

82
24



**EVALUACION DE LAS TINCCIONES DE KOVACS
Y FOOTE Y EOSINA NIGROSINA PARA LA
DETECCION DE FALLAS ACROSOMALES EN
ESPERMATOZOIDES DE CERDO.**

Tesis presentada ante la
División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la

Universidad Nacional Autónoma de México

Para la obtención del título de:
Médico Veterinario Zootecnista

P O R

MARIO ALBERTO MERLO BARAJAS

ASESORES:

MVZ. MA. ELENA TRUJILLO ORTEGA

MVZ. KATHERINE ARANCIBIA SALINAS

MVZ. RAFAEL HERNANDEZ GONZALEZ



MEXICO, D. F.

AGOSTO DE 1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Y dijo Dios:

Hágase la luz,

y la luz se hizo.

Genesis, I, 3.

A mis tíos (Juanita † y Antonio):

Por todo su apoyo sin el cual no le hubiese
logrado. Porque se que desde donde están verán
que cumplí. Lo prometido es deuda y aquí la tiene
Que Dios les bendiga siempre.

A mi mamá (Angela Barajas):

Por enseñarme con amor a afrontar la vida con
optimismo, perseverancia y paciencia.

Heal por tu amor,

crecí con tu cariño,

madure con tu ejemplo,

Viviré con tu recuerdo.

A mi papá (Salvador Meric):

Por su cariño incondicional.

El camino a sido difícil y sin embargo
no habría nadie mejor que tu.

AGRADECIMIENTOS

Y dijo Dios:

Hágase la luz,

y la luz se hizo.

Genesis, 1, 3.

A mis tíos (Juanita † y Antonio †):

Por todo su apoyo sin el cual no lo hubiese
logrado. Porque se que donde donde están verán
que cumplí. Lo prometido es deuda y aquí la tiene

Que Dios los bendiga siempre.

A mi mamá (Angela Barajas):

Por enseñarme con amor a afrontar la vida con
optimismo, perseverancia y paciencia.

Nací por tu amor,

crecí con tu cariño,

madure con tu ejemplo,

Viviré con tu recuerdo.

A mi papá (Salvador Marín):

Por su cariño incondicional.

El camino a sido difícil y sin embargo

no habría nadie mejor que tu.

A mis hermanos:

Angi, Jaime (Juan), Pety y Edí(tite). Por todos los momentos agradables que pasamos juntos, por ser siempre amigos en los que se puede confiar y porque día a día estamos más unidos.

Los Quiero.

A mis tías y tíos:

Por ese cariño tan especial que nos une ahora más que nunca, por estar a mi lado apoyándome siempre. Un especial a mis tías Lulú, Blanca, Lupe, Norma, María, Teresa, Bertha y a mis tíos Javi, Juan, Manuel, José, Tello, Alfredo, Luis Javier, Manuel V., mil gracias.

A Pety:

Por todo el amor y apoyo que siempre me brindas.

A Gadi y Bruno:

Por su amistad incondicional, por los buenos ratos y por dejarme entrar en su hermandad.
"Uno para todos y todos para uno".

A mis asesores:

**MVE. No. Elena Trujillo, MVE. Katherine Arancibia
MVE. Rafael Hernández, por su confianza y enorme
paciencia, durante todo este tiempo.**

**A los doctores de mi querida F.M.V.E. y maestros
que ayudaron en mi formación como persona y
profesionista.**

**A mis compañeros de la F.M.V.E. por los años de
"zona" convivencia y por las experiencias
compartidas, a todos gracias.**

A mis sinodales:

**Por ayudar en el perfeccionamiento de este
trabajo, MVE. Jorge López, MVE. Antonio Ferras
MVE. Roberto Martínez, MVE. Carlos Seguível, MVE.
No. Elena Trujillo.**

Al Depto. de Producción Porsina:

**Por soportarnos, no fue fácil pero lo lograron,
por su gente que siempre estuvo dispuesta a
compartir sus conocimientos.**

A Martha, Lucí y Susanita:

**Por nunca haber perdido la fé en mí y sobre
todo por el apoyo que siempre me brindarán.**

Gracias, nunca los olvidare.

CONTENIDO

	PAGINAS
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	7
HIPOTESIS.....	18
OBJETIVOS.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	28
CUADROS.....	27
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	37
LITERATURA CITADA.....	38

RESUMEN

MERLO BARRAJAS MARIO ALBERTO. "Evaluación de las tinciones de Kovacs y Foote y Eosina-nigrosina para la detección de fallas acrosomales en espermatozoides de verraco" (Bajo la dirección de los M.V.S. M^{rs}. Elena Trujillo Ortega, Katherine Arancibia Salinas y Rafael Hernández González.)

Se evaluaron las tinciones de Kovacs y Foote (K-F) y Eosina-nigrosina (E-N) para detectar espermatozoides vivos, muertos y con daño acrosomal. Se utilizaron 4 sementales: dos Large White y dos Landrace. Los animales fueron colectados cada tercer día hasta obtener un total de 24 muestras. Se colectó la parte líquida del eyaculado, el cual se diluyó en diluyente BTS, teniendo una concentración de 4×10^9 espermatozoides en 100 ml. de BTS. Se tomaron dos gotas del semen diluido y se prepararon con las tinciones de K-F y E-N, las muestras fueron evaluadas en los microscopios de contraste de fases para K-F y óptico para E-N. Se evaluaron 200 células por laminilla, los resultados obtenidos indican que ambas técnicas detectan más del 88% de espermatozoides vivos con acrosoma intacto sin encontrarse significancia estadística entre tinciones ($p > 0.05$), para las variables: espermatozoides vivos con acrosoma libre,

vivo con daño acrosomal, vivo sin acrosoma, muerte con daño acrosomal, muerte sin acrosoma, se encontró diferencia estadística significativa para la técnica de K-F ($P > 0.01$), para las variables: vivo sin acrosoma ni anillo postacrosomal, muerte con acrosoma intacto, muerte con acrosoma libre, muerte sin acrosoma ni anillo postacrosomal no se encontró diferencia significativa ($P > 0.05$). Por lo cual se puede concluir que las técnicas de K-M y K-F presentan la ventaja de detectar si el espermatozoide está vivo o muerto con acrosoma normal, pero la técnica de K-F además indica si existe daño acrosomal.

INTRODUCCIÓN

Debido al incremento de la población humana mundial, se ha observado la necesidad urgente de regular la utilización de los recursos renovables y no renovables. El recurso pecuario, requiere de la mayor comprensión de los diferentes eventos fisiológicos de la reproducción y su regulación, en las diferentes especies ganaderas, para incrementar y optimizar la utilización de este recurso (84).

Considerando que la reproducción y el crecimiento de los animales en una explotación constituyen los dos factores biológicos fundamentales de la producción. A los procesos reproductivos y a sus resultados les corresponde la máxima importancia zootécnica y económica, por ser tanto la base de la cría, como de la producción. Por ello se hace más necesaria la búsqueda de nuevas técnicas para que los sistemas de explotación de los animales domésticos sean lo más eficiente posibles (2,49).

El manejo reproductivo del verraco, dentro de las empresas porcícolas es de suma importancia, ya que los progresos genéticos que se tengan se deben en gran parte al semental. Con el uso de la inseminación artificial (I.A.) la eficiencia reproductiva de los cerdos se ve ampliamente favorecida, de cada verraco se obtiene semen suficiente para servir centenares de hembras (16,19,49).

Para asegurar el éxito de la inseminación artificial y de todas las ventajas que este método implica es necesario que al menos desde el punto de vista técnico se vigile que las formas de obtención del semen, conservación en su caso, morfología del espermatozoide, momento y forma de aplicación del semen sean óptimas (51).

De todas ellas la morfología del espermatozoide parece ser la condicionante de mayor trascendencia en el resultado final, que se verá reflejado en el porcentaje de fertilidad, esto debido a que la morfología del espermatozoide es la que de alguna forma asegura verdaderamente la fertilidad cuando los demás factores están controlados (29,41,52).

Durante mucho tiempo la evaluación de la movilidad progresiva y de una morfología normal en el espermatozoide se ha considerado como un método muy utilizado para establecer la viabilidad de los espermatozoides. Sin embargo en la actualidad estos métodos de evaluación deben ser considerados como complementarios que se deben unir a nuevas formas de evaluación como la observación del acrosoma para la selección de reproductores (51).

Revell et al. (1980) (41), señalan la importancia de realizar además de las pruebas existentes para clasificar la morfología del espermatozoide, una evaluación del acrosoma en el semen de verraco. Esto debido a que el acrosoma es un indicador de alta sensibilidad de las lesiones que se producen en la célula espermática durante los procesos a que son sometidas para su obtención, conservación (dilución, congelación y descongelación) y posterior utilización. Es bien sabido que dichos procesos son laboriosos, el costo del material es alto y resulta en bajos porcentajes de sobrevivencia espermática. Por ello se deben realizar estudios más concretos que aseguren que el semen a utilizar se encuentre con espermatozoides morfológicamente en las mejores condiciones, lo que no representará un problema más (2,5,40,51).

En la evaluación del acrosoma se han utilizado diferentes técnicas de tinción, esto debido a que el tiempo requerido para su preparación es relativamente corto y el material necesario no implica grandes gastos, lo

que las hace más atractivas comparadas con procedimientos de observación que requieren de microscopio electrónico. La confiabilidad de los diferentes procedimientos de tinción del acrosoma para distinguir la viabilidad y el estado del semen del verraco es variable y se verá afectado por los colorantes utilizados y los cuidados del técnico al realizar la tinción (39).

Oettlé (1986) (36), describe que una buena técnica de tinción deberá de cumplir con ciertos requisitos como son: seguros: que proporcione un contraste claro y limpio que permita una buena observación, sencillo: no requiera de equipo costoso, especializado y los pasos a seguir no sean complejos, estable: ningún componente de la tinción deberá afectar o causar cambios en la morfología del espermatozoide, eficaces: podrá utilizarse tanto en semen fresco como congelado así como en semen de diferentes especies sin perder sus características y que cuanto más se cumplan estos cuatro puntos la prueba será más confiable.

Quizás la técnica de tinción más difundida para evaluar el semen de verraco y de muchas más especies sea sin duda la E-M que aunque es una técnica rápida, presenta muchas dificultades para observar el acrosoma debido a la pobre tinción que le provee, requiriéndose de mucha experiencia para poder observar el acrosoma (4).

Bamba (1988) (4), en estudios realizados con la tinción de E-M encontró dificultades para observar el acrosoma y para clasificar a los espermatozoides en vivos y muertos, esto debido al alto porcentaje (10-15%) de espermatozoides que se tñían sólo parcialmente.

Talbot y Chacón (1981) (46) proponen una técnica de triple tinción que utiliza Azul Trypan, Café Bismark y Rosa de Bengala, la cual es modificada por Eucunaki *et al.* (1989) (30) y adaptado por Vázquez *et al.* (81) para poder ser utilizada en cordón, pero resulta tediosa por los procedimientos de preparación de las tinciones y tiempos de tinción.

REVISIÓN DE LA LITERATURA**ANATOMÍA Y FISIOLÓGIA DEL MARRAÑO**

Las partes funcionales del sistema genetal masculino del verraco son: el escroto y los testículos, los túbulo eferentes, los epidídimos, el pene y varias glándulas accesorias como la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales. Los testículos del verraco son cilíndricos, lateralmente comprimidos y relativamente grandes, su peso, en promedio es de los 300 g. con una longitud de 12 cm. Y en ellos se encuentran los túbulo seminíferos donde se producen los espermatozoides, los cuales son muy sensibles a los cambios de temperatura, siendo la disminución de ésta la que más daño causa sobre la morfología del espermatozoide. Después pasan a los epidídimos donde se almacenan y maduran hasta la eyaculación (2,10,31,37).

Las vesículas seminales, son grandes y desembocan en la uretra, separadamente de los conductos deferentes. La próstata está formada por un cuerpo adaptado dorsalmente a la uretra y por numerosas partes glandulares pequeñas situadas en la pared uretral. Las glándulas bulbouretrales miden de 15 a 20 cms. de longitud cubren ambos lados de la uretra, desde la salida pelviana. Las secreciones de las glándulas accesorias (vesículas seminales, glándulas bulbo-uretrales y próstata) se añaden a los espermatozoides en el momento de la eyaculación (15,37).

El pene se extiende hasta la región umbilical, su cuerpo presenta, un encorvamiento en forma de S, que se vence durante la erección. El glande, tiene forma similar a la de un sacacorchos (31).

REVISIÓN DE LA LITERATURA

ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL SEMENAL

Las partes funcionales del sistema genital masculino del verraco son: el escroto y los testículos, los tubos eferentes, los epidídimos, el pene y varias glándulas accesorias como la próstata, las vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales. Los testículos del verraco son cilíndricos, lateralmente comprimidos y relativamente grandes, su peso, en promedio es de los 360 g. con una longitud de 13 cm. Y en ellos se encuentran los tubos seminíferos donde se producen los espermatozoides, los cuales son muy sensibles a los cambios de temperatura, siendo la disminución de ésta la que más daño causa sobre la morfología del espermatozoide. Después pasan a los epidídimos donde se almacenan y maduran hasta la eyaculación (2,10,31,37).

Las vesículas seminales, son grandes y desembocan en la uretra, separadamente de los conductos deferentes. La próstata está formada por un cuerpo adaptado dorsalmente a la uretra y por numerosas partes glandulares pequeñas situadas en la pared uretral. Las glándulas bulbouretrales miden de 15 a 20 cms. de longitud cubren ambos lados de la uretra, desde la salida pelviana. Las secreciones de las glándulas accesorias (vesículas seminales, glándulas bulbo-uretrales y próstata) se añaden a los espermatozoides en el momento de la eyaculación (15,37).

El pene se extiende hasta la región umbilical, su cuerpo presente, un encorvamiento en forma de S, que se vence durante la erección. El glande, tiene forma similar a la de un sacacorchos (31).

COLECCIÓN DEL SEMEN

Se han descrito diversos métodos para la colección del semen de verraco, los cuales involucran la estimulación directa de la musculatura del aparato genital del macho o simulan la influencia de la vagina sobre el pene, estos métodos son; la vagina artificial, la técnica de la mano enguantada y la electroeyaculación (43).

Vagina Artificial. Este método es el que más se parece a las condiciones naturales, con el se pretende simular la temperatura, presión, lubricación y posición de la vagina de la hembra, con el objetivo de obtener del macho los mejores resultados (23,25,45).

El uso de la vagina artificial está muy difundido en bovinos y equinos, sin embargo en el caso del cerdo, es poco usado (26).

Técnica de la Mano Enguantada. En la actualidad es el método más generalizado, para la colección del semen de verraco en la mayoría de los países, esto debido a que es relativamente fácil, práctico y barato (11).

En esta técnica y utilizando la mano se simula la presión que producen los anillos cervicales sobre la porción espiral del pene lo que estimula el reflejo de eyaculación al verraco (11,33).

Tanto en la técnica de la vagina artificial como de la mano enguantada, se utiliza una hembra en calor o lo que es más común un maniquí, para que sea montado en el proceso de colección. Los verracos por lo general no presentan dificultad para acostumbrarse al maniquí y su entrenamiento suele ser rápido (11).

Electroestimulación: Para el uso de este método se tiende a recurrir a la sedación o anestesia general. Una sonda bipolar es introducida dentro del recto, la cual produce pulsaciones de bajo voltaje que estimulan la musculatura del aparato genital dando lugar a la eyaculación (25,27,42).

CARACTERÍSTICAS DEL EYACULADO: El eyaculado está formado principalmente por dos porciones, una líquida y una sólida, esta última no es importante y puede ser eliminada filtrando el eyaculado através de una gasa que cubra el recipiente de colección. (11,26)

Presenta una consistencia, en el caso del cerdo, casi siempre cremosa debido a las secreciones de que viene acompañado. El color normal del semen es el blanco amarillento, cualquier cambio que presente de este tono lo harán no apto para usarse. Su pH es ligeramente alcalino (7.3 a 7.9) (21,26).

De hecho el proceso de eyaculación está dividido en tres partes:

La primera o preespermática con duración de uno a cinco minutos, usualmente en cantidades de 5 a 15 ml. está formada por mucosidad y secreciones de las glándulas accesorias, formando del 5 al 20% del total del eyaculado y según parece no es necesaria para la fertilidad del semen. La segunda o espermática, está formada por secreciones de las glándulas accesorias (Bulbo-urtrales y próstata) y los espermatozoides que varía en volumen de 50 a 120 ml. su duración es de dos a cinco minutos su color es blanco lechoso y líquido. La tercera y última está constituida por grandes cantidades de una sustancia gelatinosa secretada por vesículas seminales, que actúa como tapón que impide el regreso de espermatozoides y le proporciona vitalidad, es clara y pobre en espermatozoides, y se le conoce como postespermática (11,21,25,26).

Generalmente durante el eyaculado se emiten de 150 a 200 ml de semen con un contenido de 250 a 350 x 10⁶ espermatozoides por ml (28,42).

FRECUENCIA DE COLECCIÓN DE SEMEN: La pubertad del semental porcino se presenta generalmente cuando cuenta de cinco a seis meses de edad, conforme aumenta la edad del cerdo se eleva el número total de espermatozoides en el eyaculado. Por lo que al alcanzar los cerdos los ocho meses de edad pueden ser colectados una o dos veces por semana, sin sobrepasar el máximo de ocho eyaculados mensuales. Los verracos de más de un año de edad se pueden incluir en el ritmo normal de obtención de semen, es decir, de dos o seis eyaculados por semana (28,28).

Se ha observado que al aumentar la frecuencia en la obtención de semen de un eyaculado cada dos semanas a dos eyaculados por día disminuye los valores referentes a volumen, concentración total por eyaculado y se eleva el porcentaje de espermatozoides con problemas en su morfología (ii).

EVALUACIÓN DEL SEMEN

El perfeccionamiento de las técnicas de tinción para la evaluación del semen han permitido determinar con mayor exactitud el porcentaje de células vivas, muertas y aquellas con daño acrosomal. El estimar la capacidad fertilizante de un verraco, en el desarrollo de las técnicas de tinción, sobre otros métodos para la evaluación del semen, es evidente debido a los bajos costos de las tinciones, la sencillez del equipo y su fácil aplicación (46).

La evaluación del semen es un método exacto y una herramienta útil para estimar la capacidad fertilizante del semen. Aunque el desarrollo de tal

método haya sido durante mucho tiempo una meta, intentos pasados para seleccionar el macho más fértil dentro de un grupo no han sido del todo satisfactorios. Esto es más aparente cuando se considera que la fertilidad del espermatozoide es una función biológica muy compleja (11).

Hay que mencionar que el objetivo principal de las pruebas "in vitro" para observar el posible potencial fertilizante de un macho, es determinar cuáles o cuántas células son funcionalmente competentes para llevar a efecto el proceso de fertilización (11).

En la actualidad los criterios más comunes utilizados en la clasificación de una muestra de semen son: El número total de espermatozoides en el eyaculado (de 30 a 60 X 10⁹), el volumen (varía de 100 a 500 ml), la motilidad progresiva (mayor al 70%) y las anomalías primarias y secundarias (las cuales deben de ser menores al 10% y 15% respectivamente), esto gracias a las pruebas "in vitro" (20,32,42,43,45).

Motilidad Progresiva: La evaluación de la motilidad es un criterio muy utilizado para determinar la calidad del semen de un verraco, esta evaluación se puede realizar antes de ser sometido al proceso de dilución y aún después de ser diluido (23,44).

Al realizarse la evaluación de la motilidad, antes de la dilución, debe hacerse inmediatamente después de ser colectado el semen, la muestra debe ser colocada en una laminilla seca, limpia, tibia (34-36°C) y se observa a bajo aumento (10x). Según la intensidad del "oleaje" (los espermatozoides deberán tener movimientos progresivos propios) que se produzca, la lectura se acercará o no a 90-95%, considerándose como buena motilidad de 70% o más. Los métodos para medir la motilidad van desde el

método anterior, que es muy subjetivo, hasta métodos tan sofisticados como el análisis de la motilidad por medio de la cinematografía, estos métodos aún usando computadoras para su análisis no demostraron ventajas sobre la evaluación menos costosa con el microscopio. De la misma manera se ha observado que la motilidad y la fertilidad aunque tienen una correlación positiva, es baja (11,21,23,25,27).

MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOSOIDES

El espermatozoide es un célula altamente especializada y su función es la fecundación del ovocito. En la estructura de esta célula se pueden distinguir principalmente tres regiones: a) La cabeza, cuya misión es penetrar en el ovocito y liberar su carga genética, consta fundamentalmente de un núcleo que está recubierto en la parte anterior por el acrosoma, al que juega un papel primordial en la fecundación del óvulo. b) El cuello, es la porción corta que une la cabeza con la cola c) La cola, en esta región se encuentran el aparato metabólico, las gotas citoplasmáticas y la parte locomotora del espermatozoide (9).

En trabajos clásicos sobre la morfología del espermatozoide se demostró que la infertilidad en el macho puede estar asociada a algunos cambios morfológicos en la población espermática. Esto coincide con trabajos recientes, en los que se afirma que cerdos con una producción de espermatozoides cuya forma se desvía de lo normal han sido totalmente estériles o por lo menos subfértiles (1,11,46).

En espermatozoides los defectos se han dividido en dos grupos :

1) **ANORMALIDADES PRIMARIAS**, se desarrollan durante la espermatogénesis y son causadas por procesos patológicos en el epitelio germinal

2) **ANOMALIAS SECUNDARIAS**; Son las alteraciones que probablemente se originan después de que las células espermáticas abandonan el testículo (23,45).

INTRODUCCIÓN DEL ACROSOMA: El acrosoma es la porción del espermatozoide que se localiza moldeada sobre el núcleo y cubierto por la membrana acrosomal, rodeada a su vez por la membrana espermática. Se ha observado que un espermatozoide con acrosoma intacto no puede penetrar un óvulo y en consecuencia no podrá liberar su contenido. Se requiere de cierto tiempo de acuerdo a la especie varía de 1 a 6 hrs. para que se dé el fenómeno de capacitación y reacción acrosómica, pudiendo entonces el espermatozoide liberar su contenido. Esta reacción debe ocurrir en forma natural en presencia del óvulo, y al espermatozoide no deberá presentar daños o alteraciones en su acrosoma, es por esto que la integridad del acrosoma y las reacciones que se dan en él, influyen de manera determinante sobre la capacidad fertilizante del espermatozoide, por lo que se señala que es importante utilizar técnicas de tinción que permitan observar y evaluar al acrosoma de los espermatozoides (3,13,17,23,34,35,44,46,50).

Se ha observado también que el acrosoma sufre cambios desde el momento en que es colectado, durante su almacenamiento, congelación y descongelación, por lo cual el porcentaje del daño acrosomal deberá de ser evaluado al momento de obtener el semen, con lo cual se garantiza que aún después de los procesos a que es sometido, la cantidad de espermatozoides sin daño acrosomal será suficiente para garantizarnos la fertilización del óvulo (20,40,53).

En años recientes se ha dado gran importancia a la evaluación de la morfología del acrosoma espermático con el microscopio de contraste de fases y con la ayuda de diferentes técnicas de tinción para espermatozoides, lo que se ha convertido en un valioso criterio para la evaluación de los espermatozoides. Dentro de los aspectos importantes al evaluar el acrosoma ayudándose con técnicas de tinción, se menciona la necesidad de distinguir entre una Reacción Acrosomal Normal (RAN), que se caracteriza por la fusión ordenada de las membranas acrosomales anteriores sin que éstas pierdan su integridad, de una Reacción Acrosomal Degenerativa (RAD), en la que se observa la ruptura acrosa de las membranas acrosomales con pérdida de la integridad de estas (6,7,17,22,23,26,30,47).

Billo *et al.* (63) comenta que la motilidad no debe de ser tomada como un criterio único y adecuado para la evaluación del semen. Esto concuerda con observaciones realizadas por Castañeda (1986) (13) y Fursel *et al.* (1972) (39), quienes mencionan que aunque la motilidad y morfología acrosómica guardan cierta relación es posible encontrar espermatozoides con daño acrosomal y móviles, de igual manera se observaron espermatozoides que a pesar de no presentar un daño acrosomal aparente podían encontrarse móviles o inmóviles.

EVALUACIÓN DEL ACROSOMA

En la actualidad existen una gran variedad de técnicas de tinción que buscan perfeccionar la tinción del acrosoma y en general del espermatozoide, mediante la utilización de diferentes colorantes. Aún cuando todavía no existe la técnica que se pueda considerar como perfecta para la evaluación del acrosoma, los investigadores remarcan la

necesidad de que el estudio del acrosoma debe ser considerado como parte de una prueba de laboratorio y que al igual que la motilidad que es un criterio muy utilizado para estimar la calidad del semen, pero solamente como un indicador de viabilidad celular. El poder determinar el porcentaje de acrosomas normales proporciona una información adicional de gran valor sobre la morfología del espermatozoide y permitirá una selección más fácil y exacta sobre cuales son los mejores seminales (5,36,40,52).

La técnica de tinción más utilizado en la evaluación del semen de verraco es la E-N (10,24,40).

Mancock (1987) (34) y Radford (1961) (7), cuestionaron la eficacia de la técnica de tinción de E-N y la calificaron como poco confiable en la tinción de espermatozoides de verraco para detectar vivos y muertos, esto debido a que algunas células aparecían parcialmente teñidas.

Sin embargo la técnica de E-N es también empleada para evaluar el acrosoma del espermatozoide, poniéndose en duda su eficacia por el alto grado de contraste que provee la nigrosina, lo que dificulta la observación del frotis y la coloca como poco confiable (5,46).

Tamuli et al. (1994) (48), modifica la técnica de tinción de E-N y lo complementa agregando el colorante de Giemsa para teñir espermatozoides de verraco, la técnica parece dar buenos resultados, no requiere de equipo costoso y las muestras pueden ser almacenadas por algunos meses. Pero se requiere de práctica para poder clasificar los acrosomas y sólo pueden ser observados cuatro tipos de espermatozoides: 1) Espermatozoides vivos con acrosoma intacto. 2) Espermatozoides vivos con acrosoma

- dañado. 3) Espermatozoides muertos con acrosoma intacto.
4) Espermatozoides muertos con acrosoma dañado.

Tisol *et al.* (1991) (50), basado en la técnica de E-M, la modifica e incorpora la utilización de solución de formol citrato en el proceso de fijación de los espermatozoides, logrando con esto detectar espermatozoides con reacciones acrosomáticas, espermatozoides con acrosomas normales, espermatozoides vivos y muertos, pero el proceso de fijación del espermatozoide requiere hasta de 3 días de permanecer en la solución de formol citrato después de ser colectado o descongelado y antes de ser teñido con E-M, lo cual convierte la técnica en un proceso largo.

Revell *et al.* (1988) (41), realizan una evaluación de la técnica de tinción de E-M y la comparan con una observación directa en microscopio electrónico del semen de verraco. Mencionando que con la técnica de tinción de E-M los espermatozoides observados al microscopio óptico eran difíciles de clasificar, además de presentar una pobre tinción del acrosoma. En tanto que con el microscopio electrónico observa alteraciones del acrosoma en 11 de 17 verracos estudiados, con lo que concluye que se hace indispensable evaluar el acrosoma de los espermatozoides y la búsqueda de métodos más económicos para lograrlo a nivel de campo, que permitirán una decisión exacta sobre el potencial de fertilidad de los sementales.

Vásquez *et al.* (1992) (52), realizan una modificación a la prueba de Kusunoki *et al.* (36) y la adapta para estudiar el acrosoma en espermatozoides de verracos, esto con los colorantes de Azul trypan, café Bismark y Rosa de Bengala, reportando que una parte de los

espermatozoides trabajados sólo se presentaban parcialmente teñidos, lo que dificultaba su observación. Las tinciones deben de ser preparadas en el momento de ser empleadas y sólo logra detectar cuatro clases de espermatozoides: 1) Espermatozoides vivos con acrosoma normal. 2) Espermatozoides vivos sin acrosoma. 3) Espermatozoides muertos con acrosoma normal. 4) espermatozoides muertos sin acrosoma.

Bryan y Akruk (1977) (8), utilizan los colorantes, Amarillo 8 Naphtol y Erythrosin B, para teñir espermatozoides de conejo y observar daño acrosomal. La técnica resultó de fácil aplicación y con resultados buenos en la tinción del acrosoma y en la observación de la presencia o ausencia de este, pero la técnica de tinción no permitía realizar una valoración de espermatozoides vivos y muertos, por lo que resultó poco práctica como prueba de rutina.

Por otra parte Kovacs y Foote (1982) (29), estudiaron una tinción a base de azul Tripano y Giemsa la cual según sus resultados permitirá observar hasta 10 diferentes variedades de espermatozoides, dentro de las cuales se indicará si el acrosoma se encuentra intacto, dañado o bien se ha perdido. Los grupos en que clasifican a los espermatozoides son: 1.- Vivo con acrosoma intacto, 2.- Vivo con acrosoma libre, 3.- Vivo con daño acrosomal, 4.- Vivo sin acrosoma, 5.- Vivo sin acrosoma ni anillo postacrosomal, 6.- Muerto con acrosoma intacto, 7.- Muerto con acrosoma libre, 8.- Muerto con daño acrosomal, 9.- Muerto sin acrosoma, 10.- Muerto sin acrosoma, ni anillo postacrosomal.

INTRODUCCIÓN

La utilización de la tinción de K-F como prueba de rutina en la evaluación de semen permitirá observar al igual que la tinción de E-N espermatozoides vivos, muertos y pero además nos indicara si el acrosoma se encuentra intacto o dañado.

OBJETIVOS

1) Demostrar que con la tinción de K-F es posible detectar espermatozoides vivos, muertos y una mayor cantidad de fallas acrosomales en semen fresco.

2) Evaluar si la tinción de K-F, al igual que la tinción de E-N puede ser utilizada como una prueba de rutina en la evaluación de semen.

MATERIAL Y METODOS

A) LOCALIZACION

El presente trabajo se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensivismo en Producción Porcina (C.E.I.E.P.P.), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) que se encuentra ubicada en el municipio de Jilotepec, en la zona norte del Estado de México, geográficamente se localiza ubicada entre los 99 26' 33" de longitud oeste (mínima) y los 94 44' 22" (máxima) del Meridiano de Greenwich, a una altura de 2,250 mts. sobre el nivel del mar. Colinda al norte con el estado de Hidalgo, al sur con el municipio de Chapa de Mota, al sureste con el Valle del Carbón, al este con el municipio de Joyaniquilpan y el estado de Hidalgo, al oeste con los municipios de Aculco, Tmilpan y al noroeste con el municipio de Polotitlán. El clima en la región es frío: templado en verano, la temperatura media varía entre los 12 y 24 C, con régimen de lluvias comprendido entre los meses de junio a septiembre (12).

La evaluación de la morfología acronasal se realizó en los departamentos de Producción Animal Cerdos (D.P.A.C.) y en el departamento de Reproducción (D.R.) de la F.M.V.Z. (U.N.A.M.), ubicados en Ciudad Universitaria, México, D.F.

B) ANIMALES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 4 cerdos: Dos de la raza Landrace y dos de la raza Large white. Con una edad promedio de dos años y medio, y pertenecientes al C.E.I.E.P.P.

C) DILUYENTES Y DILUCION

Se preparó la solución de Beltsville Thawing Solution (BTS). El diluyente BTS es preparado en las instalaciones del C.E.I.S.P.D. y su composición es la siguiente:

A.P.S.	Cont. (gr.)
Dextrosa	37
Citrato trisódico	6
Bicarbonato de sodio	1.25
EDTA	1.25
Cloruro de potasio	0.75
Contamicina	0.010
Agua desionizada	cbp. 1000 ml

La cual es mantenida en refrigeración de 2-6° C hasta su utilización. momento en el que será calentado a baño María para igualar su temperatura a la del semen colectado 22-28° C, cuando la temperatura de ambos es igual se mezcla deslizando suavemente el semen por la pared del recipiente que contiene el diluyente y se homogeniza la mezcla.

D) TINCIONES

Se prepararon las tinciones de K-F y B-N:

Tinción de K-F: Se utilizó Azul de tripano al 0.25% en 0.01% de NaCl (la preparación es estable por periodos largos). El fijador esta compuesto por 66ml HCL al 1N, 14 ml de solución de formaldehído y 0.2g de rojo neutro (el fijador es estable por periodos largos), y por último la tinción de Giemsa se preparó al 7.5% diluida en agua destilada.

Tinción de E-N: Fue requerido para elaborar la tinción 5g. de Nigrosina (soluble en agua), 0.035g. de eosina, 1.65g de Citrato de sodio y 50ml de agua destilada. Primariamente se disolvieron los 1.65g de citrato de sodio en el agua destilada, en seguida se disolvió la nigrosina y eosina en un matras que contenía el agua destilada y el citrato de sodio, se colocó en baño María por 20 min. y se filtró por último la solución con papel filtro del No.1. La tinción fue mantenida a 5° C.

6) CROCOS EXPERIMENTALES

Cada semantal fue colectado 6 veces a intervalos de tres días entre cada colección, en el mes de julio. Se colectaron un total de 24 eyaculados. Todos se diluyeron en solución de BTS

7) PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los semantales fueron colectados en el corral de monta utilizando el potro de monta y siguiendo la técnica de la mano enguantada descrita por Melrose (1966) (33). El procedimiento para evaluar el semen, fue como se describe a continuación:

MOTILIDAD

Primariamente se tomó con una pipeta Pasteur una gota de semen y se colocó en un portobjetos que se encontraba en una termoplatina a una temperatura entre 35 y 37° C, se colocó un cubreobjetos y se procedió a evaluar el porcentaje de motilidad progresiva de los espermatozoides en el microscopio óptico, con el objetivo seco débil (10x)

TÉCNICAS DE TINCIÓN

De cada muestra preparada se obtuvieron dos gotas las cuales se colocaron una en cada portaobjetos para teñirlas con las tinciones de K-P (25) y E-N (26).

Rojo-azul

A la gota contenida en el portaobjetos se le añadió una gota de azul trypan, se mezcló suavemente y se realizó un frotis, se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco el frotis fue colocado en la solución fijadora por 2 min. en forma vertical. Inseguida se tiñó el frotis con Giemsa al 7.5% por periodo de 4hrs. Después fue colocado en un recipiente con agua destilada por 2 min., se enjuagó con chorro de agua y se dejó secar.

Rojo-nigrosina

A la gota puesta en el portaobjetos se le agregó una gota de tinción de E-N (26), se mezcló suavemente y se realizó un frotis que se dejó secar en el laboratorio a temperatura ambiente.

CONCENTRACION NUMÉRICA

Utilizando un pipeta de Thoma se hizo una dilución de 1:200 tomando como soluto el semen y como solvente una solución de citrato de sodio al 3.6% con Formalina. Posteriormente se homogenizó, agitando suavemente, se desecharon las cinco primeras gotas de la dilución, colocándose las siguientes dos gotas en las dos cámaras cuenta glóbulos que forman la cámara de Neubauer (una gota en cada cámara), y se procedió a contar en el microscopio óptico con el objetivo poco fuerte. De las 25 áreas de cuadrícula que tiene cada cámara, se tomaron en cuenta únicamente las áreas de las esquinas y la central, en ellas se contaron solamente los

espermatozoides que estaban dentro de cada área y sobre las líneas del lado izquierdo y superior con la cabeza hacia adentro. Se sumó el número de espermatozoides contados en cada cámara y se dividió entre dos para obtener el número promedio. Para el cálculo de la concentración espermática por mililitro de eyaculado se aplicó la fórmula siguiente (23);

$\text{No. de espermatozoides /ml.} = (\text{No. de espermatozoides contados}) (10,000)$

CÁLCULO DE DOSIS

Para calcular el número de dosis por eyaculado se realizó el siguiente procedimiento;

$\text{Eps.}^\circ \text{ vivos por inseminaciones} = 4 \times 10^9$

$\text{No. de Eps. vivos} = (\text{No. Eps./ml}) (\% \text{ de motil}) (\% \text{ de Eps. normales})$

$\text{Volumen de semen por dosis} = \frac{\text{Eps. vivos por inseminación}}{\text{No. de Eps vivos}}$

No. de Eps vivos

$\text{No. de dosis por eyaculado} = \frac{\text{Volumen total del eyaculado}}{\text{Volumen de semen por dosis}}$

Volumen de semen por dosis

$\text{Volumen de diluyente por dosis} = 100\text{ml} - \text{Volumen de semen por dosis}$

• Espermatozoides.

EVALUACIÓN DE LAS MUESTRAS

En el semen recién colectado se valoró, la motilidad de la manera ya descrita, esto en las instalaciones del laboratorio de Reproducción e Inseminación Artificial del C.E.I.E.P.P. Para evaluar la morfología acrosomal se realizaron los frotis en el C.E.I.E.P.P. y fueron

trasladados para su evaluación a los D.P.A.C. y R.I.A. de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M., utilizando los microscopios, óptico a un aumento de 16x y de contraste de fases con un aumento de 40x, se contaron doscientas células espermáticas por laminilla, observando el número de células vivas, células muertas y las células con daño acrosomal.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Para determinar si existe diferencia entre ambas tinciones se aplicaron las pruebas estadísticas de Análisis de variancia y ji cuadrada para comparar. Espermatozooides vivo con acrosoma intacto, vivo con acrosoma libre, vivo con daño acrosomal, vivo sin acrosoma, vivo sin acrosoma ni anillo postacrosomal, muerto con acrosoma intacto, muerto con acrosoma libre, muerto con daño acrosomal, muerto sin acrosoma, muerto sin acrosoma, ni anillo postacrosomal (14).

RESULTADOS

Resultaron igualmente satisfactorias ambas tinciones para evaluar espermatozoides vivos con acrosoma intacto ya que ambas detectan más del 85% de estos (Cuadro 1).

Los resultados al comparar ambas tinciones por medio de la prueba de χ^2 y tomando en cuenta espermatozoides vivo con acrosoma intacto, vivo con acrosoma libre, vivo con daño acrosomal, vivo sin acrosoma, vivo sin acrosoma ni anillo postacrosomal, muerto con acrosoma intacto, muerto con acrosoma libre, muerto con daño acrosomal, muerto sin acrosoma, muerto sin acrosoma ni anillo postacrosomal nos indicaron que es más eficiente la tinción de K-F $\chi^2=0.749$ (Cuadro 2). En una evaluación entre la misma tinción se observó que K-F resulta más eficiente para detectar fallas acrosomales en células vivas $P=0.00$ (Cuadro 4), lo que no ocurre con la tinción de E-N ya que no se presentaron cambios en su eficiencia para detectar fallas acrosomales en células vivas o muertas $P=0.7617$ (Cuadro 5). Para los tipos espermatozoides vivos con acrosoma libre, vivo con daño acrosomal, vivo sin acrosoma, muerto con daño acrosomal y muerto sin acrosoma, se observó que si existía diferencia significativa para la tinción de K-F ($P > 0.01$) (Cuadro 1). Las variables vivo sin acrosoma ni anillo postacrosomal, muerto con acrosoma intacto, muerto con acrosoma libre y muerto sin acrosoma ni anillo postacrosomal, no mostraron diferencias estadísticas significativas entre tinciones ($P > 0.05$) (Cuadro 1). Al evaluar las variables del tipo falla acrosomal entre ambas tinciones, se observó que K-F dio mejores resultados tanto en espermatozoides vivos $P=0.00$ (Cuadro 6), como en espermatozoides muertos $P=0.01$ (Cuadro 7). Se mencionan también el número de células vivas y muertas con acrosoma intacto contadas por tinción (cuadro 3). Cabe

mencionar que todas las muestras trabajadas procedían de especímenes que habían presentado una buena motilidad (Cuadro 8), la cual se mantuvo en promedio dentro del 81.33%.

Cuadro 1: Resultados observados con la prueba de Análisis de varianza al comparar espermatozoides vivos, muertos y con falla acrosomal con las tinciones de E-F y E-N.

VARIABLE	E-F y FOTE		E-N y FOTEN		P(*)
	número	%	número	%	
Vivo con acrosoma intacto	4086	88.78	4103	88.81	0.71
Vivo con acrosoma libre	49	1.02	6	0.12	0.00
Vivo con daño acrosomal	61	1.28	11	0.23	0.00
Vivo sin acrosoma	38	0.79	8	0.16	0.00
vivo sin acrosoma al medio postacrosomal	6	0.12	0	0	0.45
Muerto con acrosoma intacto	400	8.39	305	10.86	0.09
Muerto con acrosoma libre	25	0.52	0	0	0.69
Muerto con daño acrosomal	50	1.04	8	0.16	0.00
Muerto sin acrosoma	21	.46	0	0	0.00
Muerto sin acrosoma al medio postacrosomal	1		0	0	0.32
No clasificados	24	0.54	113	2.57	0.00

(*) = Análisis de varianza.

CUADRO 1: Evaluación de las tensiones de E-F y E-N, espermatocidos vivos intactos, muertos intactos, con daño acrosomal y no clasificados concentrados*.

VARIABLES	BOVLES Y FOOTB				BOSINA-BICHOSIN			
	LAMBACH		LAMB WHITE		LAMBACH		LAMB WHITE	
	NUM.	%	NUM.	%	NUM.	%	NUM.	%
Vivo con acrosoma intacto	1824	38.08	3258	47.04	1853	38.6	2250	46.07
Vivo con acrosoma libre	31	0.64	18	0.37	3	0.06	3	0.06
Vivo con daño acrosomal	53	1.10	47	0.97	6	0.12	5	0.10
Vivo sin acrosoma ni esilio postacrosomal	20	0.41	18	0.37	3	0.06	5	0.10
Muerto con acrosoma intacto	203	4.20	198	4.12	268	5.16	257	5.35
Muerto con acrosoma libre	13	0.27	12	0.25	0	0	0	0
Muerto con daño acrosomal	36	0.75	16	0.33	4	0.08	4	0.083
Muerto sin acrosoma ni esilio postacrosomal	11	0.22	10	0.20	0	0	0	0
no clasificados	5	0.10	19	0.43	84	1.72	39	1.58

* $\chi^2 = 0.749$

Cuadro 3: Comparación entre las tinciones de E-F y E-N en número y porcentaje de espermatozoides vivos y muertos intactos por raza.

VARIABLE	NOVACS Y FOOTB				ROSINA-MEBROSINA			
	LANDRACE		LARGE WHITE		LANDRACE		LARGE WHITE	
	NÚMERO	%	NÚMERO	%	NÚMERO	%	NÚMERO	%
VIVO CON ACROSONA INTACTO*	1824	22.28	2258	27.58	1853	22.63	2250	27.48
MUERTO ACROSONA INTACTO**	202	22.32	198	21.87	248	27.60	257	28.39

Análisis de varianza * P= 0.04 ** P= 0.007

CUADRO 6: Análisis de Resultados por tipo de lesión, entre esponjas vivas y muertas detectadas por tinción (R-F)*

VARIABLE	VIVOS		MUERTOS	
	NÚMERO	%	NÚMERO	%
ACROSCOMA LIBRE	49	25.38	25	25.25
ACROSCOMA DAÑADO	160	81.01	52	52.52
SIN ACROSCOMA	38	19.68	21	21.21
SIN ACROSCOMA NI ANILLO POGACROSCOMAL	6	3.10	1	1.01
TOTAL	193	1000	99	1000

* Análisis de varianza $P=0.00$

CUADRO 5: Análisis de Resultados por tipo de lesión, entre espermatozoides vivos y muertos detectados por tinción (H-M) *

VARIABLE	VIVOS		MUERTOS	
	NÚMERO	%	NÚMERO	%
ACROSOMA LIBRE	6	24	0	0
ACROSOMA DAÑADO	21	66	8	100
SIN ACROSOMA	0	32	0	0
SIN ACROSOMA NI ANILLO POBACROSOVAL	0	0	0	0
TOTAL	27	100%	8	100%

* Análisis de varianza: $P=0.7617$

CUADRO 6: Análisis por tipo de daño acrosomal entre espermatocitos vivos con las tinciones de H-F y H-E.

VARIABLE	KOVACS Y FOOTB		BOGIMA-NIGROSINA	
	NUMERO	%	NUMERO	%
ACROSOMA LIBRE	49	25.38	6	1.24
ACROSOMA DAÑADO	100	51.81	11	.229
SIN ACROSOMA	38	19.68	8	.165
SIN ACROSOMA NI ANILLO POSACROSOMAL	6	3.10	0	0
TOTAL	193	1000	25	1000

Análisis de varianza * P= 0.37 **P= 0.00

Cuadro 7: Análisis por tipo de daño acrosomal entre espermatozoides muertos con las tinciones de R-F y S-W.

VARIABLE	KOVACH Y FOOTE		MOSINA-MIGROSINA	
	NÚMERO	%	NÚMERO	%
ACROSOMA LIBRE	25	25.25	0	0
ACROSOMA DAÑADO	52	52.52	8	100
SIN ACROSOMA	21	21.21	0	0
SIN ACROSOMA NI ANILLO POSACROSOMAL	1	1.01	0	0
TOTAL	99	100%	8	100%

Análisis de varianzas * P= 0.00 **P= 0.01

CURSO 8: PORCENTAJE DE NOTILIDAD.

NÚMERO DE LAMINILLA												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NOTIL.	85	80	80	85	80	85	85	80	80	85	85	85
h												

NÚMERO DE LAMINILLA												
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
NOTIL.	85	85	85	80	80	80	85	85	80	85	90	85
h												

NOTILIDAD PROM. = 83.33%

Almacenamiento

El proceso de obtención, procesamiento y en su caso tiempo de almacenaje, del semen diluido de cerdo para I.A., tienen un efecto significativo sobre el número y la morfología de espermatozoides que se presentaran con acrosoma normal, del mismo modo sobre la motilidad progresiva, esto debido a que las células sufren daños irreversibles en su morfología acrosomal y motilidad durante su procesamiento en el laboratorio. En el semen almacenado, se presentan cambios en las proteínas básicas del plasma seminal, que incrementan la permeabilidad de la membrana espermática permitiendo la salida de proteínas, cationes celulares y enzimas citoplasmáticas, que son indispensables para apoyar el proceso de capacitación o maduración espermática, necesarias para que el espermatozoide logre fecundar el óvulo (11,23,27).

Aunque el uso de E-N se encuentra muy difundido se observó que la determinación del acrosoma es difícil, esto debido a que algunas veces los espermatozoides se presentan solo parcialmente teñidos y en otros casos el contraste que les provee la tinción es alto. Lo cual coincide con estudios realizados por Bamba (4), Tamuli and Watson(48). La tinción de K-F proporciona una mejor tinción, lo que facilita la observación y clasificación de los espermatozoides y su acrosoma.

Algunos investigadores adicionaron a la prueba de E-N el colorante de Giemsa, lo cual parece dar resultados favorables al observar el acrosoma, sin embargo este debe estar dañado en alto grado, lo que no ocurre con la tinción de K-F que ofrece una mejor resolución del acrosoma (48).

Al comparar las variables vivos con acrosoma intacto observados en el (Cuadro 1) trabajados con la tinción K-F observamos que son similares a los reportados por Vásquez (1980) (51), pero difieren en espermatozoides muertos con acrosoma intacto.

El porcentaje de espermatozoides con algún tipo de daño acrosomal detectados con E-M no muestra diferencia significativa del reportado por Zamba (1980) (4), y coincide de igual manera en cuanto a la variable de espermatozoides vivos con acrosoma intacto reportados por este autor.

El porcentaje de espermatozoides vivos con acrosoma intacto reportados por la tinción de E-M (>65%) coinciden con los reportados por Tamuli y Watson (1984) (48). Del mismo modo similares resultados son reportados al utilizar la tinción de E-M + Giemsa reportados por los mismos autores, los cuales coinciden en señalar la poca confiabilidad de estas dos técnicas para determinar problemas en el acrosoma.

CONCLUSIONES:

Observando los resultados obtenidos se puede concluir:

1.- Ambas tinciones son eficientes al evaluar espermatozoides vivos con acrosoma intacto y muertos con acrosoma intacto en semen de animales normales.

2.- Al observar espermatozoides con algún tipo de lesión en el acrosoma se tiene que la tinción de K-F permite observar una mayor cantidad de estos, no así la tinción de E-M la cual presenta dificultades para detectar lesiones en el acrosoma de los espermatozoides.

3.- Los cuatro animales utilizados en este trabajo, fueron animales sanos que están siendo utilizados por el C.E.I.E.F.P. como sementales para reproducción con parámetros espermáticos normales. Por lo cual concluimos que serviría aplicar un evaluación de las presentes tinciones en animales que presentaran un historial de problemas en la morfología de sus espermatozoides y confrontarlos con los resultados obtenidos de animales considerados con morfología del espermatozoide normal.

Por lo cual se puede recomendar que es necesario implementar la tinción de K-F en los laboratorios de evaluación seminal, para con ello poder detectar sementales que presenten anomalías acrosomales y poder determinar la causa probable que este produciendo dicha alteración y de ser posible mejorar las condiciones medioambientales y sanitarias que lo provocan. En caso de no ser así, desechar a los sementales que en algún caso extremo puedan llegar a ser causantes de la baja en la productividad de la granja. Todo con la finalidad de poder mejorar la productividad individual y global de la granja.

LITERATURA CITADA

1. -Anibers, J.G., Johnson, L.A., Rademaker, S.M.W. and Grooten, M.J.G.: Use of boar spermatozoa for A.I.: Fertility and morphology of semen diluted in BTS and used for insemination within 24h o 28h after collection. Pig News Inf. 8, 174 (1985).
2. -Améaga, C.G.: Evaluación del daño acrosomal en espermatozoides de semen de cerdo almacenado en BTS. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1987).
3. -Austin, C.R.: Advances in the Biosciences. Esape G. ad Pergamon, New York. (1969).
4. -Bamba, K: Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. Theriogenology 28, 1248-1251 (1988).
5. -Bamba, K and Cran, D.G.: Effect of rapid warming of boar semen on sperm morphology and physiology. J. Reprod. Fert. 25, 133-138 (1985).
6. -Barros, C., Bedford, J.M., Franklin, L.E. and Asturin, C.R.: Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. J. Cell. Biol. 24 1-5 (1967)
7. -Bedford, J.M.: Sperm capacitation and fertilisation in mammals. Biol. Rep. Suppl. 2 126-150 (1970)
8. -Bryan, J.H.D. and Akruk, S.R.: A naphtol yellow S and erythrosin B staining procedure for use in studies of acrosome reaction of rabbit spermatozoa. Stain Tech. 52, 47-51 (1977)
9. -Duxadé, C.C.: El verraco: producción y manejo, En: Ganado porcino. 119-148 Mundi-Premsa, Madrid, España (1984).
10. -Campbell, R.C., Dolt, H.M. and Glover, T.D.: Nigrosin-eosin as a differential stain for spermatozoa. J. Agric. Sci. 48 1-9 (1956).

- 11.-Castañeda M.J.: Efecto de la adición de la progesterona al semen de verraco antes y después de la congelación sobre la fertilidad morfología y motilidad de los espermatozoides. Tesis de maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (1986)
- 12.-Centro Nacional de Estudios Municipales, S.G.: Enciclopedia de los Municipios del Estado de México, Secretaría de Gobernación, Gobierno del Estado, 18,238-242 (1988)
- 13.-Chang, M.C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature, 168, 697-698 (1951).
- 14.-Daniel, W.W.: Biostatística: Base para el análisis de las ciencias de la Salud. Líman, México, D.F., (1984)
- 15.-De Alba, J.: Reproducción animal. En: Inseminación Artificial. Editado por De Alba, J., 239-260 Revista Médica Mexicana, México, D.F. 1985.
- 16.-Derivaux, J.: Dilución y conservación del esperma fresco. En: Reproducción de los animales Domésticos. Editado por Derivaux, J. 184-220, Agrícola, Zaragoza, España, (1976).
- 17.-Didion, B.A., Dourinsky, J.R., Giles, J.R. and Graves, C.H.: Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. Geneta. Res. 22, 51-57 (1990).
- 18.-Dukes, H.H. y Sweeney, H.J.: Fisiología de los animales domésticos, 4ta. Edic., Ediciones Aguilar, S.A., Madrid, España, (1978)
- 19.-Escamilla, V.A.: Revisión de la literatura sobre inseminación artificial del porcino. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1978).
- 20.-Falcón, E.J.C.: Evaluación de la motilidad y daño acrosomal de espermatozoides de cerdo diluidos en BTS utilizando gentamicina y

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- neomicina como antibióticos, almacenados durante tres días. Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 1992.
- 21.-Flores, M.J.A.: Ganado Porcino, Limusa, 12a. Edic., México, D.F. (1986)
 - 22.-Franklin, L.E., Barros, C. and Fusell, E.N.: The acrosomal region and acrosome reaction in sperm of the golden hamster. Biol. Rep. 1 180-200 (1970)
 - 23.-Mátes, E.S.E.: Reproducción e Inseminación artificial en animales 5ª edición, INTERAMERICANA, México D.F. (1969).
 - 24.-Mancock, J.L. : The morphology of boar sperm. J. Roy. Micr. Soc. 76, 86 (1957)
 - 25.-Hunter, R.N.F.: Male, semen production and animal insemination. In: Reproduction of farm animals Edited by, Hunter R.N.F; 26-53. LONGMAN, London, (1982).
 - 26.-Murtgen, J.P.: Reproductive Examination of the boar. J.Soc. Theriogen. XIII, 1984
 - 27.-Murtgen, J.P., Larssen, R. and Crabo, B.: Factors affecting the semen quality in the boar, Proceedings of the 9th. International Congress on Animal Reproduction an artificial Insemination, Madrid Spain, 271-287, Madrid Spain, 1980
 - 28.-König, I: Inseminación de la cerda : Acríbia, Zaragoza, España (1979)
 - 29.-Kovács, A. and Foote, R.H.: Viability and Acrosome Staining of Bull, Boar and Rabbit Spermatozoa. Biotec. and Histochem. 6, 119-126 (1992)
 - 30.-Kusunoki, N., Sakau, M., Kato, S. and Kanda, S.: Induction of the acrosome reaction in ejaculated goat spermatozoa by preincubation in chemically defined medium. J. Exp. Zool. 249 322-328 (1989).
 - 31.-López, M.N.A.: Producción de porcinos, Albatros, Buenos Aires, Argentina, (1990)

- 32.-Mc Donald, L.F.: Reproducción y endocrinología veterinarias. Interamericanas, México D.F. (1981).
- 33.-Melrose, D.R.: a review of progress and of possible developments in the artificial insemination of pigs, Vet. Rec., **78**, 159-167 (1966)
- 34.-Metsel, S.: The mammalian sperm acrosome reaction: A biochemical approach. Johnson, M.H. Development in mammals. North Holland Pub. Amsterdam. The Netherlands. (1978).
- 35.-Malbador, A.V.: Fisiología de la reproducción. Acribia, Zaragoza, España (1969).
- 36.-Oettlé, F.F.: Using a new acrosome stain to evaluate sperm morphology. Food-animal Practica, 263-266 (1986).
- 37.-Pérez, P.F.: Reproducción animal: Inseminación artificial y transplante de embriones. Científico-Médica, Barcelona, España, 1985.
- 38.-Pursel, V.G. and Johnson, L.A.: Gluteraldehyde Fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology **1**, 63-68 (1974).
- 39.-Pursel, V.G. Johnson, L.A., and Shulman, L.L.: Acrosome Morphology of Boar spermatozoa during "in vitro" aging, J. Anim. Sci. **38**, 113-116 (1974).
- 40.-Pursel, V.G., Johnson, L.A. and Rampacek, G.B.: Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock, J. Anim. Sci. **34**:278-283 (1972).
- 41.-Revell, S.G. and Chasey, D.: Morphological defects of the acrosome in boar spermatozoa, Vet. Sci. **45**, 149-151 (1968).
- 42.-Rillo S.M: Reproducción e Inseminación Artificial porcina. Aedon, Barcelona, España, 1982.
- 43.-Rillo, S.M., Vázquez, I. y Alias, E.: Recuperación de la motilidad espermática y su relación con acrosomías en el semen de verraco conservado y congelado. Proceedings of the 9th. International Congress

- on Animal Reproduction and Artificial Insemination. Madrid Spain, 1980, 403
- 44.-Saake, R.G.: Semen Quality in relation to sperm preservation. J.Dairy Sci. **66**: 2635-2646 (1983).
- 45.-Sorensen, A.M.Jr: Reproducción animal; Principios y Prácticas. Mc. Graw Hill México D.F. (1982).
- 46.-Talbot, P and Chacon, R.S.: A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J. Exp. Zool. **211**, 201-208 (1981).
- 47.-Talbot, P. and Chacon, R.S.: Observation on the acrosome reaction of human sperm "in vitro", Am. J. Primatol. **1**, 211-219 (1981).
- 48.-Tamuli, M.k. and Matson, P.F.: Use of a simple staining technique to distinguish acrosomal changes in the live sperm sub-population. Anim. Rep. Sci. **15**, 267-284 (1994).
- 49.-Tinoco, J.J.L.: Motilidad y daño acrosomal en espermatozoides de cerdo almacenados en diluentes B.B. y BTS durante 7 días. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1989).
- 50.-Tisot, G., Duque, D. and Cárdenas, A.: An eosin-nigrosin technique for the determination of acrosome reaction in live spermatozoa. Rev. Cubana de Ciencias Vet. **22** 73-83 (1991).
- 51.-Vásquez, I.: Valoración de los acrosomas normales en células espermáticas de verraco. Zoot. **28** 507-512 (1980).
- 52.-Vásquez, S.M., Martínez, J.E., Roca, J., Coy, P. and Ruiz, S.: Use of triple stain technique for simultaneous assessment of vitality and acrosomal status in boar spermatozoa. Theriogenology. **38**, 843-852 (1992).

- 13.-Vengust, M., Illers, M.J., Senegacnik, J., Petac, D. and Bester, M.: Relation between some boar semen characters and adaptability to liquid storage and freezing. Big Game Inf. 1 (4) 489 (1964).
- 14.-Suchermann, A.F.A.: Capacitación de espermatozoides y Fertilización "in vitro" de gametos de bovino Tesis de Licenciatura Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1960).