98.5	99
Jal WR2	03/08/2001	6.5	7.1	7.3	159	86	28	99.5	91	99.5	99	98.5	97.5
Azcap 2348	13/09/2001	7.6	7	7.2	42.5	99	6	1	100	99.5	87.5	96	97.5
Azcap 161	20/09/2001	7	6.6	6.8	10	440	21.5	96	93.5	98	100	99.5	97.5

	F1Int A	F2Int A	F3 Int A	F1Gota	F2 Gota	F3 Gota	F1c/d	F2 c/d	F3 c/d	F1 s/c	F2 s/c	F3 s/c	F1Vol	F2Vol	F3Vol
Reyes 295	91	94.5	95	6	0	3.5	7	1.5	1.5	0.5	2.5	1	8	10	50
Reyes 296	99	98.5	99.5	0	4	0	0.5	0	0	0	0	0	11	10.5	55
Reyes	96	99.5	96.7	41	7.5	5.5	0	1	0	0	0	0	8	10	50
Jal Exe 1	99	98	96	0	2	0.5	0.5	0	0	0	0	0	7	16	34
Jal Combo	99	99.5	97.5	0	1.5	1	0	0	0	0	0	0	2	10	17
Jal Tops	83	95.5	96	0	1	1	14.5	0	0	78.5	0.5	0	8	43	14
Jal WR2	98	95	99	1	1.5	1.5	0	0	1	0	0	0	30	70	10
Azcap 2348	75	95	93.5	2.5	0	0	7	4	1	1	0	1.5	19	20	21.5
Azcap 161	99	97	99	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1.5	5.1	78	65

LANDRACE	F1 pH	F2 pH	F3 pH	F1 Conc.	F2 Conc.	F3 Conc.	F1 Vivos	F2 Vivos	F3 Vivos	F1 norm	F2 Norm	F3 Norm
Adelfa	7.5	7.2	7.1	4	1300	6	75	95.5	65.5	56.5	91.5	71
Sn Carlos 1	7.9	7.7	7	11	815	72.5	98	94	100	93.5	91.5	90
Tepa 10	7.8	8	7	8.5	57.5	3.5	0	98	100	94	88	95.5
Jal 280-5	7.4	7.9	6.8	37	197	104	100	68.5	82.5	70	79.5	75
Jal 280-8	6.8	7	7	100	85	125	100	100	100	91.5	92	95
Jal 223	7	7	6.8	40	90	1	98.5	97	30	85.5	65	53.5
Jal 224	9	6.6	9	20	735	5.5	86	80	85.5	99	88.5	98.5
Tepa 25	7.6	7.2	7.4	7	400	5	76	78	97.5	100	100	97.5
Ascaph 307	7.2	7.2	7	135	242	16.5	83	97	95.5	97.5	100	100
Encinos 203	7.4	7	7	50	1300	60	86.5	100	98.5	57	96	89.5

	F1 Int A	F2 Int A	F3 Int A	F1 Gota	F2 Gota	F3 Gota	F1 C/D	F2 C/D	F3 C/D	F1 S/C	F2 S/C	F3 S/C	F1 Vol	F2 Vol	F3 Vol
Adelfa	74	95	89.5	4	7	7.5	34	1	16.5	1.5	0.5	5	2	57	84
Sn Carlos 1	42.8	93.5	83	3	3.5	3	3	1	2.5	0.5	4	4.5	14	32	12
Tepa 10	57	95	98.5	0.5	1.5	0.5	5.5	4.5	3	0.5	6	1	5	36	35
Jal 280-5	93.7	95	98.5	1.5	2.5	2	25.5	18	20	3.5	0	3	1	40	33
Jal 280-8	99.5	99	97	7.5	5.5	4.5	0.5	2	0.5	0.5	0.5	0	6.2	21.3	24
Jal 223	83	80	83	1.5	5	0	8.5	29	0	4.5	1	3.5	7.7	9.3	7.5
Jal 224	100	99	95	0	1	1.5	1	10.5	0	0	0	0	4.2	5.4	10
Tepa 25	100	99.5	96.5	0	0	0	0	0	0	0	0	2.5	7.8	31.8	59.1
Ascaph 307	95	92.5	97.5	2.5	0	0	0	0	0	0	0	0	75.5	77.9	93
Encinos 203	78.5	95.5	90	44.5	4	8	2	0	1.5	0.5	0	0	4.5	8.6	40

YORKSHIRE	F1 pH	F2 pH	F3 pH	F1 Conc	F2 Conc	F3 Conc	F1 Vivos	F2 Vivos	F3 Vivos	F1 Norm	F2 Norm	F3 Norm
Reyes 515	20/06/2001	8.38	7.32	7.03	66	405	68	100	94.5	95.5	99	99.5
Reyes 514	11/07/2001	7	7.2	6.9	145	390	99	100	100	97.5	63.5	98.5
Adelfa	20/07/2001	7.9	7.1	6	60	495	60	90	90.5	89.5	49.5	72.5
Cerca 5	05/09/2001	7.6	6.8	7	61	490	78	86	89.5	94	100	99
Sn Lorenzo 2175	03/11/2001	7.4	7.2	7	21	205	54.5	100	99.5	100	100	100
Atenco 105	03/12/2001	6.6	6.8	7	560	3000	200	65	75	86	87.5	96.5
Atenco 71	03/12/2001	7.6	7	7.2	230	640	450	90	73	89	100	96
Atenco 104	03/12/2001	7.2	7	7.2	320	510	80	95	98	96	100	100
Atenco 50	03/12/2001	7.4	7	7.4	150	1070	190	90	85	75	99.5	60
Atenco 69	03/12/2001	7.2	7	7.2	130	720	60	70.5	68	75	96	98.5

	F1 Int A	F2 Int A	F3 Int A	F1 A	F1 gota	F2 gota	F3 gota	F1 C/d	F2 C/d	F3 C/d	F1 s/c	F2 s/c	F3 s/c	F1 vol	F2 vol	F3 vol
Reyes 515	97	98	96.5	0	0	0	0	1	0.5	0	0	0	0	18	10	7
Reyes 514	99	97.5	95.5	23	0	5	135	1.5	1.5	3	0	0	0	1	14	43
Adelfa	94.5	95	92.5	38.5	37.5	4	12	0	0	8	0	0	1	17	20	40
Cerca 5	100	99	97.5	0	0.5	0	0	0	0	0	0	0.5	0	10	30	40
Sn Lorenzo 2175	99	98	99.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	2	20
Atenco 105	97.5	99	96.5	0	0	0	6	1	1	0	6.5	2.5	0	10	10	10
Atenco 71	89.5	99	94	0	0	0	0	4	4	0	0	0	1.5	10	10	10
Atenco 104	99	97.5	92.5	0	0	0	0	0	0	2	0	0	6	7.5	10	10
Atenco 50	95	96	94	0	0	0	0.5	5	5	0	0	40	4.5	20	10	20
Atenco 69	88	98	90	0	0	0	4	1.5	1.5	0.5	0	0.5	0	9.4	10	20

## Alta concentración espermática

Raza	Granja	abrev.	Fecha	F 2	Zi	F1prot	F2prot	F3prot
y	Atenco 105	ATYF	03/12/2001	3000	4.07	6174.44	6864	7136.32
d	Chapingo	CHDA	22/06/2001	2385	3.03	6672.84	3793.82	8143.2
l	Adelfa	ADLA	13/06/2001	1300	1.19	4930.3	3493.62	5865.12
l	Encinos 203	ENLJ	19/11/2001	1300	1.19	1986.78	1584.52	5585.74
y	Atenco 50	ATYI	03/12/2001	1070	0.8	1575.5	1107	5276.3
d	Sn Carlos 2	SCDD	26/07/2001	945	0.59	6401.56	4600.74	5987.66

## Mediana concentración espermática

Raza	Granja	abrev.	Fecha	F 2	Zi	F1prot	F2prot	F3prot
l	Sn Carlos 1	SCLB	26/07/2001	815	0.37	3626.48	5100.53	5392.56
l	Jal224	JLG	08/08/2001	735	0.23	159.2	608.96	300.84
y	Atenco 69	ATYJ	03/12/2001	720	0.21	985.66	2085.8	4173.18
d	Sn Carlos 1	SCDC	26/07/2001	710	0.19	4315.2	4606.32	4317.6
d	Jal 239-4	JDF	01/08/2001	680	0.14	1917.76	6170.6	4661.7
d	Atenco 1	ATDJ	03/12/2001	660	0.11	1536.42	1398.68	4428.96
y	Atenco 71	ATYG	03/12/2001	640	0.07	628.86	3713.54	4064.72
h	Reyes 295	RHHA	20/06/2001	610	0.02	6574.96	4383.76	704.96
d	Jal Dex	JDG	03/08/2001	576	-0.04	3122.5	7760.24	6212.42
d	Cerca 11	CDH	05/09/2001	575	-0.04	2051.76	2506.06	3179.04
d	Reyes 26	RDB	18/07/2001	550	-0.08	2438	4690	2960
y	Atenco 104	ATYH	03/12/2001	510	-0.15	5198.6	4062.42	5333.82
y	Adelfa	ADYC	20/07/2001	495	-0.17	4598.28	2456.96	1637.02
y	Cerca 5	CY5	05/09/2001	490	-0.18	3086.78	5631.5	7130.58
h	Reyes 296	YHB	18/07/2001	475	-0.21	7973.64	6935.74	5660
h	Azcap 161	AZHI	20/09/2001	440	-0.27	4338.04	4739.56	5899.02
d	Cerca 12	CDI	05/09/2001	420	-0.3	26463.1	103339.42	10362.48
y	Reyes 515	RYA	20/06/2001	405	-0.33	4211.24	2900.32	5069.72
l	Tepa 25	TLH	01/09/2001	400	-0.34	1557.18	2091.34	2748.46
y	Reyes 514	RYB	11/07/2001	390	-0.35	2989.48	3187.62	4733.58

Baja concentración espermática

Raza	Granja	Abrev.	Fecha	F2	Zi	F1 prot	F2 prot	F3 prot
h	Jal Tops	JHF	03/08/2001	345	-0.43	4408.08	5600.96	2888.4
l	Ascap 307	AZLI	13/09/2001	242	-0.6	4649.76	5986.22	5320.62
h	Jal Combo	JHE	01/08/2001	200.5	-0.67	3677.84	7550.3	8026.1
y	Sn Lorenzo 2175	SLYE	03/11/2001	205	-0.67	4165.72	5862.86	4971.42
l	Jal 280-5	JLD	01/08/2001	197	-0.68	5111.02	2406.65	4801.18
h	Reyes 2308	RHC	25/07/2001	195	-0.68	3579.08	2057.12	3696.5
d	Tepa 20	TDE	27/07/2001	135.5	-0.78	3944.34	2060	3536.68
h	Ascap 2348	AZHH	13/09/2001	99	-0.84	1566.44	5295.2	5667.76
l	Jal 223	JLF	08/08/2001	90	-0.86	5083.64	4880.76	5370.34
l	Jal 280-8	JLE	06/08/2001	85	-0.87	4688.62	3343.32	3396.24
h	Jal WR2	JHG	03/08/2001	86	-0.87	6174.36	7414.04	6909
h	Jal Exe 1	JHD	01/08/2001	85	-0.87	5491.8	7860.09	7814.96
l	Tepa 10	TLC	27/07/2001	57.5	-0.92	359.08	3328.64	3315.8