

01674  
6



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DE SEMEN DE VERRACOS  
INOCULADOS CON EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD  
DEL OJO AZUL

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL  
P R E S E N T A :  
SUSANA ESPINOSA HERNÁNDEZ

297027

TUTOR: HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA

COMITÉ TUTORAL: PABLO CORREA GIRÓN

ABEL CIPRIÁN CARRASCO

COLABORADOR ESPECIAL: JESÚS HERNÁNDEZ LÓPEZ



MÉXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## DEDICATORIA

Este trabajo de investigación lo dedico con mucho amor:

A mis padres

Susana Hernández Puente  
Fernando Espinosa Yáñez

A Cuauhtémoc Nava Cuéllar

A mis amigos y

A Tito, Chato, Grucho, Cuco, Max, Chico, Rufina, Quique, Beto y Kika

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podía haberse realizado sin el apoyo de muchos amigos y compañeros:

A mis padres gracias por estar conmigo en todo momento y por su cariño.

A Cuauhtémoc gracias por tu apoyo incondicional que me ofreciste durante todos los momentos difíciles que se me presentaron en esta etapa de mi vida, por soportar mi mal humor y lo más importante gracias por tu ternura y amor.

Adriana te agradezco el apoyo que siempre me has brindado sobre todo gracias por ser mi amigocha.

Martha gracias por el ánimo que me dabas durante todo este trabajo.

Rubén, Roger, Paco y Male gracias por los momentos gratos que me ofrecieron en su momento.

Lucy y Mafer aunque no las tengo cerca gracias por su amistad.

Dr. Roberto Martínez gracias por su amistad y por creer en mí.

Dr. Marco Herradora gracias por su amistad y por sus consejos oportunos.

Dr. Mario Haro gracias por compartir conmigo charlas gratas acerca del cine y sobre todo por su amistad.

Gerardo Ramírez gracias por tu amistad.

Alejandra Mercadillo gracias por apoyarme y por tu amistad.

A mis compañeros de trabajo del Departamento de Producción Animal: Cerdos (FMVZ - UNAM): Dra. Ma. Elena Trujillo, Pedro Pradal, Dr. Jorge López, Germán Borbolla, Dra. Esperanza Galván, Dra. Carmen Mercado, Roxana Mendoza, Dra. Concepción Díaz, Dra. Rosalba Carreón; agradezco sus experiencias, consejos, regañíos y alegrías que me dieron en momentos difíciles de mi vida.

Mario Solís gracias por tu apoyo en mi trabajo experimental y por tu amistad.

Gracias a Tito, Chato, Grucho, Cuco, Max, Chico y Kika por permitirme trabajar con ellos y lograr este trabajo, gracias por los momentos chuscos que me regalaron.

A todo el equipo de trabajo de la Unidad de Constatación de la FMVZ-UNAM por su apoyo recibido durante y después del conflicto que se presentó en la UNAM.

A todos los miembros del Departamento de Bioquímica del INER por permitirme trabajar con ellos y en sus instalaciones.

Gracias a todos los estudiantes que me apoyaron en el cuidado de mis animales durante la fase experimental de mi trabajo.

Química Ma. de la Luz gracias por permitirme trabajar con usted y por la amistad que me ha brindado.

Jesús gracias por tu valiosa colaboración en este trabajo y por confiar en mí para realizar este proyecto.

Héctor gracias por tu tiempo que me regalaste para realizar la parte estadística de mi trabajo.

Dr. Humberto gracias por el trabajo que realizó conmigo y por su amistad.

Dr. Pablo Correa, Dr. Abel Ciprián y Dr. Morilla les agradezco el tiempo que dedicaron a la revisión de este trabajo y sus comentarios para mejorarlo.

Dr. Edgar Zenteno le agradezco la revisión de mi trabajo y sus sugerencias para mejorarlo, pero sobretodo gracias por sus charlas constructivas para mi vida profesional.

Pido disculpas a todas aquéllas personas que se escaparon de mi mente al momento de realizar este escrito, pero quiero que recuerden que siempre estarán en mi corazón.

**¡Gracias!**

## COLABORADORES

Este proyecto se realizó gracias a la valiosa colaboración de las siguientes personas:

*Dr. Jesús Hernández López.* Por guiarme en el desarrollo de las diferentes técnicas que se utilizaron en este trabajo y darme las herramientas para llevarlas a cabo.

*QFB. Ma. de la Luz Rosales Montaña.* Por sus conocimientos y habilidades que me compartió para llevar a cabo la parte de mi proyecto que correspondió a la microscopía electrónica.

*Dr. Héctor Castillo.* Por su gran apoyo recibido en la parte estadística del trabajo.

## **RECONOCIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Este proyecto de investigación se realizó en las siguientes instituciones:

Departamento de Producción Animal: Cerdos. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, D.F.

Unidad de Constatación. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, D.F.

Departamento de Investigación en Bioquímica. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Secretaría de Salud. Tlalpan, D.F.

Unidad de Microscopía Electrónica. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, D.F.

Este proyecto contó con el apoyo parcial de:

Proyecto DGAPA-UNAM IN 224598.

Proyecto CONACYT 27609 M.

La autora de este trabajo fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.



## ÍNDICE

TEMAS	PÁGINAS
<b><u>Resumen</u></b>	1
<b><u>Abstract</u></b>	2
<b><u>Introducción</u></b>	3
<b>Antecedentes</b>	3
Etiología	3
Estructural viral	5
Especies susceptibles	7
Signos clínicos	8
Lesiones	9
Interacción virus – célula	10
Virus que se diseminan por el semen	13
<b>Fisiología y endocrinología del semental</b>	17
Desarrollo testicular	17
Espermatogénesis	17
Regulación hormonal	19
El espermatozoide	21
Maduración espermática	22
Anormalidades espermáticas	26
<b><u>Objetivo general</u></b>	30
<b><u>Objetivos específicos</u></b>	30
<b><u>Hipótesis</u></b>	30
<b><u>Justificación</u></b>	30
<b><u>Material y Métodos</u></b>	31
<b>Caracterización del virus</b>	31
-Efecto citopático	31
-Hemaglutinación	32
-Hemadsorción	32

-Inmunofluorescencia	32
-Purificación viral	33
<b>Sementales</b>	33
-Entrenamiento	34
-Colección del semen	34
<b>Infección experimental de los sementales</b>	35
a) Signos clínicos	35
b) Medición de las dimensiones testiculares	35
c) Espermatobioscopías	35
d) Serología	37
e) Citometría de Flujo	37
-Viabilidad espermática	37
-Detección del virus en los espermatozoides	37
-Detección de receptores para el virus	38
f) Microscopía electrónica	39
g) Necropsia	40
h) Histopatología	40
Modelo estadístico	40
<b><u>Resultados</u></b>	42
<b>Caracterización del virus</b>	42
-Efecto citopático	42
-Hemaglutinación	42
-Hemadsorción	42
-Inmunofluorescencia	43
-Purificación viral	43
<b>Sementales</b>	43
Signos clínicos	43
Medición de las dimensiones testiculares	43
Espermatobioscopías	51
Serología	58

Citometría de Flujo	59
-Viabilidad espermática	59
-Detección del virus en los espermatozoides	64
-Detección de receptores para el virus	64
Microscopía electrónica	65
Necropsia	67
Histopatología	68
<b><u>Discusión</u></b>	76
<b><u>Conclusiones</u></b>	88
<b><u>Figuras</u></b>	90
<b><u>Referencias</u></b>	114

## RESUMEN

La Enfermedad del Ojo Azul en los cerdos es ocasionada por el *rubulavirus porcino* (RVP). Este virus provoca en los sementales orquitis, atrofia testicular y epididimitis. El objetivo del trabajo fue determinar el tiempo de excreción del virus en semen y evaluar la calidad del mismo. Cinco sementales Yorkshire-Landrace de nueve meses de edad se entrenaron para la obtención del semen. Los animales se inocularon por vía intranasal utilizando un volumen de 5 ml con un título de  $1 \times 10^7$  DICC<sub>50</sub>/ml. Antes y después de la inoculación se evaluaron: signos clínicos, dimensiones testiculares, espermotobioscopías, detección de anticuerpos, excreción del virus, daño acrosomal en los espermatozoides por citometría de flujo y la ultraestructura de los espermatozoides por microscopía electrónica. Los resultados indican que el virus provoca alteraciones a nivel testicular y del epidídimo manifestándose un aumento de tamaño de ambos órganos a partir del día 11 y 12 postinoculación, respectivamente. En la histopatología se mostraron procesos inflamatorios y degenerativos en los testículos y epidídimos de los cinco sementales. En las características macroscópicas y microscópicas del semen se presentaron cambios; en uno de los cinco sementales se observó en cinco de sus eyaculados la presencia de sangre después del día 21 postinoculación. En las características de motilidad y concentración espermática se obtuvieron diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) al comparar los hechos antes y después de la inoculación. A partir del día 25 postinfección se identificaron anomalías espermáticas primarias (10.87%) y las anomalías secundarias aumentaron del 13.31% al 51.62%. Ambos tipos de anomalías también mostraron diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ). Se detectó la presencia de anticuerpos a partir del día nueve postinfección por inhibición de la hemaglutinación y se mantuvieron altos después del día 16. Por citometría de flujo se detectó el virus en los espermatozoides utilizando anticuerpos específicos para el RVP a partir del día nueve postinfección hasta el día 39. Con la utilización de yoduro de propidio se evaluó la viabilidad espermática observando un aumento del 20.68% de espermatozoides muertos después del día 25 postinfección. Con la utilización de la lectina de cacahuete (PNA) se permitió determinar el daño acrosomal, esta variable mostró diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) a partir del día 32 postinfección. Durante toda la fase experimental se detectaron receptores (sialilalfa 2,3 lactosa) para el virus en los espermatozoides. A través de la microscopía electrónica se detectaron alteraciones en la ultraestructura de los espermatozoides después del día 30 postinfección.

Palabras claves: rubulavirus porcino, verracos, espermatozoides, acrosoma, lectinas.

## ABSTRACT

The Blue Eye Disease in swine is occasioned by *porcine rubulavirus* (RVP). This virus produces orchitis, testicular atrophy and epididymitis in boars. The objective of the paper was to determinate the time of excretion of the virus in semen and to evaluate its quality. Five Yorkshire-Landrace boars of nine months of age were trained for the obtaining of semen. The animals were inoculated by intranasal, using a volume of 5 ml with a titer of  $1 \times 10^7$  DICC<sub>50</sub>/ml. Before and after the inoculation, clinical signs, testicular dimensions, spermatobioscopy, antibodies detection, virus excretion, acrosomal harm in spermatozoids by cytometric flow and ultrastructure of spermatozoids by electronic microscopy were evaluated. The results indicates that the virus produces alterations at testicular and epididymal level, presented as an increase in the size of both organs since day 11 and 12 post-inoculation, respectively. In the histopathology were showed inflammatory and degenerative processes in the testicles and epididymis of the five boars. Changes were presented in the macroscopic and microscopic characteristics of semen. In one of the five boars were observed in five of its ejaculations the presence of blood after 21 days post-inoculation. In the motility characteristics and spermatic concentration were found high significant differences ( $p < 0.0001$ ) when comparing the events before and after the inoculation. Since day 25 post-inoculation were identified primary spermatic abnormalities (10.87%) and the secondary abnormalities increased from 13.31% to 51.62%. Both types of abnormalities also showed high significant differences ( $p < 0.0001$ ). The antibodies presence was detected since day 9 post-infection by hemagglutination inhibition and maintains high after day 16. By citometric flow was detected the virus in the spermatozoids, using specific antibodies for the RVP since day 9 post-infection to day 39. With the use of propide iodide was evaluated the spermatic viability, observing an increase of 20.68% of death spermatozoids after day 25 post-infection. With the use of peanut lectin (PNA), the acrosomal harm was determinated. This variable showed a high significant difference ( $p < 0.0001$ ) since day 32 post-infection. During all the experimental phase, receptors were detected (sialilalpha<sub>2,3</sub>galactose) for the virus in the spermatozoids. By electronic microscopy, alterations were detected in the ultrastructure of spermatozoids after day 30 post-infection.

Keywords: porcine rubulavirus, boars, spermatozoids, acrosom, lectins.

## **INTRODUCCIÓN**

La identificación de la enfermedad del ojo azul (EOA) se realizó en La Piedad, Michoacán en 1980, cuando se registraron brotes de meningoencefalitis en cerdos recién nacidos y lechones menores de 20 días de edad, en los que se presentó una opacidad corneal característica que tornaba azul turquesa el color de los ojos (1). Esta enfermedad ha tenido un significado importante para la porcicultura mexicana ya que causa mortalidad en los lechones y altera los parámetros reproductivos en las granjas (2).

La enfermedad ha sido diagnosticada únicamente en México; ha sido detectada anteriormente en 23 estados de la República, principalmente de casos presentados para diagnóstico y/o mediante diferentes encuestas serológicas parciales (3). La zona más afectada es el centro del país, esta última comprende los estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato. Además se ha diagnosticado en los estados de México, Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Nuevo León, Tabasco, Tamaulipas, Colima, Veracruz, Morelos, Campeche, Quintana Roo y Sonora (4). En Yucatán se tomaron muestras serológicas de cerdos sacrificados en el rastro, procedentes del centro del país, varias de estas muestras resultaron positivas a través de la técnica de la inhibición de la hemaglutinación (5). Aunque la enfermedad es autolimitante (en granjas cerradas y con manejo adecuado), hay gran cantidad de granjas en que se presenta de manera continua (6).

### **Antecedentes**

#### **Etiología**

Stephano *et al.* aislaron, a partir de lechones con opacidad corneal y problemas neurológicos, un virus con actividad hemaglutinante que presentó morfología similar a los paramixovirus (1). Al cual llamaron virus del síndrome del ojo azul (VSOA) o paramixovirus del ojo azul (POA). Este virus reprodujo las lesiones características en cerdos menores de un mes de edad infectados en forma experimental (7). Posteriormente, Moreno-López *et al.* aislaron otro virus, a partir del cerebro de un lechón con meningoencefalitis, al que llamaron virus de La Piedad Michoacán (LPM). Se determinaron

sus características fisicoquímicas, biológicas y estructurales, además de analizar su similitud antigénica con otros paramixovirus, demostrando que no presentaba reacciones cruzadas con el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y Parainfluenza 3 (PI-3) bovino, por lo que propusieron que se trataba de un nuevo paramixovirus (8).

Inicialmente se identificó que solamente los lechones menores de un mes eran susceptibles a la infección experimental con estos aislamientos, provocando los signos característicos de la enfermedad naturalmente adquirida (7, 8). En México se han aislado diversos paramixovirus asociados con diferentes brotes de la enfermedad del ojo azul de los cerdos; entre ellos el virus PAC3 (Jalisco/1992), el cual al ser inoculado experimentalmente, reprodujo las lesiones neurológicas en lactantes y el daño a nivel del aparato reproductor en cerdos adultos (9).

Con base en los datos acumulados, el virus de la EOA se ha clasificado como un nuevo miembro de la familia Paramyxoviridae.

El virus se puede replicar en embrión de pollo y en las siguientes líneas celulares: PK-15 (riñón de cerdo), ST (testículos de cerdo), VERO (riñón de mono verde africano), riñón de gato, embrión de bovino, BHK (riñón de hámster lactante) y dermis equina, así como en cultivos primarios de riñón de cerdo y de tiroides de bovino. En todas estas células causa cambios citopáticos (10). Otros autores han encontrado que también causa efecto citopático en: células de plexo coroideo porcino, cornete de cerdo, BT (cornete de bovino), MDBK (riñón de bovino), testículo de bovino, plexo coroideo de bovino, células GMK de origen primate y en pulmón de visón. Se han observado cuerpos de inclusión citoplásmicos en la línea celular PK-15 (8).

El virus puede multiplicarse en líneas celulares homólogas y heterólogas. El título no se ve afectado si estas células son de alto o bajo pasaje (11).

La hemaglutinación se ha presentado con eritrocitos de ave, cobayo, ratón, rata, conejo, hámster, caballo, cerdo, cabra, gato y perro. Este fenómeno también se ha presentado con eritrocitos de humanos de los grupos (A, AB, B y O). La elución se presenta a los 30-60 minutos a 37°C. La hemadsorción se ha hecho con eritrocitos de ave en células PK-15 (10, 12, 13).

En una investigación se realizaron hemaglutinaciones en donde se confrontó al virus con eritrocitos de diferentes especies (bovino, equino, ave, conejo, humano tipo B, perro y cobayo). Las conclusiones a las que se llegaron para realizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación fueron las siguientes: usar eritrocitos de bovino al 0.5% con 8 UHA de virus proveniente de cultivos celulares y la prueba debe llevarse a cabo a una temperatura no superior a los 25°C (14).

### **Estructura viral**

El virus posee actividad hemaglutinante, hemolítica, de neuraminidasa y formadora de sincicios en cultivos celulares. Al microscopio electrónico se observan viriones pleomórficos, la mayoría de ellos circulares, que miden de 180 a 300 nm y están formados por una nucleocápside helicoidal protegida por una envoltura lipoproteica que presenta prolongaciones de 8-12nm (8).

El virus se inactiva con éter, cloroformo, formalina y beta propiolactona. La formalina inactiva su multiplicación así como sus propiedades hemaglutinantes, también se inactiva a 56°C después de un periodo de 4 h (12).

El virus posee un genoma de ácido ribonucleico (ARN) de sentido negativo, de una sola hebra no segmentada, formada por 15,062 nucleótidos, la cual actúa como molde para la síntesis del ARN mensajero y está dividida en 6 genes que codifican las diferentes proteínas estructurales y no estructurales. El orden del genoma del virus es 3' NP-P-M-F-HN-L 5' (15), esta secuencia es similar en todos los miembros de la subfamilia Paramyxoviridae (16).

El virión del paramixovirus porcino está constituido por seis proteínas: la hemaglutinina-neuraminidasa (HN), proteína de fusión (F), fosfoproteína (P), nucleoproteína (NP), una proteína de matriz (M) y una proteína de alto peso molecular (L) (17).

Las proteínas L, NP y P junto con el ARN viral, forman la nucleocápside de los paramixovirus. La proteína P forma un complejo con la proteína L en la replicación de ARN viral. Al parecer la proteína NP sólo posee función estructural (18).

La proteína M de los paramixovirus se encuentra en la parte interna de la envoltura viral, la función principal consiste en organizar a la nucleocápside en las zonas de la membrana



celular donde abundan las glicoproteínas virales, también se le implica en la regulación de la síntesis del ARN (19).

La proteína M del virus de la enfermedad del ojo azul es rica en aminoácidos básicos, lo que confiere una carga neta positiva que puede ser importante en su interacción con otros componentes virales y celulares durante el ensamblaje del virión (20).

La proteína HN de los paramixovirus forma parte de la envoltura viral y se ha implicado en el reconocimiento y enlace con gran afinidad a estructuras celulares que contienen ácido siálico. La proteína HN forma dímeros y tetrámeros unidos por puentes disulfuro, estos últimos se observan como proyecciones en la superficie del virión. El análisis de las secuencias nucleotídicas ha demostrado que la proteína HN se encuentra en la mayoría de los diferentes paramixovirus (19, 21). El género *Morbillivirus* solo tiene la proteína H y el género *Pneumovirus* tiene una proteína homóloga a la HN denominada G (22). La proteína HN presenta también un dominio con capacidad para eliminar los residuos de ácido siálico (neuraminidasa) de receptores celulares, al parecer la eliminación de estos residuos permite un mayor acercamiento con estructuras celulares que actúan como receptores secundarios (23).

La glicoproteína F de los paramixovirus participa en la fusión de la membrana celular y la envoltura viral, lo que permite que el virus se introduzca al citoplasma durante la fase de penetración y que se difunda de célula a célula sin exponerse al medio externo, esto último da origen a la formación de células gigantes multinucleadas llamadas sincitios, en tejidos y cultivos celulares infectados por paramixovirus (24).

La proteína P del virus de la EOA está involucrada en la replicación viral, sufre un proceso postranscripcional similar al ocurrido con el virus de la parotiditis humana (20).

Recientemente el virus de la EOA sea clasificado junto con el virus SV5, parotiditis humana, PI-2 y PI-4 como un nuevo género de esta familia, llamado Rubulavirus.

La nueva clasificación es la siguiente: orden Mononegavirales, familia Paramyxoviridae, subfamilia Paramyxoviridae, género Rubulavirus, especie rubulavirus porcino (RVP) (25).

### **Especies susceptibles**

La única especie donde se ha confirmado la enfermedad natural es el cerdo (26).

Al infectar de forma experimental ratones adultos con el virus LPM por vía intracerebral, se observó temblor y excitación. La muerte ocurrió entre los tres y cinco días después de la inoculación. El virus LPM se pudo aislar nuevamente de cerebro, pulmón, hígado y bazo. Cuando se inocularon macerados de estos encéfalos en células PK-15, el virus resultó ser altamente letal para ratones y para cerdos muy jóvenes. El agente infeccioso tuvo tropismo hacia el sistema nervioso central y el tracto respiratorio (8, 27).

El conejo es resistente a la infección intramuscular y no presenta signos de la enfermedad; sin embargo hay desarrollo de anticuerpos (26).

Se realizó un estudio en donde se utilizaron siete perros localizados en tres diferentes granjas porcinas en las que previamente se diagnosticó el virus de la EOA. A los siete cánidos se les dio de comer carne de cerdo de animales que murieron con signos de la EOA. Se observó que los perros permanecieron sin signos durante un periodo de 30 días y en ninguno se detectó la presencia de anticuerpos contra la EOA. Los autores concluyeron que la EOA no afecta clínicamente a los perros y que la ausencia de anticuerpos indica que el virus no se replica en ellos (28).

En otra investigación, se inocularon tres pécaris de collar adultos, por la vía intranasal, con el virus de la EOA. Se detectaron anticuerpos en los animales a partir del día 14 de infección. Durante los dos primeros días de infección, los animales mostraron apatía y abundante secreción nasal. A partir de hisopos nasales se pudo detectar la presencia del virus por inmunofluorescencia en los días 14 y 30 de infección. No se observaron otros signos relevantes y se concluyó que los pécaris tuvieron una infección subclínica (29).

Ratas Wistar, fueron inoculadas vía intramuscular con el virus de la EOA. Se detectaron anticuerpos a partir del décimo día de infección. De macerados de encéfalo, pulmón y tonsila se pudo recuperar el virus hasta el día 35 de infección, sin embargo, la rata no manifestó signos clínicos, ni tampoco se observaron lesiones histopatológicas (30).

La población felina tiene amplia distribución en las granjas porcinas para el control de roedores. Al inocular vía oronasal a un grupo de 15 gatos, se les pudieron detectar anticuerpos a partir del día 14. En el día del sacrificio (día 21 de infección) no se pudo

aislar al virus, ni detectarlo por inmunofluorescencia en encéfalo, pulmón y tonsila, tampoco tuvieron lesiones a la histopatología ni mostraron signos clínicos de la enfermedad (31).

### **Signos clínicos**

Los signos clínicos son variables dependiendo principalmente de la edad de los animales afectados.

Los lechones de 2 a 15 días de edad son los más susceptibles, los signos clínicos se presentan súbitamente, los animales se observan postrados, deprimidos y con signos nerviosos. Los primeros signos son: fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado, constipación y en ocasiones diarreas. Posteriormente los animales presentan signos nerviosos progresivos como incoordinación, hipersensibilidad, debilidad, rigidez, temblores musculares, posturas y marchas anormales. Más tarde hay postración, letargia, con algunos movimientos involuntarios, mirada perdida, pupila dilatada, ceguera y en ocasiones nistagmo. La muerte se presenta entre las 30 y 48 horas después de la postración. En algunos casos el curso es de 48 horas, pero lo más frecuente es de tres a cinco días. Simultáneamente, algunos animales presentan conjuntivitis, ojos hinchados, lagrimeo, párpados pegados y en 1 al 10% de los afectados hay opacidad de córnea uni o bilateral. Con frecuencia sólo se observa la opacidad corneal sin signos nerviosos en lechones (26, 32).

Cerdos mayores de 30 días. Los signos nerviosos son raros y la mortalidad baja. Cuando llegan a presentarse los signos nerviosos existe: anorexia, depresión, incoordinación, marcha en círculo y movimientos pendulares de la cabeza, entre otros. La única indicación frecuente de la infección es conjuntivitis y opacidad de la córnea en el 1 a 4% de los cerdos. Se ha sugerido retraso en el crecimiento y disminución en el consumo de alimento (26, 32). Martínez *et al.*, (1987) concluyen que los cerdos de alrededor de dos a tres meses de edad, son los que tienen los títulos de anticuerpos IH más bajos contra este virus; por lo tanto son susceptibles a sufrir la enfermedad (33).

Animales del pie de cría. Es poco frecuente que los animales adultos desarrollen opacidad corneal. Las cerdas con camadas afectadas pueden no presentar signología, con frecuencia

manifiestan anorexia uno o dos días antes de los signos clínicos en los lechones, también puede únicamente presentarse la opacidad de la córnea. Al analizar los diferentes parámetros productivos en las granjas afectadas se observó un aumento en el número de hembras repetidoras, lo que ocasionó una caída del 15 al 20% de la fertilidad de la piara. Este efecto persiste hasta por seis a ocho meses. Hay un incremento en el número de lechones nacidos muertos (2 al 24%) y fetos momificados (1 al 5%). En las camadas que nacen durante el brote la morbilidad es del 20 a 50% en estos lechones afectados, la mortalidad es del 87 a 99%. Esta alteración en la maternidad dura entre dos y nueve semanas (26, 32). Pueden presentarse abortos cuando el cuadro es agudo (26, 32).

En los sementales ocasiona opacidad corneal, orquitis, atrofia testicular, epididimitis y formaciones quísticas a nivel de cabeza del epidídimo. En los eyaculados se ha observado una baja importante en la cuenta espermática y en la motilidad de los espermatozoides, así como un aumento en las anomalías espermáticas. Las células “blanco” del virus son las espermatogonias y tejido pseudoestratificado de epidídimo. No se pierde la libido del verraco ante la infección por el virus, debido a que las células de Leydig no se ven afectadas durante la infección del animal. Al no perderse la libido el verraco puede continuar con eyaculaciones, sin que el volumen del eyaculado se vea afectado. Las eyaculaciones pueden carecer de espermatozoides, debido a que existe una obstrucción mecánica a nivel de epidídimo por la presencia de granulomas o por la pérdida de espermatogonias. Es frecuente observar eyaculados con abundantes malformaciones espermáticas (6).

### Lesiones

Los cambios macroscópicos que se le atribuyen a la infección por el RVP son escasos y ocasionalmente están ausentes. Con frecuencia se observa congestión meníngea con aumento variable del volumen del líquido cerebroespinal y neumonía, la cual se aprecia en los bordes ventrales de los lóbulos craneales y con extensión del 1 al 5% del parénquima. Los pulmones no se colapsan (7, 34). La opacidad de la córnea por edema no es frecuente en los cerdos muertos por la enfermedad, generalmente es unilateral. En cerdos mayores de 30 días y convalecientes, la córnea edematosa llega a tener un grosor de hasta 3 mm, el

humor acuoso es escaso. En raras ocasiones se ulcera la capa externa de la córnea y eventualmente se forma queratocono. Los principales cambios histológicos se localizan en el sistema nervioso central. En los animales infectados se presenta meningoencefalitis no supurativa que afecta principalmente al tálamo, cerebro medio y corteza cerebral. Hay gliosis focal y difusa, así como infiltración perivascular, en donde se observan linfocitos, células plasmáticas y células reticulares, neuronofagia, necrosis neuronal, glial y coroiditis. No se aprecian cuerpos de inclusión en casos naturales. En el pulmón, se observan áreas multifocales de neumonía intersticial, cuya característica es la infiltración de células mononucleares en la pared alveolar. El examen histológico de los ojos afectados indica cambios moderados. El edema corneal rara vez es prominente. En diferentes partes del ojo, tales como el ángulo iridocorneal, la unión corneoescleral, la lamina limitante posterior o interna, iris y en el nervio óptico hay macrófagos y neutrófilos infiltrados. En la córnea edematizada se aprecian vasos de nueva formación. En la mayoría de los animales estudiados se aprecia tonsilitis moderada con epitelio descamado y células inflamatorias en las criptas (7, 34, 35).

En los sementales se puede presentar orquitis, epididimitis, atrofia testicular, formaciones de granulomas a nivel de epidídimo. Ocasionalmente se pueden observar hemorragias en la túnica albugínea, epidídimo o en los testículos. (36) Las lesiones microscópicas que se pueden ver en testículo son: degeneración y necrosis del epitelio germinal y a nivel intersticial hay infiltración de células mononucleares, vascularización, hialinización y fibrosis. En epidídimo se presenta vacuolización en el epitelio pseudoestratificado, pérdida de esterocilios, infiltración de células mononucleares y macrófagos, granulomas. También se puede observar la presencia de espermatozoides en los capilares del parénquima testicular (6).

### **Interacción virus – célula**

Uno de los eventos principales en el proceso de infección viral es la expresión de receptores celulares los cuales son reconocidos por las proteínas de adherencia viral. La mayoría de los paramixovirus poseen dos proteínas integrales de membrana, una de las cuales está involucrada en la adherencia (proteína HN) y la otra en el proceso de fusión de las

membranas viral y celular (proteína F). En los rubulavirus la proteína de adherencia HN se une a receptores celulares que contienen ácido siálico, los cuales pueden ser glicoproteínas o glicolípidos y permite que estos virus aglutinen eritrocitos de mamíferos y de aves, e infectan una gran variedad de células de distintos orígenes.

En los paramixovirus la participación del receptor celular en el proceso de infección es controversial, por un lado estos virus reconocen como receptores moléculas ubicuas de ácido siálico, y sin embargo, el rango de hospederos de cada miembro de esta familia viral es muy restringido. Reyes *et al.*, (1993) encontraron mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación con azúcares y glicósidos, que la hemglutinina del rubulavirus porcino reconoce estructuras que contienen ácido neuramínico, mostrando su mayor afinidad hacia el oligosacárido sialilalfa2, 3lactosa (NeuAalfa2, 3GalB1,4Glc). Los datos de este estudio sugieren que la glicoproteína HN posee un sitio de unión restringido. También se demostró que la expresión de NeuAalfa2,3Gal, en la superficie celular permitió la infección de cultivos celulares, mientras que las modificaciones en su expresión inhibieron la infectividad viral. Más aún, el bloqueo de su isómero NeuAalfa2,6Gal no afectó el proceso de infección.

Reyes *et al.*, (1997) realizaron una exhaustiva búsqueda de glicoconjugados tisulares, mediante ensayos histoquímicos con lectinas. Los resultados mostraron que las células en cultivo expresaron en gran cantidad ácido neuramínico, en forma de sus dos enlaces alfa2,3 y alfa2,6, reconocidos por las lectinas de *Maackia amurensis* (MAA) y *Sambucus nigra* (SNA) y en menor proporción otros azúcares. Así los ensayos de competencia con lectinas corroboraron la especificidad viral, ya que la lectina MAA, específica para NeuAca2,3Gal, inhibió casi completamente la infectividad.

Reyes *et al.*, (1997) encontraron que la mayoría de los tejidos expresan ácido siálico; no obstante, se encontraron importantes diferencias en el tipo de ácido siálico expresado entre los cerdos neonatos y los adultos. Así, el SNC de cerdos neonatos presentó una amplia distribución de NeuAalfa2,3Gal con escasa expresión de su isómero NeuAalfa2,6Gal en el bulbo olfatorio, hipocampo, tálamo, médula oblonga y corteza cerebral. Asimismo, se encontró una baja expresión del ácido 9-O-acetilneuramínico en casi todas las regiones del SNC.

Cambios notables fueron identificados en el SNC de los cerdos adultos, principalmente el incremento de moléculas de ácido siálico con enlace alfa2,6 en la mayor parte del SNC, pero principalmente en las estructuras relacionadas con la conducción del estímulo olfatorio, bulbo y tracto olfatorio, lóbulo piriforme, hipocampo, tálamo e hipotálamo; en las cuales además se redujo la expresión de NeuAalfa2,3Gal. En algunas regiones del SNC, la diferencia en el tipo de enlace glicosídico fue acompañada por la adición de grupos O-acetilo en el carbono 9 (9-O-NeuAc) (9, 37).

Los cambios en la expresión de sialoglicoconjugados parecen tener relación directa con la maduración del tejido nervioso y pueden estar relacionados con la susceptibilidad a la infección por el rubulavirus. Así, la expresión de NeuAalfa2, 3Gal está directamente ligada con los sitios de identificación del antígeno y de replicación viral en cerdos neonatos y lactantes, menores de 20 días de edad, infectados en forma natural y experimental con el rubulavirus porcino (9, 37).

La falta de expresión de NeuAalfa2,3Gal parece ser decisiva en la resistencia a la infección mostrada en el SNC de los cerdos adultos. No obstante, estos animales mostraron lesiones características en sus órganos reproductores; los cuales expresan el receptor NeuAalfa2,3Gal. Lo que sugiere que es necesaria la expresión de los glicoconjugados con ácido siálico en enlace alfa2, 3 para que el rubulavirus porcino pueda ingresar y diseminarse dentro del tejido encefálico (9, 37).

Una correlación similar se observa en el epidídimo de los cerdos neonatos, los cuales expresan bajos niveles de NeuAalfa2,3Gal, mientras que el mismo tejido en los cerdos adultos expresa abundantemente este azúcar. Estos datos sugieren que la expresión de NeuAalfa2,3Gal y en consecuencia la susceptibilidad a la infección tisular, son reguladas por el desarrollo ontogénico del cerdo. El control en la expresión y regulación de la actividad de las sialiltransferasas tal vez jueguen un papel importante las hormonas esteroides. Esto último es apoyado por datos que indican que la susceptibilidad de tejidos reproductores a la infección por el virus de la parotiditis humana está relacionada con el nivel de hormonas presentes en el tejido. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido una relación directa entre el daño al tejido y el nivel hormonal del mismo (9, 37).

Los ácidos siálicos son monosacáridos que se encuentran en la posición más externa de las cadenas sacarídicas de glicolípidos y glicoproteínas. Se ha encontrado que la diversidad de los ácidos siálicos es regulada por la especie celular y por el desarrollo, implicando un papel importante en los fenómenos de reconocimiento intercelular (9, 37, 38, 39).

### **Virus que se diseminan por el semen**

La presencia de agentes infecciosos, en especial de virus diseminados en el semen de los animales domésticos, tiene una relevante importancia epidemiológica y económica, tanto a nivel nacional como internacional. Los factores que aumentan este significado epidemiológico y económico se derivan de los fundamentos intrínsecos de la preparación del semen, para su aplicación durante la inseminación artificial. Por una parte, la dilución de un eyaculado contaminado permite ampliar las posibilidades de difusión del agente infeccioso. Por otro, los métodos de conservación criogénica proporcionan las condiciones idóneas para la supervivencia de los virus. Todo ello, unido al uso generalizado de la inseminación artificial como instrumento de mejora genética, ha motivado una preocupación sobre el intercambio nacional e internacional de gametos sin contaminantes (40).

El semen consiste de espermatozoides suspendidos en el plasma seminal, que está formado por los fluidos de los testículos y de varios órganos accesorios, como lo son el epidídimo, próstata, vesícula seminal y glándula bulbouretral. El semen puede estar contaminado por microorganismos que se alojan en los testículos o en alguna de las glándulas accesorias. El semen puede contaminarse por los microorganismos presentes en la cavidad prepucial, en el orificio prepucial o en el divertículo prepucial. Sangre o fluidos extravasados dentro del sistema urogenital pueden estar presentes en el semen, y esto representa una posible fuente de infección. Finalmente, el semen se puede contaminar durante la colección, procesamiento, almacenaje y transporte (40).

La calidad y la morfología espermáticas del eyaculado de los verracos sanos y sexualmente maduros dependen de muchos factores. La temperatura, humedad, luz ambiental, raza y la edad, son algunos de los factores que influyen en la obtención de espermatozoides de calidad. Otro factor importante que incide en la calidad y morfología espermáticas es la frecuencia con



que se recoge el semen, en el sentido de que un aumento o disminución excesivos de dicha frecuencia provoca un deterioro considerable de la calidad y morfología espermáticas del semen obtenido. Otro factor a considerar son los problemas infecciosos (41).

Numerosos virus se han aislado de semen de verracos infectados y pueden ser divididos dentro de las siguientes categorías (42):

CATEGORIA I	CATEGORIA II	CATEGORIA III	CATEGORIA IV
Virus capaces de causar infertilidad y regulados por los Estados Unidos.	Virus que ocasionan fallas reproductivas y con una distribución muy extensa.	Enfermedades exóticas que pueden provocar infertilidad.	Virus que han sido o podrían ser encontrados en el semen, pero su papel no es muy claro en las fallas reproductivas.
<i>El virus de Aujeszky</i>	<i>Parvovirus porcino</i>	<i>Virus de Fiebre Aftosa</i>	<i>Adenovirus</i>
<i>El virus de Fiebre Porcina Clásica</i>	<i>Enterovirus</i>	<i>Virus de la Enfermedad Vesicular del Cerdo</i>	<i>Reovirus</i>
		<i>Virus de la Fiebre Porcina Africana</i>	<i>Citomegalovirus</i>
		<i>Virus del Exantema Vesicular</i>	<i>Virus de la Gastroenteritis transmisible</i>
		<i>Virus de la Encefalitis Japonesa tipo B</i>	<i>Virus de la Encefalomielitis aglutinante</i>
			<i>Virus del papiloma genital transmisible</i>
			<i>Virus de IBR</i>
			<i>Virus de Influenza Porcina</i>

### Categoría I

Virus de la Enfermedad de Aujeszky. Este virus ha sido aislado del semen de verracos infectados en forma natural. Se han reportado cambios en la calidad del semen en verracos

infectados en forma experimental y algunas veces no mostraban interés en la monta debido a la enfermedad sistémica (42, 43).

Fiebre Porcina Clásica. Es muy probable que el semen se contamine con este virus y se almacene en el sistema urinario (42, 44).

### **Categoría II**

Parvovirus Porcino. Este virus ha sido aislado del semen de verracos infectados naturalmente. Sin embargo, no se excluyó que el aislamiento fue debido a la contaminación fecal del prepucio durante la fase de excreción viral. Se ha obtenido el DNA viral de semen colectado, a través de un catéter colocado en el epidídimo, después de una inoculación oronasal. También se encontró en testículos y vesículas seminales de verracos infectado por vía oronasal. Se han reportado desórdenes en la espermatogénesis y una ligera inflamación del tejido intersticial del epidídimo, vesícula seminal y del cordón espermático. En otros estudios no se encontraron signos de inflamación o degeneración en órganos reproductivos y también, concluyen que no es claro si el parvovirus afecta la calidad del semen (42, 45, 46).

Enterovirus Porcino. Este virus puede causar una inflamación de las vesículas seminales, aumentar la presencia de anomalías espermáticas y disminuye la libido (42).

### **Categoría III y IV**

Encefalitis B Japonesa. Esta infección viral puede ocasionar alteraciones en la espermatogénesis. La enfermedad causa inflamación y cambios en la túnica y en el intersticio del epidídimo, también origina un decremento en la libido y en la calidad del semen. (42).

Fiebre Porcina Africana. El virus ha sido aislado del semen de verracos infectados experimentalmente (42).

Otros virus han sido reportados como contaminantes en el semen; sin embargo, se desconoce su efecto sobre la fertilidad en hembras y machos. Aquí se incluyen a los virus de la Enfermedad Vesicular del Cerdo, Fiebre Aftosa, Adenovirus y Reovirus (42, 44).

Los virus de la Enfermedad Vesicular del Cerdo y de la Fiebre Aftosa han sido aislados del semen. Cerdas que fueron inseminadas con semen contaminado con el virus de la Enfermedad Vesicular seroconvirtieron; sin embargo, la transmisión venérea no ha sido demostrada con el de la Fiebre Aftosa. Verracos infectados experimentalmente con Fiebre Aftosa, no muestran interés en la monta a causa de la enfermedad sistémica (42, 44).

Adenovirus Porcino y el reovirus porcino. El virus ha sido aislado del semen después de la inoculación experimental (44).

Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino (PRRS). Esta infección viral tiene un marcado efecto sobre la espermatogénesis, la calidad del semen de los verracos infectados decae por 13 semanas (47). Existen estudios que han demostrado la presencia del virus en el semen de los verracos infectados, a través de la prueba de PCR, hasta por 92 días postinfección (44, 48).

### **Fisiología y endocrinología del semental**

#### Desarrollo testicular

Al nacimiento, los testículos están aún indiferenciados. Los precursores de los túbulos seminíferos conocidos como cordones sexuales, están sólidos; debido a que no tienen un lumen central. Contienen células germinales indiferenciadas y precursores de las células de Sertoli, pero las células intersticiales son abundantes en ese momento (41, 49).

La pubertad se caracteriza por cambios histológicos a nivel testicular, que se manifiestan por un aumento del diámetro y longitud de los túbulos seminíferos, formación de la luz tubular, proliferación de las células de Sertoli y aparición de las células espermatogénicas.

Se puede considerar que un macho ha llegado a la pubertad cuando los espermatozoides están presentes en los túbulos seminíferos y en la cola del epidídimo. Este momento se presenta entre los cinco y los ocho meses de vida; la madurez sexual se alcanza aproximadamente a las 35 semanas de edad (41, 49).

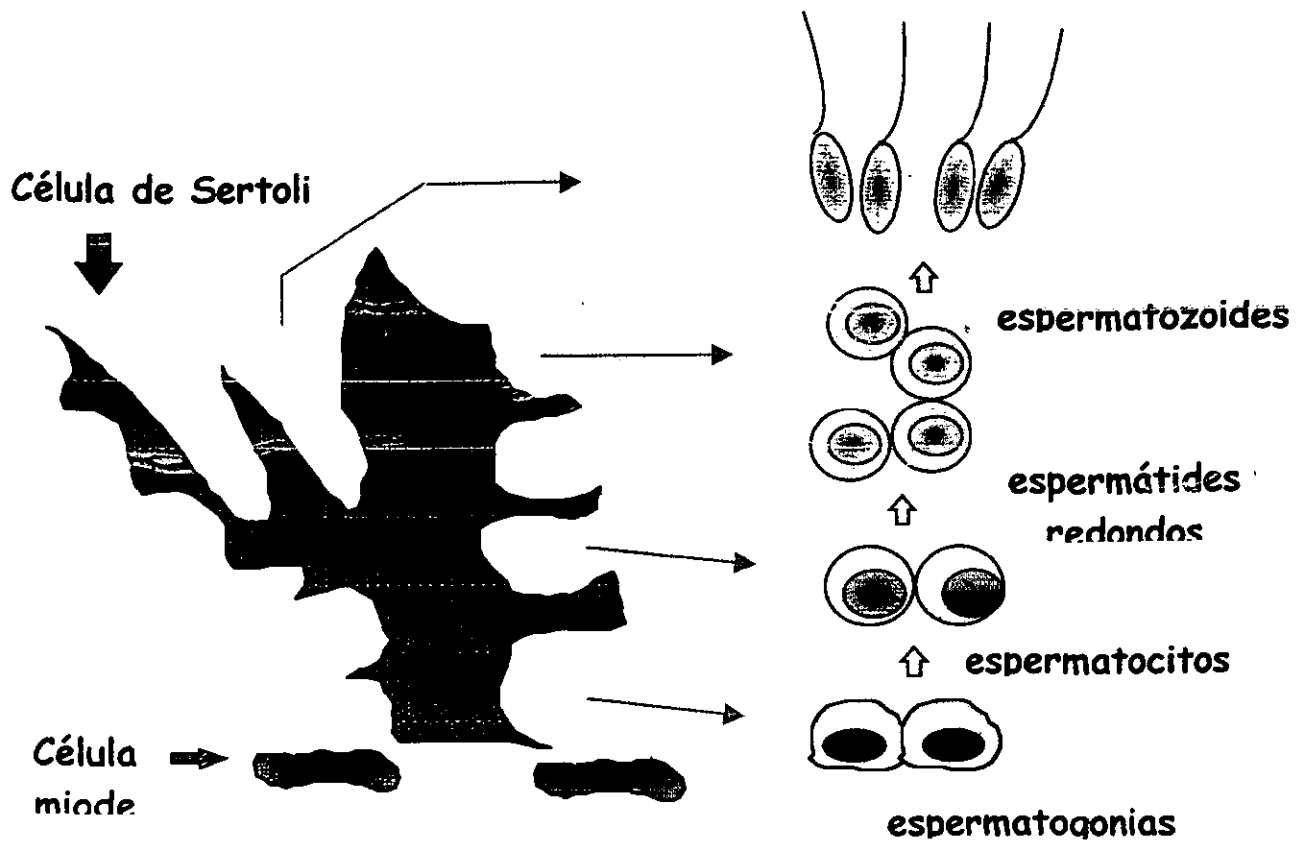
#### Espermatogénesis

Espermatogénesis es el término que se aplica al proceso por el cual una célula primitiva es convertida en un espermatozoide maduro (Figura 1).

Al aproximarse el momento de la pubertad, los gonocitos presentes desde etapas fetales se convierten en espermatogonias primitivas de tipo A indiferenciadas, las cuales pueden permanecer como células de reserva o dividirse por mitosis para dar origen a las espermatogonias tipo A diferenciadas. Éstas se dividen sucesivamente en espermatogonias tipo A, espermatogonias intermedias y en espermatogonias tipo B. Posteriormente, la espermatogénesis continúa con una primera división meiótica que da origen a los espermatocitos y con una segunda división que da origen a las espermatidas. En este momento termina la espermatogénesis, como tal, y se inicia el proceso de espermiogénesis. En esta etapa la espermatida sufre una serie de cambios hasta convertirse en un espermatozoide y liberarse al túbulo seminífero.

En el caso del cerdo la espermatogénesis dura 34 días, aproximadamente, se puede suponer que alcanza la pubertad 34 días después de que la primera célula primitiva ha iniciado la espermatogénesis. Sin embargo la primera espermatogonia aparece en el testículo a la edad de 2 meses, el primer espermatocito a los 3 meses y el primer espermatozoide a los 5 meses de vida. Lo anterior indica que hay una falta de estímulo durante las etapas finales de la espermatogénesis en los machos prepúberes; este retraso es probablemente atribuible a los bajos niveles de la hormona Folículo Estimulante (FSH) y de la Testosterona, en el período que precede a la pubertad. Estas dos hormonas son necesarias para la maduración de un espermatocito primario hacia un espermatozoide.

Una vez formado el espermatozoide y liberado en el túbulo seminífero, inicia el recorrido en el epidídimo, proceso que le toma aproximadamente otros 10 días y durante el cual sufre una serie de cambios en su maduración que le confieren su capacidad fecundante. Los espermatozoides que se encuentran en la cabeza del epidídimo tienen una pobre capacidad de fertilización, mientras que los hallados en la cola de dicha estructura tienen una alta tasa fertilizante. Si se toma en cuenta el tiempo de maduración de la espermatogénesis más el tiempo de maduración en epidídimo, un espermatozoide maduro tarda un total de 44 a 45 días en formarse (41, 49, 50).



**Figura 1. Espermatogénesis**

### Regulación hormonal

Antes de la pubertad no existe una espermatogénesis, como tal, debido a que el hipotálamo es demasiado sensible a la retroalimentación negativa de andrógenos y estrógenos, por lo que no secreta la hormona liberadora de Gonadotropinas (GnRH) en la cantidad o con la frecuencia requerida.

Con base a lo anterior, es claro que el inicio de la pubertad en el macho depende de un incremento en las cantidades de FSH y testosterona; sin embargo, durante la etapa prepuberal los niveles de FSH, hormona Luteinizante (LH) y testosterona son bajos, debido a que la testosterona tiene un efecto de retroalimentación negativa para la secreción de gonadotropinas.

En algún momento antes de la pubertad, el hipotálamo es menos sensible a esa retroalimentación negativa, especialmente para la FSH, ocurriendo un incremento en los niveles plasmáticos de FSH y reduciendo la influencia inhibitoria de la testosterona.

Sin embargo, aquí también es necesario un incremento en la cantidad de testosterona, este incremento está determinado por la LH. Para que esto suceda, la FSH promueve el desarrollo de receptores para LH en las células de Leydig, llegando a ser el testículo más sensible a la LH, incrementándose de esta forma la cantidad de testosterona. De esta manera, la testosterona se unirá a proteínas receptoras a la célula de Sertoli y será transferida a la célula germinal, acelerándose el proceso de espermatogénesis (41, 49) (Figura 2).

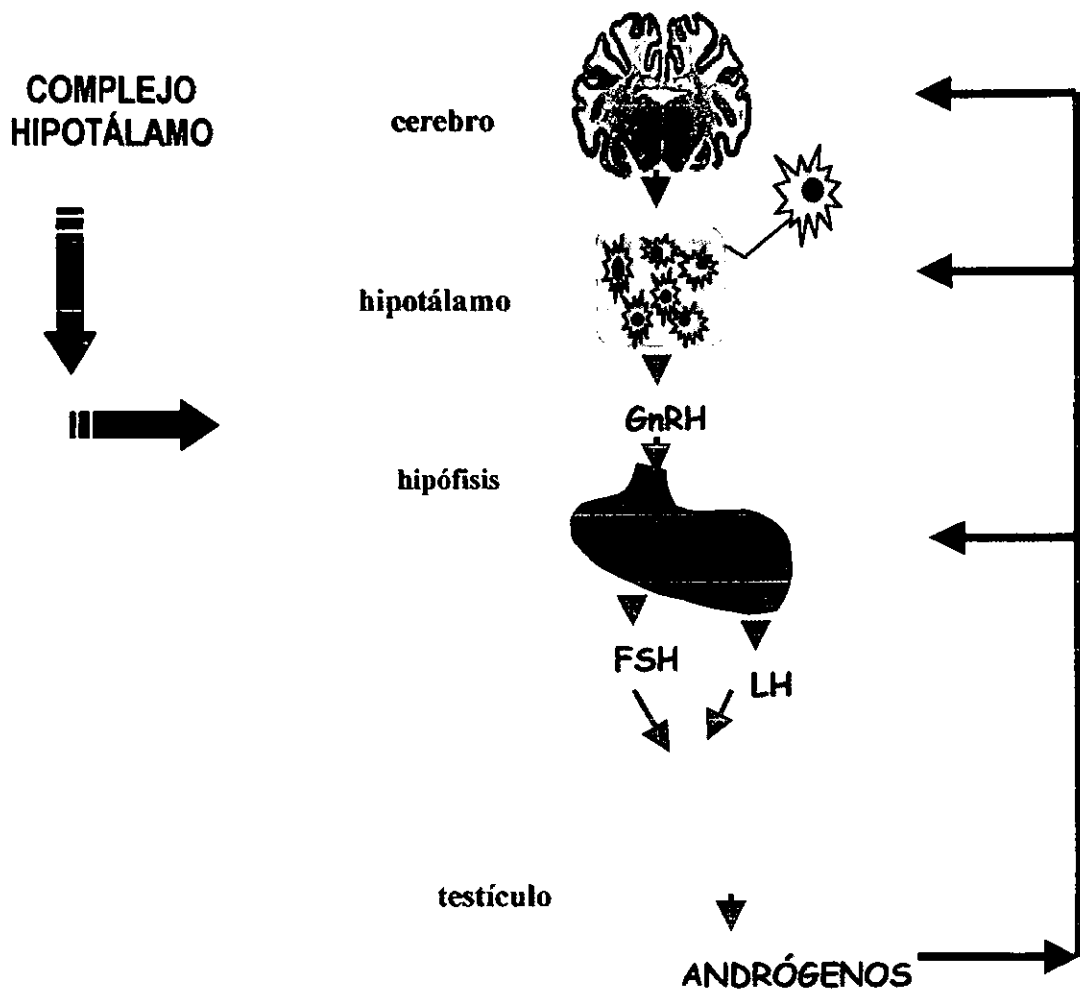


Figura 2. Control hormonal de la reproducción del macho

### Morfología del espermatozoide

**Cabeza.** La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por DNA y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas. Su número cromosómico y, por tanto, el contenido de DNA nuclear es haploide. La naturaleza haploide de las células espermáticas se debe a las divisiones celulares meióticas que ocurren durante su formación (49) (Figura 3 y 4).

**Acrosoma.** El extremo anterior del núcleo espermático está cubierto por el acrosoma, un delgado saco membranoso de doble capa estrechamente adherido al núcleo durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide. Esta estructura en forma de casquete, que contiene varias enzimas hidrolíticas incluyendo proacrosina, hialuronidasa, esterases y acidohidrolasas, participa en el proceso de la fecundación. El segmento ecuatorial del acrosoma es importante debido a que es esta parte del espermatozoide, junto con el segmento anterior de la región posacrosómica, la que se fusiona inicialmente con la membrana del oocito durante la fecundación (49) (Figura 3 y 4).

**Cola.** La cola espermática está formada por el cuello y los segmentos medio, principal y caudal. El cuello o segmento conector forma una placa basal que embona en una depresión en la superficie posterior del núcleo. La placa basal del cuello es continua en sentido posterior, y tiene nueve fibras gruesas que se proyectan hacia atrás a través de la mayor parte de la cola.

La región de la cola comprendida entre el cuello y el anillo citoplásmico es el segmento medio. El centro de este segmento medio, junto con toda la longitud de la cola, constituye el axonema. Este se compone de nueve pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de dos filamentos centrales. En el segmento medio, esta disposición 9+2 de los microtúbulos está rodeada por nueve fibras gruesas o densas que al parecer están asociadas a los nueve dobletes del axonema. El axonema y las fibras densas asociadas del segmento medio están cubiertos periféricamente por numerosas mitocondrias. Esta vaina mitocondrial, dispuesta en un patrón helicoidal alrededor de las fibras longitudinales de la cola, genera la energía necesaria para la motilidad espermática. La vaina mitocondrial termina en el anillo citoplásmico.



El segmento principal, que continúa en sentido posterior desde el anillo citoplásmico y se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por el axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. Se piensa que la vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola.

El segmento caudal o terminal, posterior a la terminación de la vaina fibrosa, contiene sólo el axonema cubierto por la membrana plasmática.

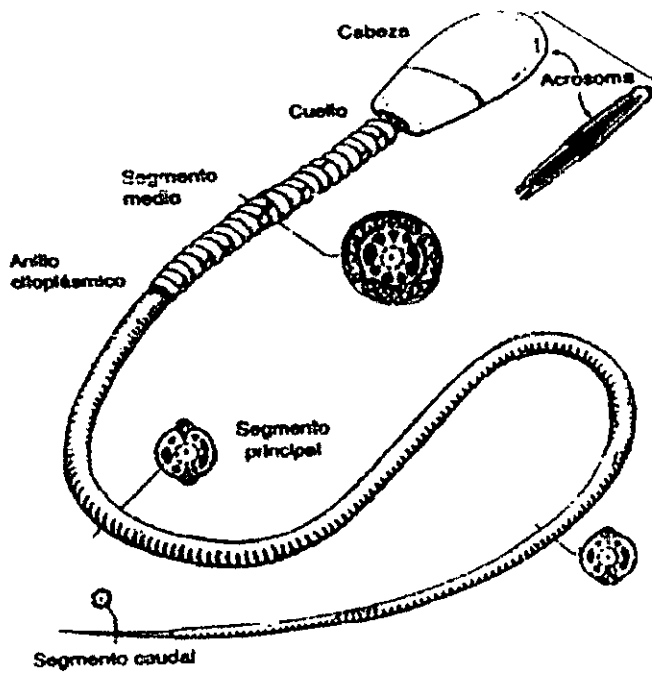
El axonema es el que da la motilidad al espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9+2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizando entre pares adyacentes.

La inclusión protoplásmica o citoplásmica, que suele desprenderse de los espermatozoides tras la eyaculación, consiste en citoplasma residual (49) (Figura 3).

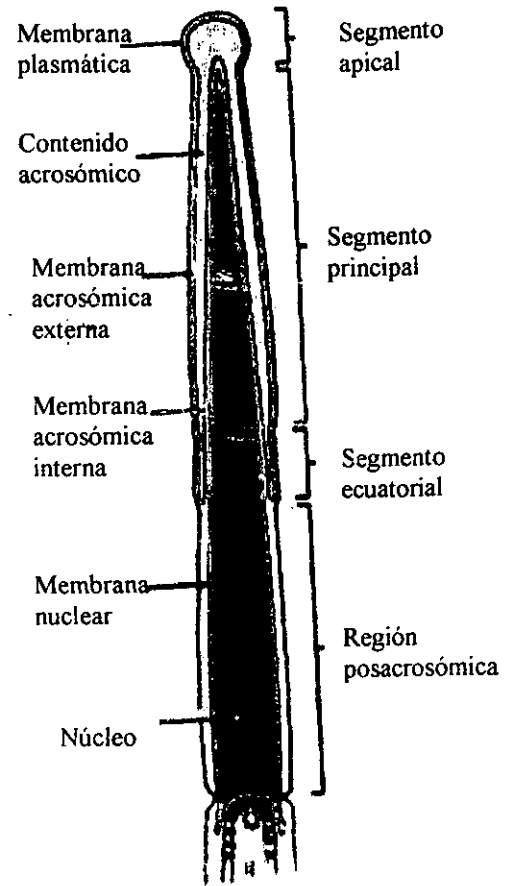
#### Maduración espermática

Los espermatozoides inmaduros son transportados hacia el epidídimo en donde experimentan una serie de eventos relacionados con la maduración y su interacción con los componentes de las glándulas sexuales accesorias durante su emisión, para desarrollar su capacidad de fecundar un óvulo exitosamente. Algunos de estos eventos consisten en:

- a) Desarrollo del potencial para la motilidad progresiva sostenida.
- b) Modificación de los patrones metabólicos y el estado estructural de los organelos del flagelo.
- c) Cambios en la cromatina nuclear.
- d) Cambios en la naturaleza de la superficie de la membrana plasmática.
- e) Pérdida de la inclusión citoplasmática.
- f) Modificaciones en la forma del acrosoma (49).



**Figura 3. Características de un espermatozoide**  
(Hafez., 1996)



**Figura 4. Corte Sagital de una cabeza de espermatozoide**  
(Hafez., 1996)

Existen glicoproteínas que al parecer tiene un papel importante en los procesos de maduración espermática, adquisición de motilidad, capacitación y fusión espermatozoide-óvulo (51).

La maduración espermática en el humano y otras especies de animales ha sido estudiada con la utilización de marcadores fluorescentes unidos a lectinas. Basado en el patrón de reactividad de las lectinas con las células espermáticas a nivel testicular, las lectinas se han dividido en cinco grupos (52, 53):

**Patrón de reactividad de las lectinas con las células espermáticas a nivel testicular.**

<b>Grupo</b>	<b>Fuente</b>	<b>Abreviatura</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Lugar de reactividad</b>
1	<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	Alfa-D-man, Alfa-D-glc	Todas las células espermáticas
1	<i>Triticum vulgare Agglutinin</i>	WGA	(D-glcNAc) <sub>2</sub> , neuNAc	Todas las células espermáticas
1	<i>Lens culinaris Agglutinin</i>	LCA	Alfa-D-man	Todas las células espermáticas
1	<i>Phaseolus vulgaris Agglutinin-E</i>	PHA-E	D-GalNAc (hemaglutinante)	Todas las células espermáticas
1	<i>Phaseolus vulgaris Agglutinin-L</i>	PHA-L	D-GalNAc (mitogénica)	Todas las células espermáticas
1	<i>Solanum tuberosum</i>	STA	D-GlcNAc	Todas las células espermáticas
1	<i>Maclura pomifera</i>	MPA	D-GalNAc	Todas las células espermáticas
1	<i>Ricinus communis</i>	RCA-II	D-Gal	Todas las células espermáticas
2	<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	D-Gal	Espermátidas Espermatozoides
3	<i>Bauhinia purpurea</i>	BPA	D-GalNAc	Espermátidas Espermatozoides
3	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	B-D-gal-(1-3)-D-galNAc	Espermátidas Espermatozoides
3	<i>Glycine max</i>	SBA	D-galNAc>D-galalfa-L-Fuc	Espermátidas Espermatozoides
3	<i>Lectina vicia</i>	VVA	D-galNAc	Espermátidas

	<i>villosa</i>			Espermatozoides
4	<i>Helix pomatia</i>	HPA	D-GalNAc	Espermatozoides
4	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSA-I	D-Gal	Espermatozoides
4	<i>Ulex europaeus</i> <i>Aglutinina-II</i>	UEA-II	L-Fucosa	Espermatozoides
4	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSA-II	D-GlcNAc	Espermatozoides
5	<i>Dolichos biflorus</i> <i>Phaseolus limensis</i> <i>Ulex europaeus</i>	DBA LBA UEA-I	D-GalNAc  L-Fucose	Lectinas que no reaccionan con las células espermatogénicas

Todas las lectinas del grupo 1 al 4 reaccionan con espermatozoides eyaculados.

Ahora en base en la reactividad de las lectinas con la región de la cabeza de los espermatozoides, las lectinas se clasifican en cuatro grupos (52, 53):

Grupo	Nombre	Abreviatura	Azúcar	Lugar de reactividad
1	<i>Bauhinia pupurea</i>	BPA	D-GalNAc	Membrana plasmática
1	<i>Triticum vulgare</i> <i>Aglutinin</i>	WGA	(D-glcNAc) <sub>2</sub> , neuNAc	Membrana plasmática
1	<i>Lens culinaris</i> <i>agglutinin</i>	LCA	Alfa-D-man	Membrana plasmática
1		STAR		Membrana plasmática
1	<i>Ricinus communis</i>	RCA-II	D-Gal	Membrana plasmática
1	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>agglutinin-E</i>	PHA-E	D-GalNAc (hemaglutinante)	Membrana plasmática
1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	PHA-L	D-GalNAc	Membrana

	<i>agglutinin-L</i>		(mitogénica)	plasmática
1	<i>Ricinus communis</i>	RCA-I	D-Gal	Membrana plasmática
1	<i>Ulex europaeus</i> <i>Agglutinin-II</i>	UEA-II	D-GlcNAc	Membrana plasmática
1	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSA-II	D-GlcNAc	Membrana plasmática
2	<i>Canavalia ensiformis</i>	ConA	Alfa-D-man, Alfa-D-glc	Acrosoma Región postacrosomal
3	<i>Arachis hypogaea</i>	PNA	Beta-D-gal-(1-3)- D-galNAc	Acrosoma
4	<i>Helix pomatia</i>	HPA	D-GalNAc	Región intermedia de la cabeza
4	<i>Lectina vicia villosa</i>	VVA	D-galNAc	Región intermedia de la cabeza
4	<i>Glycine max</i>	SBA	D-galNAc>D-gal	Región intermedia de la cabeza
4	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GSA-I	D-Gal	Región intermedia de la cabeza
4	<i>Maclura pomifera</i>	MPA	D-GalNAc	Región intermedia de la cabeza

Estos datos disponen un mapa de los sitios\* de unión de las lectinas en las células espermatogénicas y en los espermatozoides eyaculados y muestran la distribución de las glicoproteínas (dominios) en las células espermáticas durante la diferenciación y la maduración (52, 53).

#### Anormalidades espermáticas

Las malformaciones espermáticas de acuerdo a su origen se dividen en dos grupos en: anomalías primarias y secundarias.

Las anomalías primarias, ocurren a nivel de testículo durante el proceso de la espermatogénesis y de la espermiogénesis. Las anomalías secundarias se presentan durante el proceso de la maduración a nivel de epidídimo (54).

**Anomalías primarias:**

- Cresta nuclear
- Defecto en la protuberancia acrosómica
- Defecto en el tamaño de la cabeza:
  - Macrocabeza
  - Microcabeza
- Defecto en la forma de la cabeza:
  - Ovalada
  - Elongada
  - Elíptica
  - Piriforme
  - Triangular
  - Cuadrangular
  - Achatada
  - Alargada
- Flagelo abaxial
- Flagelo corto
- Flagelo largo
- Flagelo grueso
- Flagelo delgado
- Múltiples flagelos

**Anomalías secundarias:**

- Acrosoma vacuolado
- Aglutinación de flagelo con flagelo
- Múltiples cabezas (dos, tres)

- Flagelo enroscado:
  - Segmento intermedio
  - Segmento principal
  - Segmento terminal
- Gotas citoplasmáticas, proximal y distal

Se han identificado diversas malformaciones espermáticas (55, 56):

a) Espermatozoides con malformaciones cefálicas. Estas malformaciones afectan la forma o tamaño de la cabeza. Las alteraciones en la forma de la cabeza más frecuentemente observadas son: cabeza redondeada, alargada, cabeza doblada por su eje longitudinal, cabeza lanceolada u oval. Las alteraciones en el tamaño de la cabeza son: la microcefalia y la macrocefalia; en algunos espermatozoides macrocefálicos puede producirse el doblamiento de la cabeza.

b) Espermatozoides con anomalías acrosómicas y anomalías nucleares. Entre las anomalías del acrosoma destaca el gran desarrollo de la protuberancia acrosómica, la presencia de vesículas intraacrosómicas, la dilatación acrosómica y la reacción acrosómica. Las alteraciones nucleares más frecuentemente observadas son las escotaduras y las vacuolas nucleares.

c) Espermatozoides inmaduros. Los espermatozoides inmaduros se caracterizan por la presencia de la gota citoplasmática, la cual puede tener una localización proximal o distal. También se han observado espermatozoides con dos gotas citoplasmáticas, una en posición proximal y la otra distal. Los espermatozoides inmaduros pueden presentar la cabeza redondeada, alargada o doblada por su eje longitudinal, la protuberancia acrosómica muy desarrollada o reacción acrosomal.

d) Espermatozoides con la cola doblada. El doblamiento de la cola puede localizarse en la pieza de conexión, la pieza intermedia, el anillo de Jensen o la pieza principal. Los espermatozoides con la cola doblada por el anillo de Jensen son los más frecuentemente observados; estos espermatozoides suelen presentar una cabeza redondeada o la protuberancia acrosómica muy desarrollada. Los espermatozoides con la cola doblada por

la pieza principal suelen ser de cabeza redondeada, también es frecuente que la protuberancia acrosómica esté muy desarrollada.

e) Espermatozoides con la cola enrollada. En función del grado de enrollamiento de la cola, se distinguen tres tipos de espermatozoides:

1. Espermatozoides con la cola parcialmente enrollada por la pieza terminal: estos espermatozoides pueden presentar la gota citoplasmática proximal.

2. Espermatozoides con la cola parcialmente enrollada por las piezas terminal y principal.

3. Espermatozoides con la cola totalmente enrollada; estos espermatozoides suelen presentar una morfología cefálica aberrante, como la cabeza achatada, lanceolada, alargada, oval o gigante y un gran desarrollo de la protuberancia acrosómica. En algunos espermatozoides el enrollamiento de la cola se manifiesta asociado a la degeneración celular.

f) Espermatozoides con múltiples cabezas. Se trata de espermatozoides con dos cabezas y dos colas; las colas muestran diversos grados de fusión y enrollamiento. En estos espermatozoides es frecuente que la cabeza o ambas cabezas presenten un gran desarrollo de la protuberancia acrosómica.



## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la excreción del *rubulavirus porcino* en el semen y evaluar la calidad de los espermatozoides de verracos inoculados con este virus.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Conocer el tiempo de diseminación del *rubulavirus porcino* a través del semen de los cerdos inoculados con este virus.
- Realizar la evaluación sobre las características macro y microscópicas de los eyaculados antes y después de la inoculación del *rubulavirus porcino*.
- Identificar las anomalías a nivel ultraestructural de los espermatozoides antes y después de la inoculación del *rubulavirus porcino*.

## **HIPÓTESIS**

- El *rubulavirus porcino* se disemina por un período determinado a través del semen de los cerdos y afecta la calidad del semen disminuyendo la viabilidad del mismo y provoca un aumento de las anomalías espermáticas, en los cerdos infectados.

## **JUSTIFICACIÓN**

Cuando el *rubulavirus porcino* ingresa a una explotación porcina, los parámetros reproductivos se ven afectados; independientemente de que los verracos manifiestan signos de orquitis, no se tiene conocimiento pleno si el virus se disemina en el semen. De ser así se desconoce por cuánto tiempo. Se sabe que el virus provoca malformaciones espermáticas; sin embargo, se desconoce el tiempo que persisten estas. Por ello es importante evaluar lo anteriormente mencionado en cerdos inoculados experimentalmente.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **CARACTERIZACIÓN DEL VIRUS**

Se trabajó con el rubulavirus porcino aislado del año de 1992 llamado Producción Animal Cerdos, aislamiento número tres (PAC3). Esta cepa ocasiona signos nerviosos de incoordinación y muerte en lechones, reabsorciones y momificaciones en cerdas gestantes, además de orquitis y epididimitis en machos.

Para realizar el aislamiento viral, se obtuvo el encéfalo de un cerdo recién destetado que manifestó signos clínicos.

Para la caracterización del virus se llevaron a cabo diversos estudios:

1. Efecto citopático
2. Hemaglutinación
3. Hemadsorción
4. Inmunofluorescencia
5. Purificación viral

#### Efecto citopático

Se obtuvo el encéfalo de un lechón en condiciones asépticas. Un gramo de tejido se suspendió en nueve partes de medio de cultivo celular. Se hizo un macerado del tejido y posteriormente se centrifugó a 2000 g durante 10 min.

El sobrenadante que se obtuvo se filtró a través de una membrana Millipore con poro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se colocó en un tubo estéril. Se le agregaron 1000 UI de penicilina y 1 mg de estreptomina por ml. Una vez que se realizó este procedimiento se colocó el inóculo en monocapas de células de riñón de mono verde (Vero) y de células de riñón de cerdo (PK-15), las cuales tenían medio de cultivo MEM con 2% de suero fetal bovino.

Los monoestratos se revisaron desde las 24 horas hasta completar 7 días de inoculación (57,58).

### Hemaglutinación

Se prepararon tres botellas con monoestratos celulares de la línea PK-15. Se infectaron con el aislamiento de campo y se congeló cada botella a las 36,48 y 72 h de infección. Se realizaron diluciones dobles seriadas (1:2 a 1:4096) del sobrenadante de cada botella. Estas diluciones se hicieron por triplicado con la finalidad de poder agregar eritrocitos de ave al 0.5%, de cobayo al 0.75% y de bovino al 0.5% (57, 59).

### Hemadsorción

Se hicieron diluciones décuples de la primer cosecha del virus, desde la dilución  $10^{-1}$  hasta  $10^{-9}$ . Este procedimiento se realizó en tubos de ensayo y se utilizó como diluyente medio para cultivos celulares (4.5 ml por tubo).

Al finalizar de preparar las diluciones se transfirieron 50  $\mu$ l de cada dilución a cada pozo de la columna nueve, de una placa de 96 pozos, se utilizaron un total de 400  $\mu$ l para los ocho pozos de la dilución  $10^{-9}$ . Una placa de 96 pozos contiene 12 columnas con ocho pozos en cada una de ellas.

Este mismo procedimiento se hizo hasta llegar a la dilución  $10^{-1}$ . Esto implica que se utilizaron nueve de las 12 columnas para las diluciones del virus.

Finalmente se agregaron  $2 \times 10^6$  células PK-15 por pozo, contenidas en un volumen de 200  $\mu$ l. A una columna de ocho pozos que no contenía diluciones del virus, sólo se le agregaron células PK-15.

Se prepararon tres placas con la finalidad de realizar hemadsorciones con eritrocitos de ave al 1% a las 72 y 96 h. A las 120 h se tiñó la última placa con metanol y cristal violeta. Se tituló siguiendo el método de Karber (57, 59).

### Inmunofluorescencia

Se prepararon monoestratos celulares de la línea PK-15 con  $1 \times 10^6$  células por ml en cubreobjetos colocados dentro de tubos de Leighton. Cuando las células tuvieron confluencia del 90% se inocularon con 200  $\mu$ l del sobrenadante que se obtuvo. El inóculo permaneció 2 h sobre el monoestrato, este se retiró y se le agregó medio de mantenimiento al monoestrato.

A las 24 horas de incubación los cubreobjetos con los monoestratos se retiraron y se lavaron con solución salina. Se fijaron con acetona durante 10 min. Se colocó albúmina bovina al 0.5% durante 15 min. Se lavó con solución salina. Se agregó un conjugado teñido con isotiocianato de fluoresceína, elaborado en conejo, diluido 1:100. Se dejó incubar 30 minutos a 37°C. Se lavaron las laminillas 2 veces con solución salina y una tercera con agua destilada. Finalmente las laminillas se montaron en portaobjetos con glicerina y solución salina v/v (60, 61).

Se preparó un monoestrato control (no inoculado) y se le agregó el conjugado. El conjugado se elaboró a partir del aislamiento que se hizo en el año de 1981.

### Purificación viral

El sobrenadante de los cultivos infectados fue clarificado por centrifugación a 3000 g durante 20 minutos y almacenado a -20°C hasta su uso. El virus contenido en los sobrenadantes fue precipitado con polietilenglicol 6000 (10%p/v), durante 4 h a 4°C con agitación leve y se centrifugó a 3000 g por 20 min. El botón se suspendió nuevamente en solución NTE (NaCl 150 mM, pH 7.5, EDTA 1mM) con un volumen equivalente al 5% del volumen original. Se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvo en congelación a -190°C. Posteriormente el virus fue purificado por centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa (25% y 50%) durante 1 h a 100 000 g. Después se recuperó la interfase viral. Si diluyó 1:10 y se centrifugó 4 h más a 100 000 g, en un gradiente lineal de sacarosa (10-60%).

Al final el virus se obtuvo por sedimentación a través de una solución de sacarosa al 30%. El virus se tituló por pruebas de hemaglutinación (HA). La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford. El grado de homogeneidad del material purificado se analizó por el patrón electroforético de poliacrilamida bajo condiciones reductoras (62).

### **SEMENTALES**

Se utilizaron cinco sementales Yorkshire-Landrace de nueve meses de edad. Estos fueron sometidos a un período de adaptación de dos semanas, para que se acostumbraran a su nuevo medio ambiente antes de comenzar su entrenamiento. Cada semental se colocó en un

corral de manera individual. Durante este período se realizaron pruebas serológicas para conocer su estado de salud.

#### **Entrenamiento:**

El entrenamiento se realizó con un “maniquí” para obtener el semen. Al ser colectados por primera vez fue necesario que se adaptaran al potro durante una semana con intervalos de descanso de 1 día entre cada colección. Durante este período se inició la evaluación andrológica de cada uno de los sementales y se estableció su calendario de colección durante todo el experimento.

#### **Colección del semen:**

Todo el material que estuvo en contacto con el semen, fue limpiado y esterilizado para evitar daño en los espermatozoides.

- 1.- Se colocó un recipiente dentro de cada termo.
- 2.- Se colocó un embudo.
- 3.- Sobre el embudo se colocaron gasas y se fijaron en el termo.

La colección del semen se realizó a 37°C.

Una vez preparado todo el material, se procedió a llevar a cada uno de los sementales al “potro”. Para la colecta del semen se utilizó la técnica de “mano enguantada”. Se usaron guantes estériles de polietileno (63, 64).

Se obtuvieron las tres fracciones que componen el eyaculado

- a) Fracción pre-espermática
- b) Fracción espermática
- c) Fracción post-espermática.

## **INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE LOS VERRACOS**

Se inocularon por instilación nasal a los cinco verracos con el *rubulavirus porcino*. El volumen que se utilizó fue de 5 ml con un título de  $1 \times 10^7$  dosis infectante para cultivos celulares 50% (DICC<sub>50</sub>) por mililitro.

Como testigos se utilizaron 40 eyaculados de cada semental antes de la inoculación del virus.

Se realizaron las siguientes evaluaciones:

### **a) Signos clínicos**

Se realizó una evaluación diaria de los signos clínicos durante 65 días. Se determinó la temperatura rectal de los animales, desde dos semanas antes y durante dos semanas después de la inoculación.

### **b) Medición de las dimensiones testiculares**

A cada uno de los sementales se les midió el largo y ancho de ambos testículos. Las medidas se obtuvieron con un vernier. Las mediciones se realizaron 2 veces por semana durante todo el experimento.

Los testículos se midieron de nuevo pero después de que fueron sacrificados.

### **c) Espermatobioscopías**

Las espermatobioscopías se realizaron con la finalidad de evaluar la calidad seminal antes y después de la inoculación de los verracos.

Se evaluaron las siguientes:

### **Características macroscópicas del semen:**

Temperatura: Se midió al momento de terminar la colecta del semen.

Color: El color normal de un eyaculado es blanco, variando la consistencia y la tonalidad desde acuoso a cremoso amarillento, según la concentración espermática que se obtenga.

Olor: El semen deber ser inodoro, cualquier olor representa una anomalía.

pH: Se midió con un pontenciómetro.

Volumen: El volumen se midió con una probeta graduada.

### **Características microscópicas del semen:**

Motilidad: Para evaluar la motilidad se realizaron los siguientes pasos:

Se colocó una gota del semen sobre un portaobjetos y sobre de ella un cubreobjetos (ambos atemperados a 37°C). Se observó a través de un microscopio, con el objetivo de 10x (seco débil), el movimiento general de los espermatozoides, a este movimiento se le dio un valor en porcentaje. También se observó a 40x (seco fuerte) para determinar el tipo de movimiento individual (63, 64, 65).

Concentración: Se utilizó un hematocitómetro y una pipeta para el conteo de glóbulos rojos. El procedimiento para calcular la concentración fue el siguiente: Se realizó una dilución 1:200 del semen, en una solución buffer. Se colocó una gota del semen diluido en cada una de las cámaras, se inició el conteo de las dos cámaras y se obtuvo el promedio del número de espermatozoides y se multiplicó por 10,000,000 para obtener el número de espermatozoides por mililitro (63, 64, 65).

Morfología: La evaluación de la morfología se realizó por medio de un frotis teñido con Eosina-Nigrosina, con el fin de observar las alteraciones de los espermatozoides.

El procedimiento consistió en tomar una muestra del semen con una pipeta Pasteur, y colocarla sobre la esquina de un portaobjetos limpio, seco y tibio. Después se depositó una gota del colorante junto a la gota de semen, se homogenizaron y se realizó el frotis con otro

portaobjetos. Se dejó secar el frotis por un minuto a temperatura ambiente y se observó al microscopio un total de 100 espermatozoides, mediante lo cual se determinaron los porcentajes de anomalías que se presentaron (63, 64, 65).

#### **d) Serología**

Se tomaron muestras sanguíneas de todos los sementales, antes y después de la inoculación a diferentes tiempos. Todas las muestras fueron evaluadas por la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) con eritrocitos de bovino al 0.5%.

Procedimiento para la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación:

Para titular los anticuerpos del suero problema se emplearon placas para microtitulación; que constan de 96 pozos con fondo en "U. Se utilizaron un par de hileras para cada muestra, esto significa que en cada placa se probaron 4 sueros problema. En cada hilera se agregaron 50 µl de solución salina por pozo y se colocaron 50 µl del suero sospechoso en el primer y segundo pozos de cada hilera. La dilución del suero se inició a partir del segundo pozo. Las diluciones de cada suero fueron desde 1:2 hasta 1:2048. Después de diluir el suero, se agregó el virus calculando 8 unidades hemaglutinantes por cada 50 µl. Se incubó durante una hora a 37°C. Finalmente se agregaron 50 µl de eritrocitos de bovino al 0.5% a cada pozo. La lectura se hizo a los 60 minutos (14, 57).

#### **e) Citometría de Flujo**

##### Detección del rubulavirus porcino en los espermatozoides (9)

Las muestras procesadas para realizar la citometría de flujo fueron los espermatozoides, estos fueron lavados 3 veces con solución salina buferada (PBS: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 g de NK<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,000 ml de agua destilada) y con albúmina sérica bovina (BSA) al 2%. De cada muestra de semen se obtuvo una población de  $1 \times 10^6$  de espermatozoides. Después se incubaron con yoduro de propidio (SIGMA) 15 µl (100



µg/ml) durante 10 minutos a 36°C, se lavaron dos veces con PBS y BSA al 2% y se centrifugaron a 1,000 rpm durante 10 minutos. Después se realizaron los siguientes pasos:

- 1.- Las poblaciones fueron incubadas con el primer anticuerpo antiviral (elaborado en conejo), 25 µl de una dilución 1:10, durante 15 minutos a 36°C.
- 2.- Las poblaciones fueron incubadas con el segundo anticuerpo (anticonejo) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (SIGMA), 25 µl de una dilución 1:200, durante 15 minutos a 36°C.

En cada incubación se lavó dos veces con PBS y BSA al 2% y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos.

Los testigos que se utilizaron fueron:

- a) Espermatozoides con yoduro de propidio.
- b) Espermatozoides con el yoduro de propidio y con el conjugado.

#### Detección de los receptores para el rubulavirus porcino (9) y del daño acrosomal en los espermatozoides (53, 66, 67, 68, 69, 70, 71)

El procedimiento que se realizó fue el siguiente:

- 1.- Se obtuvo una población de  $1 \times 10^6$  de espermatozoides de cada muestra de semen como se explicó anteriormente.
- 2.- Cada población se incubó con yoduro de propidio, como se expresó anteriormente.
- 3.- Se obtuvieron dos poblaciones de cada muestra. Se incubaron con la lectina de cacahuete (PNA) de SIGMA 1 µl y con *Maackia amurensis* (MAA) de SIGMA 1 µl durante 20 minutos, a 36°C respectivamente.
- 4.- Cada población se incubó con el marcador Estravidina-FITC (SIGMA) 1 µl (dilución 1:800), durante 10 minutos, a 36°C respectivamente.

En cada cambio de tratamiento se lavó dos veces con PBS y BSA al 2% y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos.

Los testigos fueron:

- a) Espermatozoides con yoduro de propidio
- b) Espermatozoides con yoduro de propidio y Estravidina

Finalmente los espermatozoides se analizaron por citometría de flujo. Se utilizaron histogramas para determinar la intensidad de fluorescencia de los marcadores.

Los tratamientos antes mencionados también se realizaron antes de la inoculación para tener un testigo.

#### **f) Microscopía electrónica (72, 73, 74)**

Se procesaron 15 muestras de los eyaculados de los cinco sementales antes de la inoculación dichas muestras sirvieron como controles previos y después de la inoculación se utilizaron 18 muestras por cada cerdo.

Las muestras procesadas para microscopía electrónica fueron espermatozoides. Estos fueron lavados 3 veces con PBS. Después se fijaron con glutaraldehído (Electron Microscopy Sciences) al 3% durante una hora. Enseguida se centrifugaron y las pastillas fueron suspendidas en un buffer de cacodilatos (SIGMA) ( $C_2H_7AsO_2$ ) 0.1 M pH 7.6, filtrado y se lavaron (5 veces) por centrifugación-resuspensión a 1000 rpm por 10 minutos. Se realizó una postfijación con tetraóxido de osmio (Electron Microscopy Sciences) ( $OsO_4$ ) al 1% en cacodilatos durante una hora (en campana de extracción). Las muestras se lavaron 5 veces con cacodilatos (el cacodilato y el tetraóxido de osmio se desecharon en un frasco especial para residuos tóxicos). Enseguida, las muestras se deshidrataron con alcohol etílico (MERCK) en concentraciones crecientes graduadas, se filtró en filtros millipore de 0.45  $\mu m$ , al 50, 60, 70, 80, 90, 96% y tres pasos de alcohol al 100%; el tratamiento, en cada paso fue hecho durante 7 minutos, excepto el de 100% que fue de 12 minutos. Después se utilizó el óxido de propileno (Ted Pella, INC) dos tratamientos de 10 minutos cada uno. En cada cambio de alcohol fue importante resuspender la pastilla cada vez y centrifugar para asegurar una buena deshidratación.

Las muestras deshidratadas se incubaron a temperatura ambiente, en las siguientes mezclas de resina recién preparada: a) resina (Electron Microscopy Sciences)-óxido de propileno (1:2), durante una hora; b) resina-óxido de propileno (1:1) durante 24 horas.

Las muestras infiltradas se incubaron con resina sin diluir durante una hora a 60°C. Posterior a ese tiempo se hizo un cambio por resina nueva por una hora a 60°C. Enseguida las muestras se colocaron en cápsulas de polietileno, donde previamente se colocó resina en el fondo de ellas, e inmediatamente se completó el llenado de las cápsulas con más resina y se continuó la polimerización de la muestra incluida en resina a 60°C por 25 h.

De las muestras incluidas en la resina se realizaron dos tipos de cortes con el ultramicrotomo. El primero de ellos fue un corte semi-fino, el cual fue teñido con azul de toluidina (MERCK) al 1%. Una vez seleccionados, se obtuvieron cortes finos, se montaron en rejillas de cobre de 200 mesh, se tiñeron con acetato de uranilo (MERCK) y citrato de plomo (MERCK) y finalmente se observaron en un microscopio electrónico de transmisión Carl Zeiss 900.

#### **g) Necropsia**

Se realizó la necropsia de los animales a los 65 días después de la inoculación. Se llevó a cabo la revisión general de todos los órganos. Se tomaron muestras de los testículos y epidídimos. Estas muestras se procesaron para histología.

#### **h) Histopatología**

Los testículos y epidídimos fueron fijados con formalina (Q.P.) al 10%, amortiguada con fosfatos. Posteriormente se procesaron para el estudio histológico, mediante la técnica rutinaria de inclusión en parafina. Se realizaron cortes de 5µm de espesor y los tejidos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina.

#### **Modelo Estadístico**

Se realizó una estadística descriptiva de cada variable de interés.

Se utilizó un modelo de regresión que incluyó el efecto lineal, cuadrático y cúbico del día postinoculación.

Modelo de Regresión (75, 76):

$$Y_i = B_0 + B_1X_i + B_2X_i^2 + B_3X_i^3 + E_i$$

$Y_i$  = Variable de respuesta (dependiente)

$B_0$  = Intercepto

$B_1$  = Coeficiente de regresión asociado al efecto lineal de días

$B_2$  = Coeficiente de regresión asociado al efecto cuadrático de días

$B_3$  = Coeficiente de regresión asociado al efecto cúbico de días

$E_i$  = Error aleatorio

Las variables que corresponden a porcentajes se transformaron a raíz cuadrada (% + 0.5):

- Anormalidades espermáticas
- Espermatozoides muertos
- Daño acrosomal
- Espermatozoides positivos al virus
- Receptores para el virus en los espermatozoides

Los títulos de anticuerpos en los sementales, se transformaron a logaritmo base 2 (log 2) para realizar las medias aritméticas.

## RESULTADOS

### Caracterización del virus

#### Efecto citopático

A partir del encéfalo del lechón, se obtuvo un macerado y el sobrenadante se filtró en forma estéril para finalmente inocular monoestratos celulares de células Vero y PK15. Se observó desprendimiento de células a partir del segundo día, en ambos monoestratos celulares y fue más abundante en las células PK15. Los sincitios fueron evidentes en las células Vero a partir del tercer día. El efecto fue completo al quinto y sexto días, respectivamente. El título que se obtuvo en cultivo celular fue de  $10^{5.25}$  TCID/ml para el virus aislado en las células PK15 y de  $10^{3.73}$  TCID/ml en las células Vero.

#### Hemaglutinación

Se inocularon tres monoestratos de PK15 y se congelaron a las 48, 72 y 96 horas de infección, después se titularon los sobrenadantes con eritrocitos de ave, cobayo y bovino. Del sobrenadante con los eritrocitos de ave se obtuvo un título hemaglutinante (UHA) de 128; con los eritrocitos de cobayo de 64 UHA y con los de bovino de 16 UHA. Estos títulos fueron similares a las 48 y 72 horas. Para corroborar si esta aglutinación era específica por (RVP), los sobrenadantes fueron utilizados en una prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) diluidos a 8 UHA y confrontados con sueros testigos positivos (título 1:128) y negativos. Se observó que el título del suero positivo se conservó y en el suero negativo no se identificaron anticuerpos.

#### Hemadsorción

Se prepararon 3 placas con monocapas de cultivos celulares (PK15), en la primera la hemadsorción ocurrió a las 72 h, en la segunda también hubo hemadsorción pero a las 96 h, la tercera placa se fijó con metanol cristal violeta a los 6 días de infección. El título obtenido por hemadsorción fue de  $10^{5.25}$  TCID/ml para las 2 primeras placas y de  $10^{5.37}$  TCID/ml para la última.

### Inmunofluorescencia

Se pudo observar fluorescencia en los monoestratos (PK15) que fueron inoculados con el aislamiento viral. Lo anterior muestra una reacción de identidad viral entre este aislamiento y los realizados en años anteriores. Se observaron marcas fluorescentes concentradas en ciertas zonas del citoplasma celular que corresponden a cúmulos del antígeno viral.

### Purificación viral

A través del perfil electroforético se determinaron las 6 proteínas que constituyen al virus: Hemaglutinina-neuraminidasa HN (65 KDa), fosfoproteína P (52 KDa), nucleoproteína NP (68 KDa), proteína L (200 KDa), proteína M (40 KDa), y la proteína de fusión F (59 KDa). Estos resultados son similares a los patrones electroforéticos del aislamiento LPM (29).

### **Signos clínicos**

Los sementales A, B y C presentaron fiebre (40-41°C) al segundo día postinoculación. Durante la segunda semana después de la inoculación tres de los sementales (A, D y E) presentaron constipación y dos de los sementales presentaron conjuntivitis (B y C). Después de este periodo hasta el sacrificio no hubo ninguna alteración en su comportamiento ni en la libido.

### **Medición de las dimensiones testiculares**

En los cinco sementales se realizó la medición de los testículos antes y durante el tiempo que duró la fase experimental y se obtuvieron los siguientes resultados:

En el semental A, el aumento en el tamaño de los dos testículos se inició a partir del día 11 postinoculación y continuó hasta el día 37. Después de este día ambos testículos empezaron a disminuir de tamaño (Cuadro 1.a). Las diferencias de las dimensiones testiculares obtenidas antes y después de la inoculación fueron las siguientes: La diferencia de longitud del testículo derecho fue de +3.1 cm y del diámetro de +1.3 cm. Del testículo izquierdo la diferencia de longitud fue de +4.16 cm y del diámetro de +2.11 cm. Hasta el día del sacrificio ninguno de los dos testículos regresaron a su tamaño original (Cuadro 2 a y b).

El semental B, también tuvo un cambio en las dimensiones testiculares igual al semental A (Cuadro 1.b). La diferencia que se presentó en la longitud del testículo derecho fue de +2.9 cm y del diámetro de +2.11 cm. Del testículo izquierdo la diferencia de longitud fue de +3.73 cm y del diámetro de +2.22 cm (Cuadro 2 a y b).

En el semental C, el aumento de tamaño de ambos testículos también se inició en el día 11 postinfección, pero la disminución de las dimensiones se inició hasta el día 44 (Cuadro 1.c). Al comparar el tamaño testicular antes y después de la inoculación se obtuvo lo siguiente: La diferencia de longitud del testículo derecho fue de +5.36 cm y en el diámetro fue de +2.73 cm. En el testículo izquierdo la diferencia de longitud fue de +4.48 cm y del diámetro de +2.71 cm (Cuadro 2 a y b). Este semental fue el que tuvo un cambio mayor en las dimensiones testiculares. Al día del sacrificio sus testículos eran más pequeños al compararlos con sus dimensiones obtenidas antes de la inoculación. En el testículo derecho la diferencia de longitud fue de -2.75 cm y del diámetro de -1.07 cm. En el testículo izquierdo la diferencia de longitud y del diámetro fue de -2.68 cm y -0.63 respectivamente.

En el semental D, el aumento en el tamaño de ambos testículos se inició en el día 11 postinoculación y continuó hasta el día 46. Después de este día los dos testículos empezaron a disminuir de tamaño (Cuadro 1.d). También se compararon sus dimensiones testiculares antes y después de la infección y se obtuvo lo siguiente: En el testículo derecho la diferencia de longitud fue de +3.01 cm y del diámetro de +2.22 cm. Respecto al testículo izquierdo la diferencia de longitud fue de +2.3 cm y del diámetro de +3.6 cm (Cuadro 2 a y b). Al día de sacrificio la longitud de ambos testículos era menor a la obtenida antes de la infección experimental. En el testículo derecho la diferencia de longitud fue de -0.87 cm y en el testículo izquierdo la diferencia de longitud fue de -1.75.

En el semental E, el aumento en las dimensiones testiculares se inició a partir del día 16 hasta el día 46. Después de este día ambos testículos empezaron a disminuir de tamaño (Cuadro 1.e). Igual que en los sementales anteriores se obtuvieron las diferencias que se presentaron antes y después del trabajo experimental, observando lo siguiente: En el testículo derecho la diferencia de longitud fue de +3.72 cm y del diámetro de +1.86 cm. Del testículo izquierdo la diferencia de longitud fue de +3.23 cm y del diámetro de +0.86 cm

(Cuadro 2 a y b). Al día de sacrificio el tamaño del testículo izquierdo era menor al obtenido antes de la inoculación. La diferencia de longitud de este testículo fue de -2.93 cm.

A partir del día 12 postinoculación los sementales C, D y E presentaron un aumento de tamaño en la cabeza del epidídimo, con una consistencia muy firme.

Existió diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) al comparar los resultados de las dimensiones testiculares de los cinco sementales, antes y después de la inoculación del virus (Figura a.1 y a.2).

**Cuadro 1. a) Dimensiones testiculares del semental "A" antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura A).**

SEMENTAL A DÍA POSTINOCULACIÓN	test der.		test izq.	
	longitud (cm)	diámetro (cm)	longitud (cm)	diámetro (cm)
-30	16	7.93	15	8
-15	16	7.93	15	8
-5	16	7.93	15	8
0	16	7.93	15	8
2	16	8	15	8
4	16	8	15	8
9	16	8	15	8
11	18	9	16	10
16	18	9	16	10
18	21	9	18	10
23	23	10	23	11
25	23	10	23	11
30	22	10	22	11
32	22	10	22	11
37	20	10	21	11
39	20	10	21	11
44	20	10	21	11
46	19	9	20	10
51	19	9	20	10
53	19	9	20	10
58	19	9	20	10
65 (DÍA DE SACRIFICIO)	16	10.5	17	11



**Cuadro 1. b) Dimensiones testiculares del semental "B" antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura B).**

<b>SEMENTAL B</b>	test.der.		test. izq.	
	longitud (cm)	diámetro (cm)	longitud (cm)	diámetro(cm)
-30	16.93	8	16.93	8
-15	16.93	8	16.93	8
-5	16.93	8	16.93	8
0	16.93	8	16.93	8
2	17	8	17	8
4	17	8	17	8
9	17	8	17	8
<b>11</b>	20	10	21	10
16	20	10	21	11
18	24	12	25	12
23	24	12	25	12
25	22	11	21	10
30	22	11	21	10
32	22	11	21	10
<b>37</b>	20	10	22	11
39	20	10	22	11
44	19	10	22	11
46	19	10	21	11
51	19	10	21	10
53	19	10	21	10
58	19	10	20	10
<b>65 (DÍA DE SACRIFICIO)</b>	17	11	17	11

**Cuadro 1. c) Dimensiones testiculares del semental "C" antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura C).**

SEMENTAL C DÍA POSTINOCULACIÓN	test der.		test izq.	
	longitud (cm)	diámetro (cm)	longitud (cm)	diámetro (cm)
-30	18.75	9.93	19.68	10.87
-15	18.75	9.93	19.68	10.87
-5	18.75	9.93	19.68	10.87
0	18.75	9.93	19.68	10.87
2	19	10	20	11
4	19	10	20	11
9	19	10	20	11
11	28	12	26	13
16	28	12	26	13
18	28	15	29	16
23	27	15	29	16
25	27	16	28	16
30	28	16	26	15
32	28	16	26	15
37	26	15	24	15
39	26	13	24	14
44	24	12	25	14
46	24	12	25	14
51	23	11	24	13
53	23	11	24	13
58	21	11	22	13
65 (DÍA DE SACRIFICIO)	16	11	17	11.5

**Cuadro 1. d) Dimensiones testiculares del semental "D" antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura D).**

<b>SEMENTAL D</b>	test der.		test izq.	
	longitud (cm)	diámetro (cm)	longitud (cm)	diámetro (cm)
DÍA POSTINOCULACIÓN				
-30	17.87	9	18.75	9.81
-15	17.87	9	18.75	9.81
-5	17.87	9	18.75	9.81
0	17.87	9	18.75	9.81
2	18	9	19	10
4	18	9	19	10
9	18	9	19	10
11	20	11	19	12
16	20	11	19	12
18	20	11	19	15
23	20	11	19	15
25	23	15	23	15
30	23	15	23	15
32	23	15	23	15
37	23	15	23	15
39	24	10	24	16
44	24	10	24	16
46	22	10	22	16
51	22	10	22	16
53	22	10	24	10
58	19	10	21	11
65 (DÍA DE SACRIFICIO)	17	11	17	12.5

**Cuadro 1. e) Dimensiones testiculares del semental "E" antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura E).**

<b>SEMENTAL E</b> DÍA POSTINOCULACIÓN	test der.		test izq.	
	longitud (cm)	diámetro (cm)	longitud (cm)	diámetro (cm)
-30	18	9.8	18.93	10.75
-15	18	9.8	18.93	10.75
-5	18	9.8	18.93	10.75
0	18	9.8	18.93	10.75
2	18	10	19	11
4	18	10	19	11
9	18	10	19	11
11	18	12	21	11
16	22	12	21	11
18	22	12	21	11
23	23	13	24	12
25	23	13	24	12
30	25	12	24	13
32	25	12	24	13
37	25	12	27	13
39	24	11	27	12
44	24	11	25	12
46	22	12	25	11
51	22	12	24	12
53	22	12	21	11
58	20	12	18	11
65 (DÍA DE SACRIFICIO)	20	12	16	11

**Cuadro 2. a) Promedio de las dimensiones testiculares de verracos antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura F).**

Testículo derecho	Longitud (cm)			Diámetro (cm)		
	A	D	Diferencia (cm)	A	D	Diferencia (cm)
Semental						
*A	16	19.1	3.1	7.93	9.23	1.3
*B	16.93	19.83	2.9	8	10.11	2.11
*C	18.75	24.11	5.36	9.93	12.66	2.73
*D	17.87	20.88	3.01	9	11.22	2.22
*E	18	21.72	3.72	9.8	11.66	1.86

Valor promedio

A= antes de la inoculación del virus

D= después de la inoculación del virus

\* = existió diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ )

**Cuadro 2. b) Promedio de las dimensiones testiculares de verracos antes y después de la inoculación experimental del virus de la Enfermedad del Ojo Azul (Figura G).**

Testículo izquierdo	Longitud (cm)			Diámetro (cm)		
	A	D	Diferencia (cm)	A	D	Diferencia (cm)
Semental						
*A	15	19.16	4.16	8	10.11	2.11
*B	16.93	20.66	3.73	8	10.22	2.22
*C	19.68	24.16	4.48	10.87	13.58	2.71
*D	18.75	21.05	2.3	9.81	13.41	3.6
*E	18.93	22.16	3.23	10.75	11.61	0.86

Valor promedio

A= antes de la inoculación del virus

D= después de la inoculación del virus

\* = existió diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ )

**Cuadro 2. a) Promedio de las dimensiones testiculares de verracos antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura F).**

Testículo derecho	Longitud (cm)			Diámetro (cm)		
	A	D	Diferencia (cm)	A	D	Diferencia (cm)
Semental						
*A	16	19.1	3.1	7.93	9.23	1.3
*B	16.93	19.83	2.9	8	10.11	2.11
*C	18.75	24.11	5.36	9.93	12.66	2.73
*D	17.87	20.88	3.01	9	11.22	2.22
*E	18	21.72	3.72	9.8	11.66	1.86

Valor promedio

A= antes de la inoculación del virus

D= después de la inoculación del virus

\* = existió diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ )

**Cuadro 2. b) Promedio de las dimensiones testiculares de verracos antes y después de la inoculación experimental del virus de la Enfermedad del Ojo Azul (Figura G).**

Testículo izquierdo	Longitud (cm)			Diámetro (cm)		
	A	D	Diferencia (cm)	A	D	Diferencia (cm)
Semental						
*A	15	19.16	4.16	8	10.11	2.11
*B	16.93	20.66	3.73	8	10.22	2.22
*C	19.68	24.16	4.48	10.87	13.58	2.71
*D	18.75	21.05	2.3	9.81	13.41	3.6
*E	18.93	22.16	3.23	10.75	11.61	0.86

Valor promedio

A= antes de la inoculación del virus

D= después de la inoculación del virus

\* = existió diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ )

Semental D. El volumen disminuyó del día 18 al día 32 postinfección de 212 a 123 ml, después de este día aumentó a 275 ml manteniéndose constante (Figura K). Se obtuvo una diferencia de -19.49 ml al comparar los promedios expresados antes y después de la inoculación del virus. Este resultado no tuvo diferencia significativa ( $p>0.05$ ) (Cuadro 3).

Semental E. El volumen bajó del día 16 al 25 postinoculación de 247 a 192 ml, al día 30 aumentó a 268 ml y se mantuvo constante hasta el final del trabajo experimental (Figura L). Se obtuvo una diferencia de -30.17 ml al comparar sus promedios calculados antes y después de la infección experimental. Este resultado no mostró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) (Cuadro 3).

### Características microscópicas

#### 1) Motilidad espermática:

Semental A. A partir del día 37 al día 44 postinoculación, la motilidad se redujo del 87.87 al 60%, después de este periodo se alcanzó un 78.24% y se mantuvo constante así hasta el final de la fase experimental (Figura M). Se obtuvo una diferencia de -9.63% al comparar sus promedios calculados antes y después de la infección experimental. Este resultado tuvo una diferencia altamente significativa ( $p<0.0001$ )(Cuadro 3).

Semental B. A partir del día 46 postinfección, la motilidad bajó del 88.02 al 78.82% y se mantuvo así hasta el final del experimento (Figura N). Se obtuvo una diferencia de -9.2% al comparar su promedio obtenido antes y después de la inoculación del virus. Este resultado tuvo una diferencia altamente significativa ( $p<0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental C. A partir del día 23 la motilidad bajó drásticamente del 88.12 al 38.82% hasta el final del trabajo experimental (Figura O). Se obtuvo una diferencia de -49.3% al comparar su promedio expresado antes y después de la inoculación. Este resultado indicó una diferencia altamente significativa ( $p<0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental D. A partir del día 30 la motilidad disminuyó del 88.61 al 72.94% y se mantuvo hasta el final del experimento (Figura P). Se obtuvo una diferencia de -15.67% al comparar los promedios obtenidos antes y después de la inoculación del

virus. Este resultado mostró una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental E. Este animal tuvo un cambio en la motilidad igual al semental D (Figura Q). Se obtuvo una diferencia de -10.03% al comparar sus promedios calculados antes y después de la infección experimental. Este resultado tuvo una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

## 2) Concentración espermática:

Semental A. La concentración espermática en este animal disminuyó solamente en el día 18 postinfección de  $320$  a  $240 \times 10^6$  de espermatozoides/ml, después de este día la concentración se mantuvo constante hasta el final del experimento con un promedio de  $281.47 \times 10^6$  de espermatozoides/ml (Figura R). Al comparar sus promedios obtenidos antes y después de la inoculación se obtuvo solamente una diferencia de  $-0.125 \times 10^6$  de espermatozoides/ml. Aunque este animal fue el que tuvo la menor disminución en la concentración espermática, sus resultados comparados de antes y después de la inoculación, mostraron una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental B. A partir del día 23 hasta el día 25, la concentración bajó drásticamente de  $205$  a  $110 \times 10^6$  de espermatozoides/ml, después del día 30 aumentó y se mantuvo constante hasta el final del trabajo experimental con un promedio de  $267.941 \times 10^6$  de espermatozoides/ml (Figura S). Al comparar sus promedios calculados antes y después de la infección se obtuvo una diferencia de  $-32.788 \times 10^6$  de espermatozoides/ml. Este resultado indicó una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental C. En este animal la concentración bajo de manera drástica de  $310$  a  $95 \times 10^6$  de espermatozoides/ml durante los días 18 y 23 postinfección. Después en el día 25 aumentó a  $195 \times 10^6$  y se mantuvo dicha concentración hasta el día 32, donde se obtuvo una concentración de  $115 \times 10^6$ , después de este día la concentración aumento con un promedio de  $226.176 \times 10^6$  manteniéndose constante pero sin recuperar el promedio obtenido antes de la infección (Figura T). La diferencia que se obtuvo al comparar el promedio calculado antes y después de la inoculación fue de  $-87.678 \times 10^6$  de



espermatozoides/ml. Este resultado mostró una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental D. La concentración espermática descendió en el día 16 postinoculación de  $360$  a  $260 \times 10^6$  de espermatozoides/ml manteniéndose constante hasta el final del experimento con un promedio de  $305 \times 10^6$  de espermatozoides/ml (Figura U). La diferencia calculada de los promedios obtenidos antes y después de la infección fue de  $-3.645 \times 10^6$  de espermatozoides/ml. Este resultado tuvo una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental E. En este cerdo la concentración empezó a disminuir en el día 44 postinfección de  $300$  a  $270 \times 10^6$  de espermatozoides/ml, manteniéndose constante hasta el final del trabajo experimental con un promedio de  $303.823 \times 10^6$  (Figura V). La diferencia obtenida de sus promedios antes y después de la inoculación fue de  $-3.808 \times 10^6$  de espermatozoides/ml. Este resultado mostró una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

### 3) Anormalidades Espermáticas:

Semental A. A partir del día 23 postinfección el porcentaje de anormalidades aumentó del 12.8 al 24.82% manteniéndose alto hasta el final del experimento (Figura W). Al comparar los promedios obtenidos antes y después del desafío se obtuvo una diferencia en el porcentaje de anormalidades de +12.02%. Este resultado tuvo una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental B. A partir del día 18 postinoculación aumentó la presencia de anormalidades espermáticas del 13.6 al 23%, elevándose aún más en los siguientes días de la infección hasta el final de la misma con un promedio de 26.58% (Figura X). La diferencia que se calculó después de comparar el promedio antes y después de la inoculación fue de +12.98%. Este resultado mostró una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

Semental C. A partir del día 23 postinfección el porcentaje de anormalidades se disparó del 13 al 32% llegando a un 100%. En el día 44 empezó a disminuir muy levemente este porcentaje obteniendo un promedio de 60.55% (Figura Y). Al comparar los

promedios expresados antes y después de la inoculación se calculó la diferencia de este porcentaje, la cual fue de +48.1%. Este porcentaje obtenido tuvo una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

**Semental D.** A partir del día 32 postinoculación el porcentaje de anomalías aumentó de 13 a 33.64% manteniéndose este porcentaje hasta el final de la fase experimental (Figura Z). En este animal la diferencia de sus promedios antes y después del desafío fue de +20.14%. Este resultado indicó una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

**Semental E.** A partir del día 37 postinfección aumentó el porcentaje de anomalías de 15 a 38% también este se mantuvo alto hasta el final del experimento con un promedio de 23.94% (Figura ZZ). Al comparar sus promedios antes y después de la inoculación se obtuvo una diferencia de +9.63%. Este resultado mostró una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Promedios de las espermotobioscopias de los cinco sementales antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino.**

SEMENTAL	Periodo	Volumen(ml)	Motilidad (%)	Concentración ( $1 \times 10^6$ /ml)	Anormalidades (%)
A	A*	278.32	87.87	281.595	12.8
	D**	265.47	78.24	281.47	24.82
	Dif.***	-12.85	-9.63	-0.125	+12.02
B	A	314.72	88.02	300.729	13.6
	D	325.7	78.82	267.941	26.58
	Dif.	+10.98	-9.2	-32.788	+12.98
C	A	287.08	88.12	313.854	12.45
	D	236.11	38.82	226.176	60.55
	Dif.	-50.97	-49.3	-87.678	+48.1
D	A	258.31	88.61	308.645	13.5
	D	238.82	72.94	305	33.64
	Dif.	-19.49	-15.67	-3.645	+20.14
E	A	274.34	87.97	307.631	14.31
	D	244.17	77.94	303.823	23.94
	Dif.	-30.17	-10.03	-3.808	+9.63

\* A= antes de la inoculación del virus (40 eyaculados/semental)

\*\* D= después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semental)

\*\*\*Dif= diferencia del antes y después

**Cuadro 4. Características seminales de los cinco verracos antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura 1, 2, 3 y 4).**

Características seminales	A**	D***	Diferencia
Volumen (ml)	282.55 ± 20.78	262.05 ± 37.40	- 20.5
*Motilidad (%)	88.11 ± 0.28	69.35 ± 17.22	- 18.76
*Concentración (1x10 <sup>6</sup> )	302.49 ± 11.42	276.88 ± 32.36	- 25.61
*Anormalidades (%)	13.31 ± 0.87	33.91 ± 15.37	20.6

Valor promedio ± desv.estándar

\*\*A= antes de la inoculación del virus (40 eyaculados/semental)

\*\*\*D= después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semental)

\* = existió diferencia altamente significativa (p<0.0001)

#### 4) Tipo de anomalías espermáticas:

##### Anormalidades primarias (Cuadro 5).

Las anomalías primarias que se presentaron en los espermatozoides después de la inoculación experimental del virus fueron las siguientes:

- Cabeza piriforme. Se presentó a partir del día 25 postinfección en 1.7% manteniéndose constante este porcentaje hasta el final del experimento (Figura 5).
- Cabeza achatada. Se presentó a partir del día 39 postinoculación en 1.41% manteniéndose constante este porcentaje hasta el final del trabajo experimental (Figura 5).
- Microcabezas. Se presentaron a partir del día 23 postinfección en 4.0% también este porcentaje se mantuvo hasta el final del experimento (Figura 5).
- Macrocabezas. Se presentaron 30 días después del desafío en 1.82% este porcentaje se mantuvo hasta el final del desafío (Figura 5).
- Dos flagelos. Se presentaron a partir del día 44 postinoculación en 1.94%, dicho porcentaje se mantuvo hasta el final de la fase experimental (Figura 5).

Al comparar los resultados obtenidos de este tipo de anomalías, antes y después de la inoculación del virus se encontró una diferencia altamente significativa (p<0.0001).

### Anormalidades secundarias (Cuadro 5).

Las anomalías secundarias se dispararon después del desafío con el virus:

- Gota citoplasmática proximal. A partir del día 30 postinfección aumentó su presencia de 4.71 a 12.89% manteniéndose alto este porcentaje hasta el final del experimento (Figura 6).
- Gota citoplasmática distal. A partir del día 37 postinoculación aumentó el porcentaje de esta anomalía de 4.49 a 12.64% también se mantuvo alto dicho porcentaje hasta el final del trabajo experimental (Figura 6).
- Flagelo doblado en forma de L. A partir del día 39 postdesafío aumentó su porcentaje de 2.51 a 5.55%, manteniéndose éste alto hasta el final de la fase experimental (Figura 6).
- Flagelo látigo. A partir del día 37 postinfección se elevó su porcentaje de 1.01 a 4.24% esto se mantuvo hasta el final del experimento (Figura 7).
- Flagelo ovrillo. A partir del día 37 postinoculación se disparó su porcentaje de 0.47 a 5.01%, también se mantuvo alto dicho porcentaje hasta el final del trabajo experimental (Figura 7).
- Cabeza suelta. A partir del día 37 postdesafío se elevó de manera drástica su porcentaje de 0.12 a 9.79% esto se mantuvo alto hasta el final del experimento (Figura 7).
- Cabeza doble. A partir del día 45 postinfección se presentó esta anomalía en 1.5% y se mantuvo hasta el final de la fase experimental (Figura 7).

También se encontró una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) al comparar los resultados de anomalías espermáticas secundarias antes y después de la inoculación del virus.

**Cuadro 5. Promedio de los tipos de anomalías espermáticas de los cinco verracos identificadas antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino (Figura 8).**

<i>NORMALIDADES PRIMARIAS</i>	<b>A*</b> <b>(%)</b>	<b>D**</b> <b>(%)</b>	<b>Diferencia (%)</b>
Cabeza piriforme	0	1.70	1.70
Cabeza achatada	0	1.41	1.41
Microcabeza	0	4.00	4.00
Macrocabeza	0	1.82	1.82
Dos flagelos	0	1.94	1.94
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>10.87</b>	<b>10.87</b>
<i>ANORMALIDADES SECUNDARIAS</i>			
Gota citoplasmática proximal	4.71	12.89	8.18
Gota citoplasmática distal	4.49	12.64	8.15
Flagelo doblado en forma de L	2.51	5.55	3.04
Flagelo látigo	1.01	4.24	3.23
Flagelo oவில்	0.47	5.01	4.54
Cabeza suelta	0.12	9.79	9.67
Cabeza doble	0	1.5	1.5
<b>Total</b>	<b>13.31</b>	<b>51.62</b>	<b>38.31</b>

Valor promedio

\* A= antes de inoculación del virus (40 eyaculados/semental)

\*\*D= después de inoculación del virus (18 eyaculados/semental)

### Serología

En los sueros analizados, se detectó la presencia de anticuerpos a partir del día 9 postinoculación con títulos bajos a través de la técnica IHA. Los niveles de anticuerpos se mantuvieron altos después del día 16 (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Resultados de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación con los sueros de los cinco verracos inoculados experimentalmente con el rubulavirus porcino.**

<b>Día PI</b>	<b>N</b>	<b>Título IHA</b>
-15	5	0
0	5	0
2	5	0
4	5	0
9	5	4.66 ± 0.57
16	5	6.66 ± 0.57
23	5	5 ± 1.41
31	5	6.5 ± 2.12
46	5	6.66 ± 0.57
56	5	7.25 ± 1.25
60	5	7.5 ± 0.70
64	5	7.6 ± 1.14

PI= día postinoculación

N= número de muestras

Valor promedio ± desv. estándar

Los resultados están transformados a Log base 2

### **Citometría de flujo**

#### **Viabilidad espermática**

##### Espermatozoides muertos

Se realizó la evaluación del porcentaje de espermatozoides muertos antes y después de la inoculación del virus con la utilización de la tinción Eosina-Nigrosina y del ioduro de propidio, a través de la citometría de flujo, obteniendo los siguientes resultados:

Semental A. Desde el día 25 hasta el final del experimento se mantuvo elevado el porcentaje de espermatozoides muertos (Figura 9). Dicho porcentaje aumentó de 10.55 a 18.81% (Cuadro 7).

Semental B. A partir del día 37 hasta el final del trabajo experimental, también se mantuvo alto el porcentaje de espermatozoides muertos (Figura 10). Se elevó de 10.81 a 23.49% (Cuadro 7).

Semental C. A partir del día 23 hasta el final de la fase experimental se elevó drásticamente el porcentaje de espermatozoides muertos (Figura 11) de 11.27 a 61% (Cuadro 7).

Semental D. A partir del día 30 hasta el final del experimento aumentó el porcentaje de espermatozoides muertos (Figura 12) de 9.06 a 26.35% (Cuadro 7).

Semental E. A partir del día 32 hasta el final del trabajo experimental también se mantuvo alto el porcentaje de espermatozoides muertos (Figura 13) de 10.67 a 23.88% (Cuadro 7).

Al comparar los resultados del porcentaje de espermatozoides muertos de los cinco sementales, antes y después de la inoculación del virus se obtuvo una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

**Cuadro 7. Promedio de espermatozoides muertos de los cinco sementales antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino.**

SEMENTAL	Periodo	Media (%)	Desv.estándar	C.variación
*A	A	10.55	1.42	13.45
	D	18.81	8.06	42.84
	Dif.	<b>+8.26</b>		
*B	A	10.81	1.7	15.72
	D	23.49	13.84	58.91
	Dif.	<b>+12.68</b>		
*C	A	11.27	1.6	14.19
	D	61	38.87	63.72
	Dif.	<b>+49.73</b>		
*D	A	9.06	1.3	14.34
	D	26.35	9.59	36.39
	Dif.	<b>+17.29</b>		
*E	A	10.67	1.55	14.52
	D	23.88	10.8	45.22
	Dif.	<b>+13.21</b>		

A= antes de la inoculación (40 eyaculados/seminal)

D= después de la inoculación (18 eyaculados/seminal)

Dif= diferencia de antes y después de la inoculación

\* = existió diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ )

**Cuadro 8. Porcentaje de Espermatozoides muertos antes y después de la inoculación experimental de los cinco verracos con el rubulavirus porcino (Figura 14).**

Espermatozoides muertos (%)	A	D	Diferencia
Media	10.47	31.15	20.68
Desv.estándar	0.83	16.78	15.95
C.variación	7.92	53.86	45.94

A= antes de inocular el virus (40 eyaculados/seminal)

D= después de inocular el virus (18 eyaculados/seminal)

#### Daño acrosomal

A través de la lectina PNA se identificó el daño acrosomal, por citometría de flujo, antes y después de la inoculación, los resultados obtenidos son los siguientes:



Semental A. El daño acrosomal aumentó a partir del día 32 postinoculación y se mantuvo alto hasta el final del experimento (Figura 15 a y b). Se obtuvo un aumento del 4.71% de daño en espermatozoides vivos y del 26.26% en muertos (Cuadro 9).

Semental B. El daño acrosomal se elevó a partir del día 39 postinfección y se mantuvo alto hasta el final de la fase experimental (Figura 16 a y b). Se obtuvo un incremento del 13.28% de daño en espermatozoides vivos y del 7.74% en muertos (Cuadro 9).

Semental C. El aumento en el porcentaje de daño acrosomal se vio reflejado a partir del día 44 postinoculación hasta el final del experimento (Figura 17 a y b). Se elevó del 7.75 al 20.18% el daño en espermatozoides vivos y del 12.82 al 31.45% en muertos (Cuadro 9).

Semental D. El aumento del daño acrosomal se observó a partir del día 32 postinfección hasta el final del experimento (Figura 18 a y b). Este aumento fue del 8.97% en espermatozoides vivos y del 15.87% en muertos (Cuadro 9).

Semental E. Este animal también presentó un aumento en el daño acrosomal a partir del día 32 postinoculación hasta el final de la fase experimental (Figura 19 a y b). Este daño aumentó de 9.6 a 19.21% en espermatozoides vivos y de 10.68 a 26.54% en muertos (Cuadro 9).

Al comparar los promedios obtenidos del daño acrosomal de los cinco cerdos, antes y después de la infección experimental se obtuvo una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

**Cuadro 9. Promedio del daño acrosomal en espermatozoides vivos y muertos antes y después de la inoculación experimental con el rubulavirus porcino.**

SEMENTAL	periodo	Vivos	Muertos
*A	A	5.5	11.24
	D	10.21	37.5
	Dif	<b>+4.71</b>	<b>+26.26</b>
*B	A	9	13.32
	D	22.28	21.06
	Dif	<b>+13.28</b>	<b>+7.74</b>
*C	A	7.75	12.82
	D	20.18	31.45
	Dif	<b>+12.43</b>	<b>+18.63</b>
*D	A	10	11.34
	D	18.97	27.21
	Dif	<b>+8.97</b>	<b>+15.87</b>
*E	A	9.6	10.68
	D	19.21	26.54
	Dif	<b>+9.61</b>	<b>+15.86</b>

A= antes de la inoculación (40 eyaculados)

D= después de la inoculación (18 eyaculados)

Dif= diferencia de antes y después de la inoculación

\* = existió diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ )

**Cuadro 10. Daño acrosomal antes y después de inocular experimentalmente a los cinco verracos con el rubulavirus porcino (Figura 20).**

Daño acrosomal (%)	Estado			
		A	D	Diferencia
Media	M	11.88	28.75	16.87
Desv. estándar	M	1.12	6.12	5
C. variación	M	9.42	21.28	11.86
Media	V	8.37	18.17	13.45
Desv. estándar	V	1.81	4.63	3.18
C. variación	V	2.16	25.48	23.32

A= antes de inocular el virus (40 eyaculados/seminal)

D= después de inocular el virus (18 eyaculados/seminal)

M= espermatozoides muertos

V= espermatozoides vivos

### Detección del virus en los espermatozoides

El virus se detectó en los espermatozoides través del citómetro de flujo con la utilización de anticuerpos específicos. En los sementales C y E se detectó desde el día 9 postinfección hasta el día 39. En los sementales A, B y D desde el día 16 hasta el día 39 (Figura 21 y 22). Se obtuvo un promedio de los espermatozoides vivos y muertos positivos al virus de los cinco sementales (Cuadro 11).

**Cuadro 11. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos positivos al rubulavirus porcino.**

<b>SEMENTAL</b>	<b>ESPERMATOZOIDES VIVOS (%)</b>	<b>ESPERMATOZOIDES MUERTOS (%)</b>
Control (40 eyaculados/semantal)	0	0
A	10.83	1.71
B	11.09	1.30
C	11.41	1.77
D	11.63	1.72
E	9.6	2.07

### Detección de receptores para el virus

Con la utilización de la lectina *Maackia amurensis* (MAA) se reconocieron en los espermatozoides los receptores celulares para el virus, antes y después de la inoculación.

De los cinco sementales se obtuvieron los promedios antes y después de la infección experimental (Cuadro 12):

Antes de la inoculación los receptores fueron identificados en 2.7% y 13.7% en los espermatozoides muertos y vivos respectivamente.

Después de la inoculación los receptores se identificaron en 0.92% y 9.26% de los espermatozoides muertos y vivos respectivamente (Figura 23).

**Cuadro 12. Promedio de receptores para el rubulavirus porcino en los espermatozoides de los cinco sementales antes y después de la inoculación experimental.**

<b>DÍA POSTINOCULACIÓN</b>	<b>RECEPTORES EN VIVOS Y MUERTOS %</b>
0	13.7
2	12.91
4	12.86
9	10.43
11	9.88
16	9.6
18	10.7
23	8.3
25	8.3
30	8.01
32	7.3
37	6.9
39	7.6
44	8
46	8.4
51	9
53	9.1
58	7.6
62	7.4

### **Microscopía electrónica**

A través de la microscopía electrónica se evaluó la ultraestructura de los espermatozoides de los cinco sementales antes y después de la inoculación obteniendo los siguientes resultados:

**Figura 1.** En la electromicrografía de una sección sagital de espermatozoides, se observa la presencia de espermatozoides normales colectados del día cero hasta el día 25 postinfección. En esta imagen se aprecia la integridad de la membrana plasmática (mp) y del acrosoma (a).

**Figura 2.** En la electromicrografía de una sección sagital de espermatozoides, se observa la presencia de espermatozoides normales obtenidos del día cero hasta el día 25 postinfección.

Se aprecia la integridad de la región posacrosómica (rp), cuello (c), pieza intermedia (pi). En la sección transversal de la pieza intermedia, se observa la integridad de los dupletes de microtúbulos (mt).

**Figura 3.** En la electromicrografía de una sección transversal de la pieza intermedia, se observa la presencia de los nueve dupletes de microtúbulos (mt) y de los centrales (c). También se observa la presencia de las fibras densas (fd). Esto correspondió del día cero al día 25 postinfección.

**Figura 4.** En la electromicrografía se observa una sección longitudinal de un espermatozoide normal, del día cero al día 25 postinfección.

**Figura 5.** En la electromicrografía se observa una sección longitudinal del cuello y pieza intermedia de un espermatozoide normal del día cero al día 25 postinfección. Obsérvese la presencia de la fosa de implantación (fi), capitulum (cp), de las fibras densas (fd) y de las mitocondrias (m).

**Figura 6.** En la electromicrografía se observa una sección sagital de un espermatozoide inmaduro a partir del día 30 postinfección.

Obsérvese la presencia de una gota citoplasmática proximal (gcp). Esta alteración se observó en los cinco verracos.

**Figura 7.** En la electromicrografía se observa una sección sagital de la cabeza donde se aprecia una dilatación de la membrana plasmática (mp), gran desarrollo de la porción apical del acrosoma (a) y presencia de pequeñas vesículas intraacrosómicas dispuestas en una hilera paralela a la superficie nuclear (v). Estas alteraciones fueron observadas en los sementales B, C y D a partir del día 32 postinfección.

**Figura 8.** En la electromicrografía de una sección sagital de la cabeza se observa la pérdida del acrosma (a) y de microcabezas (mc) a partir del día 37 postinfección. Estas alteraciones se presentaron en los cinco sementales.

**Figura 9.** En la electromicrografía de una sección longitudinal del cuello se aprecia una inmadurez de las estructuras del cuello (c) y presencia de residuos de la gota citoplasmática. Estas alteraciones se observaron en los cinco verracos a partir del día 39 postinfección.

**Figura 10.** En la electromicrografía de una sección sagital de un espermatozoide inmaduro, se observa la presencia de un cuello inmaduro (c) y de una gota citoplasmática distal (gcd). Día 39 postinfección. Este tipo de alteraciones se observaron en los cinco cerdos.

**Figura 11.** En la electromicrografía de una sección sagital de un espermatozoide, se observa la presencia de dobles flagelos (f) y pérdida de los dupletes de microtúbulos (mt). Estas alteraciones se presentaron en los sementales C, D y E a partir del día 44 postinfección.

**Figura 12.** En la electromicrografía de una sección sagital de cabeza, se observa la presencia de una inclusión intranuclear (in). Esta alteración se observó en los cinco verracos a partir del día 44 postinfección.

**Figura 13.** En la electromicrografía de una sección sagital de un espermatozoide, se observa la presencia de gota citoplasmática proximal (gcp) y cabeza deforme. Esta alteración se observó en los cinco sementales a partir del día 46 postinfección.

**Figura 14.** En la electromicrografía de una sección sagital de cabeza, se observa la presencia de cabeza mal desarrollada (ca). Esta alteración se observó en los cinco cerdos a partir del día 51 postinfección.

**Figura 15.** En la electromicrografía de una sección sagital de un espermatozoide inmaduro, se observa la presencia de una protuberancia acrosómica (pt) originada por la presencia de una vacuola gigante (v) que contiene gránulos con electrodensidad variable. Estas alteraciones se observaron en los B, C, D y E a partir del día 53 postinfección.

**Figura 16.** En la electromicrografía de una sección sagital de cabeza (ca), se observa una cabeza deforme con la presencia de dos inclusiones intranucleares. Esta alteración se observó en los cinco sementales a partir del día 58 postinfección.

## **Necropsia**

En tres sementales (A, C y E) se obtuvo líquido seroso de los testículos. En los animales C y D se observó en parénquima testicular un área hemorrágica de aproximadamente 5 cm de diámetro. En los sementales B, C y D se observó en la cabeza del epidídimo un aumento de

tamaño con áreas hemorrágicas y nódulos de 0.5 a 1 cm de diámetro, con una coloración blanquecina.

### **Histopatología**

Los resultados obtenidos mostraron procesos inflamatorios y degenerativos en los testículos (Figura b.1 y b.2) y epidídimos (Figura c.1 y c.2) de los cinco sementales infectados experimentalmente.

En los verracos (C, D y E) a nivel de testículo, se observaron cambios degenerativos en las células germinativas. En los animales C y D que presentaron un área hemorrágica en el parénquima testicular se observó una degeneración en los túbulos seminíferos con infiltración multifocal de células mononucleares. En el semental A a nivel testicular se observó un leve infiltrado multifocal de linfocitos a nivel intersticial, también en las vesículas seminales se encontró una infiltración multifocal de linfocitos.

En el semental B se observó en el testículo la presencia exagerada de células intersticiales.

En los animales B, C y D a nivel de epidídimo se observaron entre leves y moderados cambios degenerativos, con vacuolización citoplásmica y pérdida parcial de estereocilios. También en el epidídimo se observaron pequeñas áreas de necrosis licuefactiva, rodeadas de macrófagos, células gigantes multinucleadas y linfocitos.

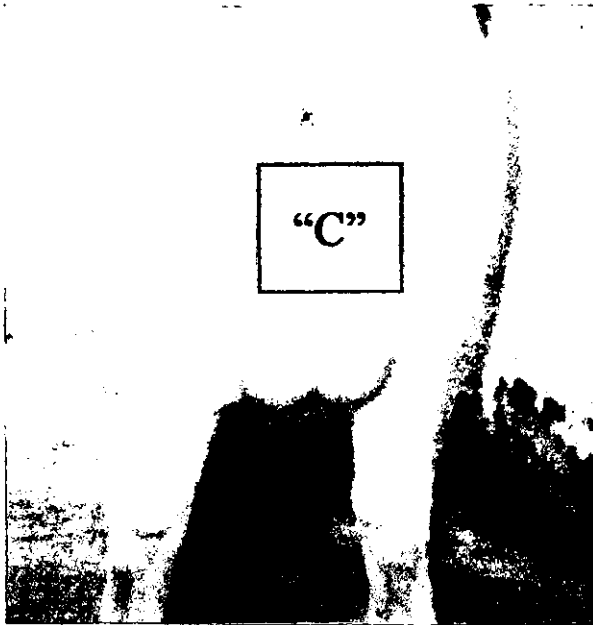


Figura a.1. Verraco inoculado con el *rubulavirus porcino*. Aislamiento PAC-3 con un día de infección. No hay cambios en el tamaño testicular.



Figura a.2. Verraco inoculado con el *rubulavirus porcino*. Aislamiento PAC-3 con 11 días de infección. El aumento de tamaño de los dos testículos corresponde a una edematización.





Figura 1

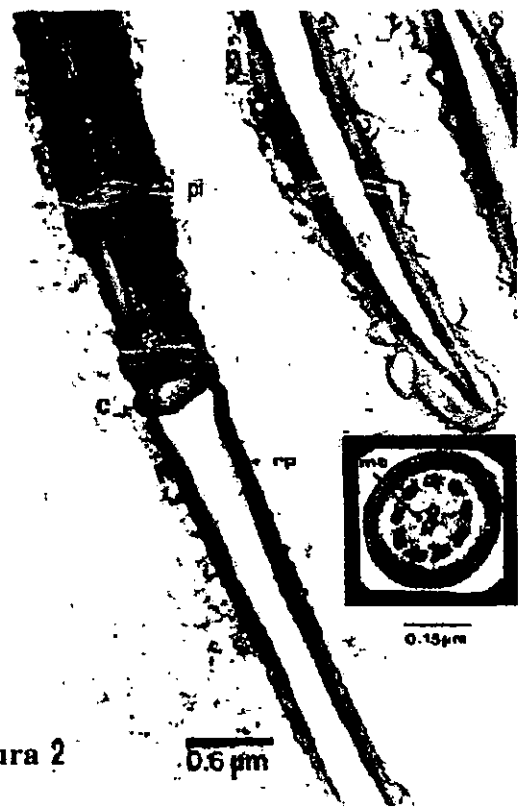


Figura 2

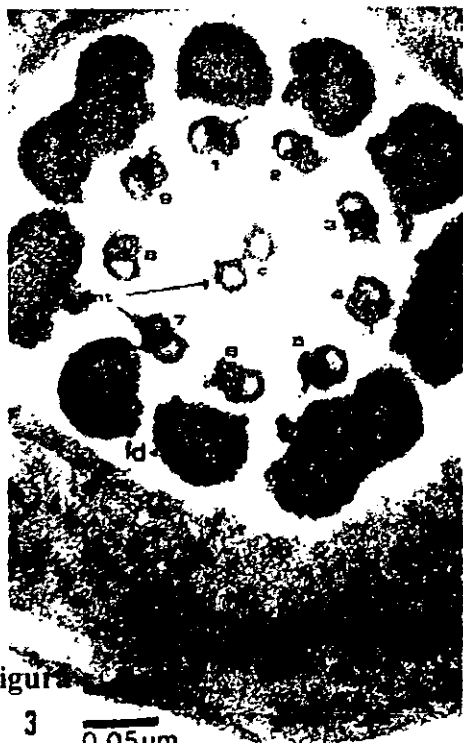
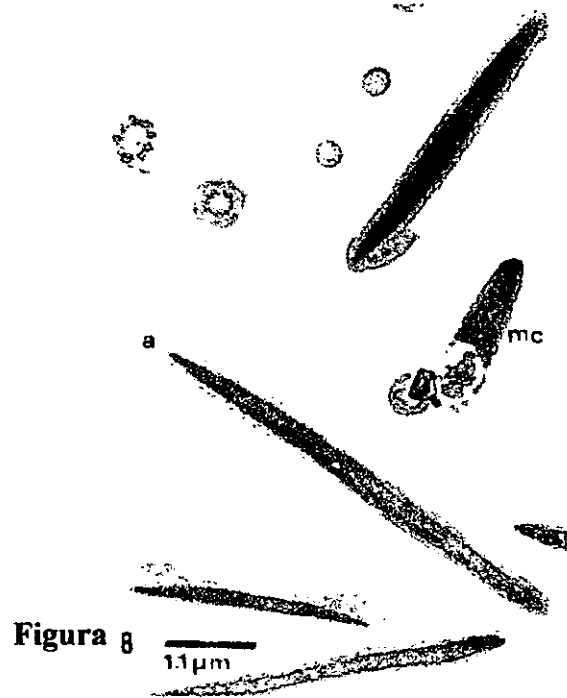
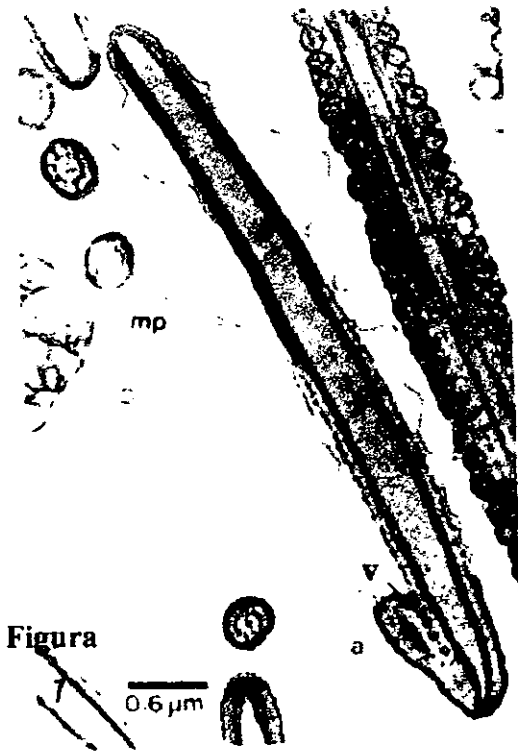
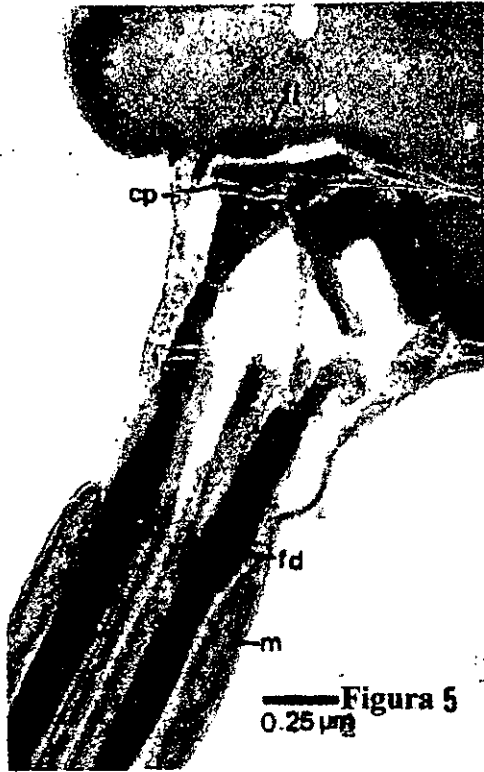


Figura 3



Figura 4



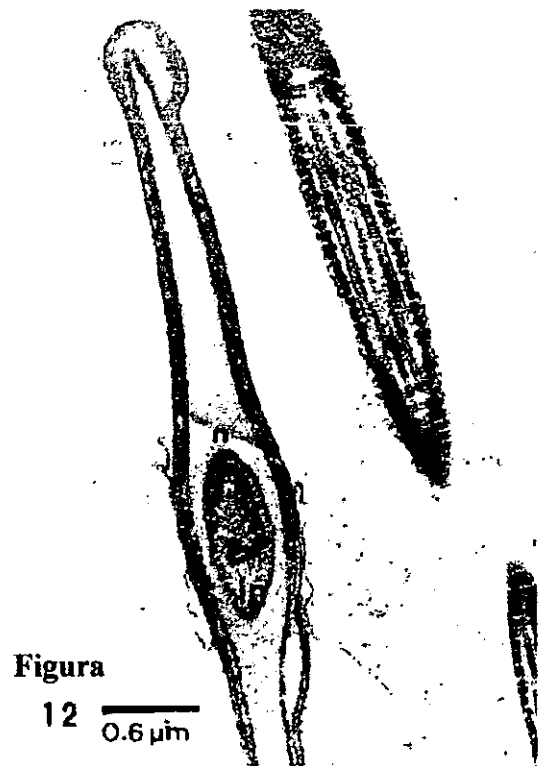
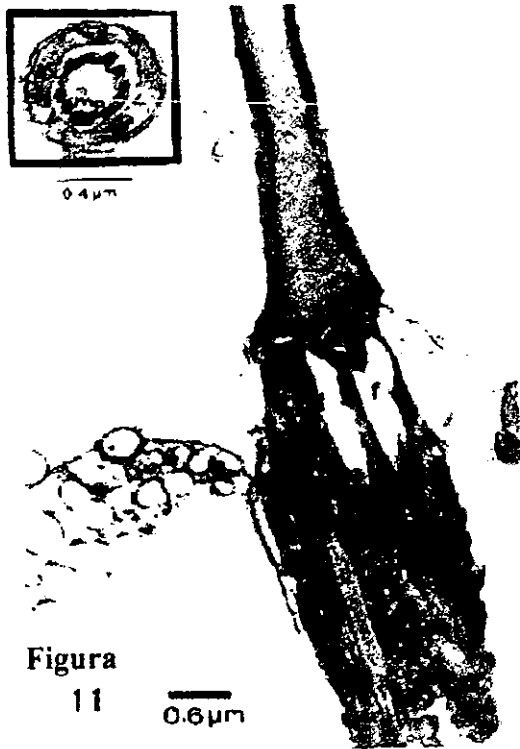
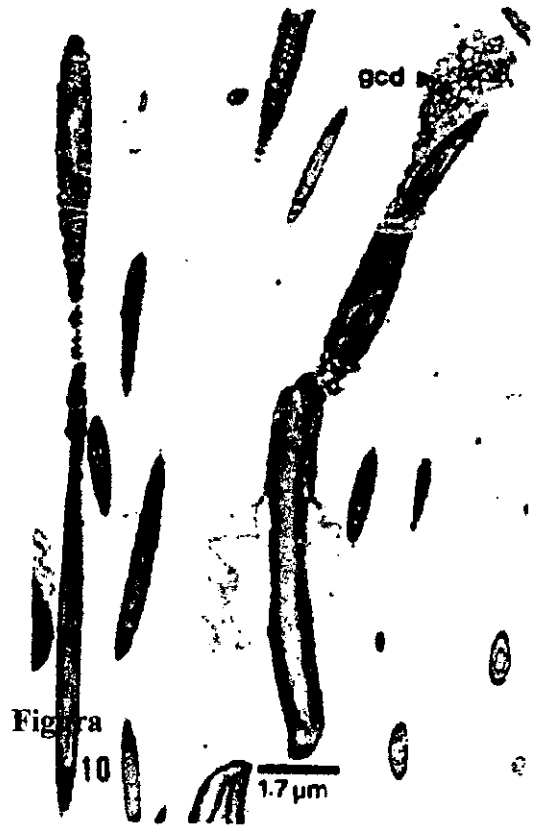




Figura 13



Figura 14



Figura 15

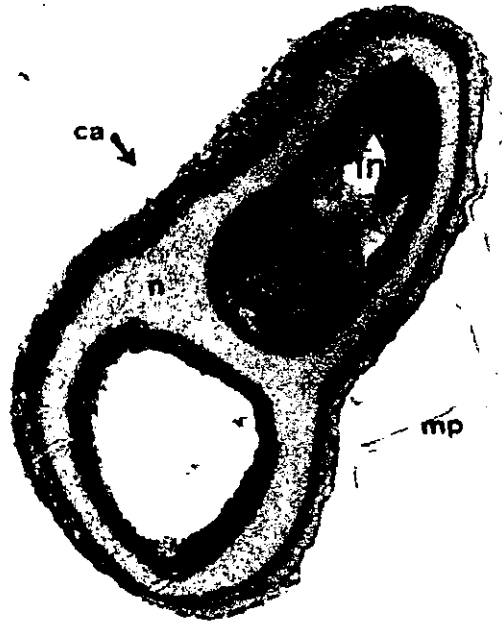
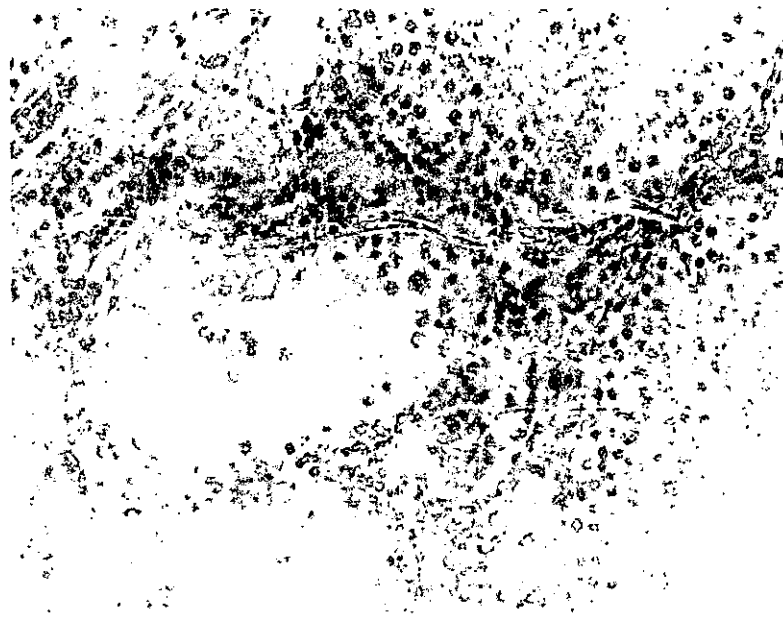


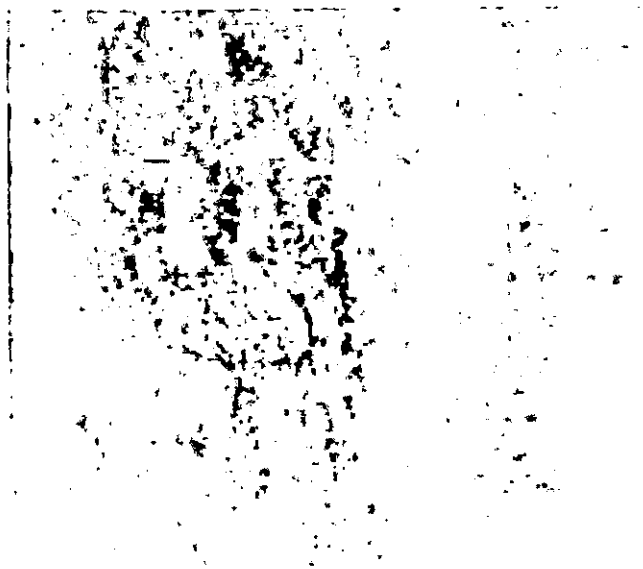
Figura 16



**Figura b.1. Degeneración de epitelio germinal de túbulos seminíferos. Semental sacrificado a los 65 días de la infección con el Rubulavirus porcino. Tinción con H.E. 100X**



**Figura b.2. Degeneración de epitelio germinal de túbulos seminíferos. Presencia de células inflamatorias (linfocitos) a nivel intersticial. Semental sacrificado a los 65 días de la infección con el Rubulavirus porcino. Tinción con H.E. 100X**



**Figura c.1. Vacuolización en epitelio pseudoestratificado en epidídimo. Presencia de células inflamatorias (linfocitos) a nivel intersticial. Semental sacrificado a los 65 días de la infección con el Rubulavirus porcino. Tinción con H.E. 100X.**



**Figura c.2. Epidídimo: pérdida de estereocilios. Semental sacrificado a los 65 días de la infección con el Rubulavirus porcino. Tinción con H.E. 100X.**

## DISCUSIÓN

### Caracterización del virus

La enfermedad del ojo azul (EOA) fue identificada por primera vez en México a principios de 1980, cuando se presentó un brote de un síndrome fatal que se caracterizaba por encefalomiелitis y opacidad corneal en cerdos lactantes y alteraciones reproductivas en las hembras gestantes. En esta enfermedad los signos clínicos son variables y dependen de la edad de los cerdos infectados. En el caso de los sementales se puede presentar orquitis, epididimitis y atrofia testicular.

El agente causal se ha confirmado que es un Paramixovirus (7, 8). El virus ha sido caracterizado ampliamente, encontrándose que posee una organización estructural y genómica similar al virus de la parotiditis humana, con el que conserva un alto grado de homología en cuanto a la secuencia de nucleótidos en sus genes M, HN, y P. Por lo que fue recientemente clasificado en el género Rubulavirus de la familia Paramyxoviridae (25).

Para este trabajo se utilizó un aislamiento de campo. Se caracterizó el virus y se denominó PAC-3 (6). El virus fue aislado en el estado de Jalisco en el año de 1990. Es un virus que produce efecto citopático al ser inoculado en células PK-15 y Vero. Esto permite diferenciarlo del virus de fiebre porcina clásica, este último no ocasiona efecto citopático en monoestratos celulares. El aislamiento viral se confrontó con eritrocitos de ave, bovino y cobayo, se observó hemaglutinación y hemadsorción. Estas reacciones no se presentan en la enfermedad de Aujeszky ni en la fiebre porcina clásica, porque ambos virus no tienen la capacidad de aglutinar los eritrocitos. Se elaboró un conjugado para realizar la prueba de inmunofluorescencia; el suero hiperinmune se obtuvo en conejos y el antígeno que se le administró correspondió al virus que aisló Stephano en 1981.

Una vez que se tuvo la certeza de que se estaba trabajando con el rubulavirus porcino de la familia Paramyxoviridae, se decidió inocular a los verracos.

El virus ingresa por vía oronasal, se aloja en tonsilas y se distribuye en el resto del organismo vía linfática, posteriormente vía arterial y venosa, debido a que se le ha podido aislar de diferentes tejidos. En los verracos, el ingreso del virus al testículo y al epidídimo se efectuó seguramente por vía sanguínea.

### **Signos clínicos**

En este trabajo la reproducción de los signos clínicos en los verracos se logró mediante la inoculación del virus por vía intranasal.

El rubulavirus porcino al ser inoculado en los verracos, causó signos clínicos que en una granja pueden pasar desapercibidos, como la fiebre, la constipación y la conjuntivitis temporales; sin embargo, el cambio de las dimensiones testiculares fue evidente en los cinco animales, sin que se perdiera la libido. Esto puede explicarse por el trabajo realizado por Ramírez (1997) (6) que concluye que las células de Leydig o intersticiales, no se ven afectadas durante la infección del animal, por lo que la producción de hormonas esteroideas que participan en la manifestación de la libido no se ve afectada.

### **Dimensiones testiculares**

Al evaluar los resultados obtenidos se observó que el tamaño testicular nunca fue el mismo. En los sementales A y B sus testículos no regresaron a su tamaño normal durante el periodo que duró el experimento. En el semental C, a partir del día 11 postinoculación al día 65, fue bastante evidente el cambio en sus dimensiones testiculares. Los sementales C y D al día de sacrificio tenían los testículos con un tamaño inferior al original. En el semental E solamente el testículo izquierdo tenía un tamaño menor al original. La respuesta individual de cada cerdo fue diferente. El aumento del tamaño testicular a los once días correspondió a una edematización del tejido escrotal. En aquellos sementales que al final tuvieron uno o los dos testículos con un tamaño menor al original, correspondió a la aparición de lesiones degenerativas a nivel de tejido testicular. En todos los casos se obtuvo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

A partir del día 12 postinfección, los sementales C, D y E presentaron un aumento de tamaño de la cabeza del epidídimo con una consistencia muy firme, esto correspondió a un proceso inflamatorio y a cambios moderados degenerativos observados en el epidídimo.



## **Espermatobioscopías**

Características macroscópicas:

Color: En el semental C después del día 21 postinoculación se observó que cinco de sus eyaculados presentaron sangre. Esto se explica por las lesiones hemorrágicas encontradas a nivel testicular y del epidídimo en este semental.

Olor: Solamente en los eyaculados con sangre se percibió un olor desagradable.

Temperatura: No se presentó ninguna alteración. Siempre osciló entre los 34 y 37°C. Este rango es aceptable para mantener las condiciones adecuadas en la viabilidad espermática (63, 65).

pH: En la mayoría de las evaluaciones realizadas el pH que se obtuvo fue de 7.2 a 7.5. Excepto en los eyaculados con sangre, que tuvieron un pH de 6.5 a 6.9.

El pH registrado de 7.2 a 7.5 correspondió al rango establecido en la literatura (63, 65).

Volumen: En los verracos sanos de 8 y 12 meses de edad el volumen total del eyaculado es en promedio de 200 ml (49, 56, 63, 65). Al comparar el volumen de los eyaculados de los cinco sementales antes y después de la inoculación del virus no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). El volumen del eyaculado se conserva debido a que no existe lesión alguna en las glándulas accesorias (6).

Características microscópicas

Motilidad: Un eyaculado de buena calidad deberá tener, como mínimo, 80% de espermatozoides con movimiento progresivo (56). El rango establecido para este parámetro va de 70 a 90% (40, 41, 63, 64, 65). Los cinco verracos tuvieron una disminución en el porcentaje de motilidad espermática. Sin embargo el semental C fue el más afectado ya que tuvo una disminución del 49.3%. En los verracos A, B, D y E la motilidad bajó 11.13%. Este efecto se asocia a la fiebre manifestada después de la inoculación del virus en los sementales A, B y C. El estrés térmico produce una alteración en la espermiogénesis, al aumentar la temperatura local a nivel escrotal (77). Esto se manifiesta con una disminución en la motilidad. También en los sementales B, C y en el D, la motilidad se vio afectada por los cambios degenerativos encontrados a nivel de epidídimo. Entre los cambios funcionales

que ocurren durante el tránsito de los espermatozoides en el epidídimo se incluye el desarrollo de la capacidad de motilidad progresiva (47).

Concentración espermática: La concentración espermática de un macho sano es en promedio de  $300 \times 10^6$  de espermatozoides/ml (40, 41, 63, 64, 65, 78). Los cinco sementales manifestaron una disminución en la concentración espermática. Los sementales B y C fueron los más afectados, ya que se obtuvo una disminución de 32.78 y de  $87.67 \times 10^6$  de espermatozoides/ml respectivamente, esta variable presentó una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ). En los sementales A, D y E la concentración espermática bajó en promedio de  $2.52 \times 10^6$  de espermatozoides/ml. Lo anterior indica que la respuesta individual de cada cerdo fue diferente. En los sementales A, B y C, la disminución de la concentración espermática se atribuye a la fiebre que presentaron después de la inoculación del virus. Cuando la temperatura corporal del semental alcanza temperaturas mayores a  $40^\circ\text{C}$  puede asumir los efectos de estrés térmico. Un estrés calórico en los verracos aumenta la secreción de cortisol y disminuye los valores séricos de testosterona reflejándose en una alteración en la producción espermática. (77). En los sementales C, D y E la disminución en la concentración espermática se debió sobre todo al daño degenerativo encontrado a nivel testicular. La presencia del virus activa la respuesta celular, que se refleja en elevados porcentajes de linfocitos T  $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ , los cuales son células especializadas en la lisis de las células infectadas por el virus. La presencia del virus en el testículo provoca lesiones en las células germinales y en el epitelio pseudoestratificado del epidídimo (6).

Anormalidades espermáticas: El porcentaje permitido de anomalías espermáticas en un eyaculado para su utilización en la inseminación artificial va del 15 al 20% (40, 41, 49, 63, 64, 65, 78). Los cinco verracos presentaron una elevación en el porcentaje de anomalías espermáticas. Los sementales C y D tuvieron un aumento del 48.1 y del 20.14%, respectivamente. En los cerdos A, B y E el aumento promedio fue del 11.54%. Esta variable al compararse antes y después de la inoculación del virus, presentó una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ).

Tipo de anomalías espermáticas: Las anomalías primarias se presentan por una disfunción testicular (78, 79). Este tipo de anomalías fueron observadas después de la

inoculación del virus y se presentaron en un 10.87%. Las anomalías primarias que se encontraron fueron las siguientes: cabeza piriforme, cabeza achatada, microcabeza, macrocabeza y espermatozoides con dos flagelos. Este tipo de anomalías se presentan por una falla en la espermatogénesis (49, 78, 79). Esta falla se ocasionó por el estrés térmico ya explicado y sobre todo por los cambios degenerativos que provocó el rubulavirus porcino en las células germinativas y en los túbulos seminíferos.

Las anomalías secundarias se presentan durante el proceso de la maduración a nivel de epidídimo (54, 78, 79). Después de la inoculación experimental del virus, estas anomalías se incrementaron del 13.31 al 51.56%. Esto se explica por las lesiones degenerativas halladas en epidídimo: vacuolización citoplásmica, pérdida parcial de estereocilios y pequeñas áreas de necrosis licuefactiva. En los espermatozoides de los cinco verracos se identificaron las siguientes anomalías: gota citoplásmica proximal, gota citoplásmica distal, flagelo doblado en forma de L, flagelo látigo, flagelo ovillo, cabeza suelta y cabeza doble. Puede considerarse que un eyaculado con un porcentaje alto de defectos en cola tiene una fertilidad reducida o menor tiempo de conservación. Las gotas citoplásmicas indican inmadurez de la célula. La gota se puede encontrar a lo largo de la cola del espermatozoide. A mayor distancia de la cabeza, es menos inmaduro. La presencia de la gota proximal es indicativo de un espermatozoide incapaz de fertilizar (79).

El obtener resultados similares de las espermatobioscopías ya descritas, en la práctica y a nivel de granja, permite que se pueda recomendar el desecho de los sementales. En la enfermedad del ojo azul esta pueda ser la forma en que participa el verraco para que el número de repeticiones del estro se incremente, sobre todo cuando las cerdas resultan negativas a la infección. Esta situación repercute en una disminución del porcentaje de fertilidad de servicio a parto y de manera simultánea se observa que el promedio de lechones al parto disminuye.

### **Serología**

En cuanto a la respuesta humoral ante la infección con el RVP, se han implementado técnicas para detectar anticuerpos específicos contra el virus de la enfermedad del ojo azul

(11). Esto ha permitido realizar estudios epidemiológicos para conocer la distribución de la enfermedad en la República Mexicana (3, 80).

Al infectar a los verracos, el RVP fue capaz de inducir la producción de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, después de la segunda semana los cuales se mantuvieron hasta el final de la fase experimental.

Para el diagnóstico serológico del RVP fue empleada la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Esta técnica se utilizó por la propiedad hemaglutinante del virus. Además es una técnica rápida, fácil, accesible, económica y que no requiere un medio estéril para su realización. Para los seguimientos serológicos a nivel de granja o el diagnóstico regional, generalmente se ha utilizado la inhibición de la hemaglutinación. En condiciones controladas, como las del experimento presente, ha mostrado un alto grado de especificidad, al ser comparada con la sueroneutralización.

### **Citometría de flujo**

#### Viabilidad espermática

La adaptación de la tecnología de la citometría de flujo al estudio de las células espermáticas, permite valorar características específicas de este tipo de células tales como el contenido de ADN, con el fin de sexar espermatozoides, viabilidad espermática, concentración de espermatozoides, integridad acrosomal, función mitocondrial y la integridad de la estructura de la cromatina espermática. Con esta tecnología se pueden analizar varias características espermáticas a la vez miles de células en un tiempo muy corto, en menos de un minuto, con alta precisión y sin mucha preparación de la muestra a valorar (66, 81).

En esta investigación se evaluó la viabilidad y la integridad acrosomal de los espermatozoides utilizando el citómetro de flujo, el método más empleado es la combinación de yoduro de propidio (IP), para identificar las células muertas y de lectinas-isotiocianato de fluoresceína (FITC), para detectar el daño acrosomal (67, 82, 83).

### Porcentaje de espermatozoides muertos

El eyaculado de los verracos sanos contiene un 85% de espermatozoides vivos (56). En este trabajo, después de la inoculación del virus, se incrementó el porcentaje de espermatozoides muertos. Los sementales C y D manifestaron un aumento del 49.73 y del 17.29% respectivamente. Los sementales A, B y E tuvieron un aumento promedio del 11.8%. El aumento de los espermatozoides muertos en los cinco cerdos presentó una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) al comparar sus resultados obtenidos antes y después de la inoculación. Este aumento en las anomalías espermáticas se explica por el efecto del virus sobre los gametos masculinos y por el daño degenerativo a nivel testicular y de epidídimo de los cinco verracos.

### Daño acrosomal

El acrosoma es un saco de doble membrana que se localiza en el extremo anterior del núcleo del espermatozoide, la importancia de su estudio radica en la integridad de su estructura y su contenido de enzimas hidrolíticas que participan en la destrucción de las células que rodean al ovocito para que se lleve a cabo la fecundación.

Algunos autores han designado como normal, el encontrar menos del 5% de acrosomas anormales en machos altamente fértiles (78, 79).

El primer estudio realizado con lectinas, sobre las propiedades de la superficie de los espermatozoides fue realizado por Kashiwara (51), quién encontró que algunas lectinas producen aglutinación espermática. Nicolson y Yanagimachi utilizaron las lectinas para estudiar la dinámica de las membranas de los espermatozoides. Fueron notables los cambios en el patrón de las lectinas durante la maduración espermática, la capacitación y después en la reacción acrosomal (51). Del mismo modo, las lectinas son una herramienta para diferenciar los diferentes estadios de las células espermáticas.

La lectina *Arachis hypogea* (PNA) reconoce el azúcar B-D-gal-(1-3)-D-galNAc que se encuentra en la membrana externa del acrosoma (52, 53, 68). Cuando esta estructura no está presente o se encuentra deteriorada, los espermatozoides pierden la habilidad de unirse a esta lectina (PNA-) (69, 70).

Con la utilización de la lectina PNA se pudo conocer la ausencia o daño de la membrana acrosomal de los espermatozoides por aglutinación.

Antes de la inoculación experimental del virus se determinó en los cinco sementales un promedio del daño acrosomal en los espermatozoides vivos y muertos (PNA-), obteniendo 8.37 y 11.88% respectivamente. Después del desafío, a partir del día 32 este porcentaje aumentó y se mantuvo constante hasta el final del experimento. En los espermatozoides vivos se detectó a un 18.17% de daño acrosomal y en los muertos un 28.75%. Esta alteración tuvo una diferencia altamente significativa cuando se compararon las evaluaciones de antes y después de la inoculación ( $p < 0.0001$ ). El daño acrosomal detectado por esta técnica fue confirmado por microscopía electrónica a través del estudio de la ultraestructura de los espermatozoides.

La importancia de lo anterior radica en lo siguiente: la motilidad progresiva de los espermatozoides es uno de los parámetros más importantes, para determinar su utilización en la inseminación artificial en las granjas porcinas. Sin embargo, existen estudios que han demostrado que hay poblaciones de espermatozoides que muestran una excelente motilidad, pero que están dañados a nivel de membranas. La integridad de la membrana plasmática y acrosomal es necesaria para el metabolismo normal de las células espermáticas, para lograr su objetivo, que es la fecundación exitosa del óvulo

#### Detección del rubulavirus porcino en los espermatozoides

La susceptibilidad a una infección viral es un evento complejo en el que están involucrados componentes virales y factores de resistencia propios del hospedero. Entre los primeros se encuentran proteínas virales que reconocen y se adhieren a los receptores celulares; proteínas con actividad enzimática de muy diversa índole; proteínas que regulan y mantienen bajo control viral la expresión genética y proteínas que participan en eventos de evasión, enmascaramiento o modulación de la respuesta inmune antiviral. Entre los factores del hospedero podemos mencionar, la expresión de moléculas de superficie reconocidas como receptores, las cuales le permiten al virus adherirse, fusionarse y/o penetrar a la célula; la presencia de enzimas o de elementos reguladores de la expresión genética, que promueven o evitan la replicación viral; y los elementos del sistema inmune que mantienen

bajo vigilancia constante a todo el organismo, contra la posible invasión viral y desarrollan diversas estrategias moleculares o celulares para eliminar las infecciones virales establecidas (9).

Reyes-Leyva *et al.* (1997) (37) identificaron que la hemaglutinina del rubulavirus porcino reconoce estructuras que contienen ácido neuramínico, mostrando su mayor afinidad hacia el oligosacárido sialilalfa2,3lactosa (NeuAalfa2,3GalB1,4Glc). La expresión de NeuAalfa2,3Gal en los órganos reproductores parece ser decisiva para la infección en los cerdos adultos (6).

En los espermatozoides y en el plasma seminal existe ácido siálico, el cual está involucrado en la maduración espermática en epidídimo, en mantener el balance iónico, en la estabilización del acrosoma, en la integridad estructural del espermatozoide y en el proceso de fertilización (82, 83, 84).

Con el antecedente de que existe ácido siálico en los espermatozoides, en este trabajo se buscó a través de la lectina *Maackia amurensis* (específica para NeuAalfa2,3Gal) (37) los receptores para el rubulavirus porcino. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: Antes de la inoculación del virus, se detectaron en 2.7 y 13.7% de los espermatozoides totales muertos y vivos respectivamente. Después de la inoculación se detectaron en 0.92 y 9.26% de los espermatozoides muertos y vivos, respectivamente. Estos resultados nos indican que el virus puede adherirse a los espermatozoides y ser este un mecanismo de transmisión en las granjas porcinas.

También se buscó la presencia del virus en los espermatozoides a través de anticuerpos específicos para el virus. Los sementales C y E empezaron la diseminación del virus en el día nueve postinfección y continuó hasta el día 39. En los sementales A, B y D la diseminación se inició el día 16 hasta el día 39 postinoculación. El rubulavirus porcino se detectó sobretodo en los espermatozoides vivos (10.91%).

## **Microscopía electrónica**

A través de la microscopía electrónica se identificaron alteraciones en la ultraestructura de los espermatozoides a partir del día 30 postinfección, dichas alteraciones correspondieron a las anormalidades primarias y secundarias ya descritas (85, 86, 87).

Las anormalidades en el tamaño y forma de la cabeza del espermatozoide, identificadas en los cinco sementales, son el resultado de una alteración en el proceso de condensación de la cromatina y/o en el desarrollo del acrosoma (54, 56).

La presencia de los múltiples flagelos identificados en los sementales C, D y E se pudieron desarrollar durante las primeras etapas de la espermiogénesis (54, 56).

Los defectos en la protuberancia acrosómica identificadas en los gametos masculinos de los sementales B, C y D se debe a una maduración anormal del acrosoma (54, 56, 86).

La presencia de espermatozoides con anomalías nucleares y acrosómicas en los cinco sementales se atribuye a alteraciones en los estadios finales de la remodelación del núcleo y del acrosoma, durante el proceso de espermatogénesis (54, 56, 86, 87).

Los defectos a nivel del axonema, por ejemplo la ausencia de microtúbulos se pueden presentar por alguna alteración específica en la espermiogénesis (87, 88).

La presencia de cabezas sueltas en los espermatozoides de los sementales B, C, D y E se asocia a una degeneración testicular. Este defecto se desarrolla en los primeros estadios de la espermiogénesis, pero se manifiesta frecuentemente a nivel de epidídimo, cuando los espermatozoides adquieren su capacidad de movimiento (54, 56).

La presencia de acrosomas vacuolados en los gametos masculinos de los cinco sementales se asocia al estrés térmico (fiebre) y a alteraciones en la maduración a nivel de epidídimo (54, 56, 86, 89).

El incremento de la frecuencia de espermatozoides con la cola doblada por el anillo de Jensen y de espermatozoides con la cola enrollada, se atribuye a anomalías en el proceso de maduración espermática, a lo largo del conducto epididimario (54, 56, 78, 79, 90).

La presencia de espermatozoides con deformaciones en la pieza mitocondrial o con una elevada flexibilidad de sus regiones principal y de conexión, es frecuente en el esperma de la región cefálica del epidídimo. Una de las características del proceso madurativo del espermatozoide es el establecimiento de puentes disulfuro entre las cisteínas de las



proteínas que forman las principales estructuras citoesqueléticas, es decir, las fibras densas, el capítulum y las columnas segmentadas. La formación de dichos puentes disulfuro es un proceso que se da durante el recorrido epididimario del espermatozoide y que tiene por finalidad aumentar la solidez de dichas estructuras citoesqueléticas (55).

### **Necropsia e histopatología**

Las lesiones degenerativas encontradas a nivel de testículo y epidídimo corresponden a las lesiones producidas por el RVP. La patogenicidad está determinada por el perfil de glicosilación de los órganos blanco, en animales adultos la expresión de NeuAcalfa2,3Gal en el epidídimo favorece el tropismo viral hacia ese órgano, con el consecuente efecto citopático que dan origen a algunas alteraciones típicas de esta enfermedad, principalmente daño en órganos reproductores e infertilidad (6).

### **Virus que se diseminan por el semen**

La inseminación artificial ha desempeñado un importante papel en la mejora de la calidad genética y en la productividad de los animales. Sin embargo el desarrollo de la inseminación artificial a nivel industrial, ha ido acompañado de una gran preocupación por la repercusión que pudieran tener los microorganismos sobre la calidad del semen y sobre la fecundidad de las hembras.

Sin lugar a dudas, el semen presenta un gran riesgo potencial de difusión de enfermedades infecciosas; sin embargo, en muchos casos falta la información precisa, tanto en lo que se refiere a la presencia de determinados agentes infecciosos en el semen, como a la transmisión por éste de las enfermedades producidas por tales agentes.

Numerosos virus se han aislado de semen de verracos infectados tales como los siguientes(42): Adenovirus, el virus de Fiebre Porcina Africana, el virus de la Enfermedad de Aujeszky, Citomegalovirus, Enterovirus, el virus de Fiebre Aftosa, el virus de Fiebre Porcina Clásica, el virus de la Encefalitis Japonesa, Parvovirus Porcino, el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, Reovirus Porcino, virus de la Influenza Porcina, el virus de la Enfermedad Vesicular del Cerdo, el virus del Papiloma Genital Transmisible y Picornavirus. Sin embargo, ninguno de ellos logra la destrucción tan severa

que genera el virus de la EOA a nivel de epitelio seudoestratificado de epidídimo y parénquima testicular. El virus de la Parotiditis humana que tiene una similitud genómica con el rubulavirus porcino, puede causar epididimitis y orquitis. Este problema se puede presentar en el 25 al 30% de los hombres en la etapa pospuberal, cuando padece dicha infección (6).

## CONCLUSIONES

- 1.- Mediante la inoculación del aislamiento PAC-3, se pudo generar orquitis en los verracos.
- 2.- Después de la inoculación del virus se observó aumento de las dimensiones testiculares a partir del día 11 de la infección.
- 3.- A partir del día 12 postinoculación se presentó un aumento de tamaño de la cabeza del epidídimo, con una consistencia muy firme.
- 4.- A la segunda semana después de la inoculación del virus se presentó constipación y conjuntivitis.
- 5.- Los niveles de anticuerpos contra el virus de la enfermedad del ojo azul se detectaron a partir del día nueve postinfección, a través de la técnica de inhibición de la hemaglutinación.
- 6.- No se perdió la libido del semental ante la infección por el virus de la enfermedad del ojo azul.
- 7.- Como no se pierde la libido, el verraco puede continuar con eyaculaciones sin que el volumen se vea afectado, por lo tanto al seguir montando puede diseminar el virus.
- 8.- El rubulavirus porcino provocó en los cinco sementales alteraciones en la calidad espermática.
- 9.- El rubulavirus porcino afectó por lo menos dos ciclos de espermatogénesis.
- 10.- Las anomalías testiculares originadas por el rubulavirus porcino, provocan un descenso de la concentración espermática y un aumento de la frecuencia de espermatozoides con malformaciones acrosómicas y nucleares.
- 11.- La disfunción epididimaria ocasionada por el rubulavirus porcino, provoca una disminución de la frecuencia de espermatozoides móviles y un incremento de la frecuencia de espermatozoides con la cola doblada por el anillo de Jensen y de colas enrolladas.
- 12.- La baja motilidad y concentración espermáticas son factores que determinan la fertilidad disminuida en los machos infectados con el rubulavirus porcino. Además, las distintas malformaciones cefálicas y de cola, observadas durante el proceso infeccioso

originado por este virus, conducen a una disminución del poder fecundante de los espermatozoides.

13.- El rubulavirus porcino ocasionó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides muertos y de daño acrosomal.

14.- El rubulavirus porcino fue detectado en los eyaculados de los cinco sementales a partir del día nueve hasta el día 39 postinfección.

15.- El semen de verracos infectados con el rubulavirus porcino representa un gran riesgo de diseminación del virus.

16.- A la necropsia se observó la presencia de líquido seroso en los testículos y áreas hemorrágicas en el parénquima testicular. En la cabeza del epidídimo se observó un aumento de tamaño, con áreas hemorrágicas y nódulos con una coloración blanquecina.

17.- A la histopatología se encontró lo siguiente: En testículo se observó cambios degenerativos en las células germinativas, degeneración en túbulos seminíferos con infiltrado multifocal de células mononucleares. En epidídimo se apreció vacuolización citoplásmica y pérdida parcial de estereocilios. También se observó pequeñas áreas de necrosis licuefactiva, rodeadas de macrófagos, células gigantes multinucleadas y linfocitos. En vesícula seminal se observó infiltración multifocal de linfocitos.

## FIGURAS

Figuras A-E. Dimensiones testiculares de cada semental antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figuras F-G. Promedios de las dimensiones del testículo derecho e izquierdo de los cinco verracos antes y después de inocular el rubulavirus porcino.

Figuras H-L. Volumen del eyaculado de cada semental antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figuras M-Q. Porcentaje de motilidad de cada semental antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figuras R-V. Concentración espermática/ml de cada semental antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figuras W-ZZ. Porcentaje de anomalías espermáticas de cada semental antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 1. Volumen del eyaculado de los cinco verracos antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 2. Porcentaje de motilidad de los cinco verracos antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 3. Concentración espermática/ml de semen de los cinco verracos antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 4. Porcentaje de anomalías espermáticas de los cinco verracos antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 5. Anomalías espermáticas primarias identificadas en los cinco sementales antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figuras 6-7. Anomalías espermáticas secundarias identificadas en los cinco sementales antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 8. Tipo de anomalías espermáticas identificadas en los verracos antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figuras 9-13. Porcentaje de espermatozoides muertos de cada semental antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 14. Porcentaje de espermatozoides muertos de los cinco verracos antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

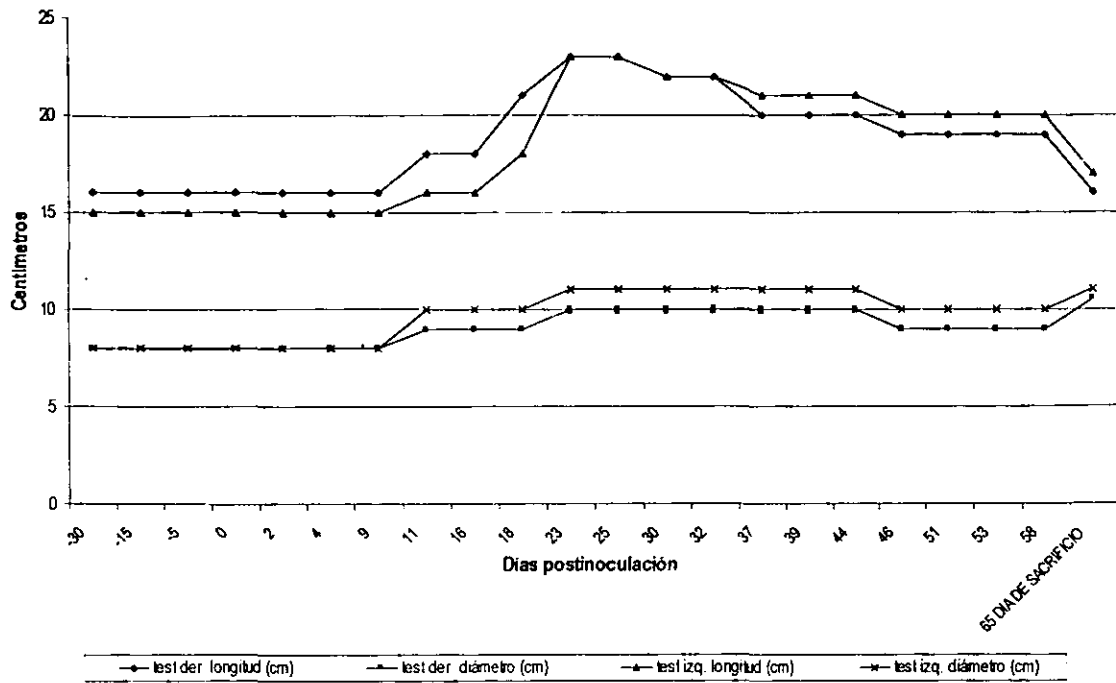
Figuras 15-19. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con daño acrosomal de cada semental antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

Figura 20. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos con daño acrosomal de los cinco verracos antes y después de la inoculación del rubulavirus porcino.

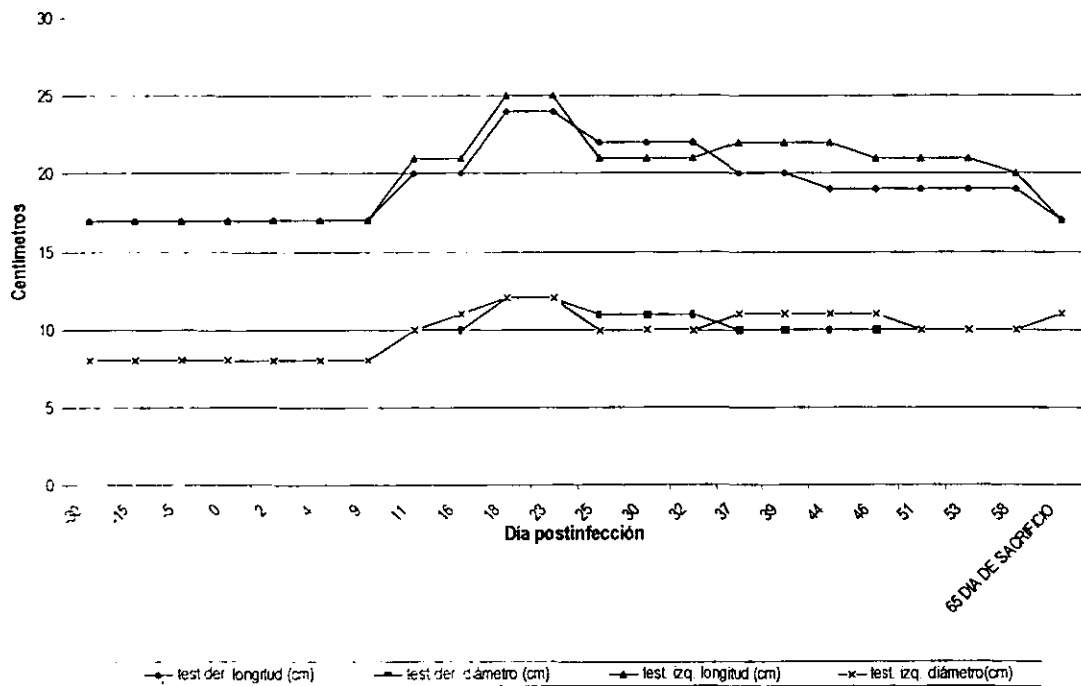
Figura 21-22. Porcentaje de espermatozoides vivos y muertos positivos al rubulavirus porcino de cada semental.

Figura 23. Porcentaje de espermatozoides positivos al virus y receptores celulares detectados a través de la lectina MAA.

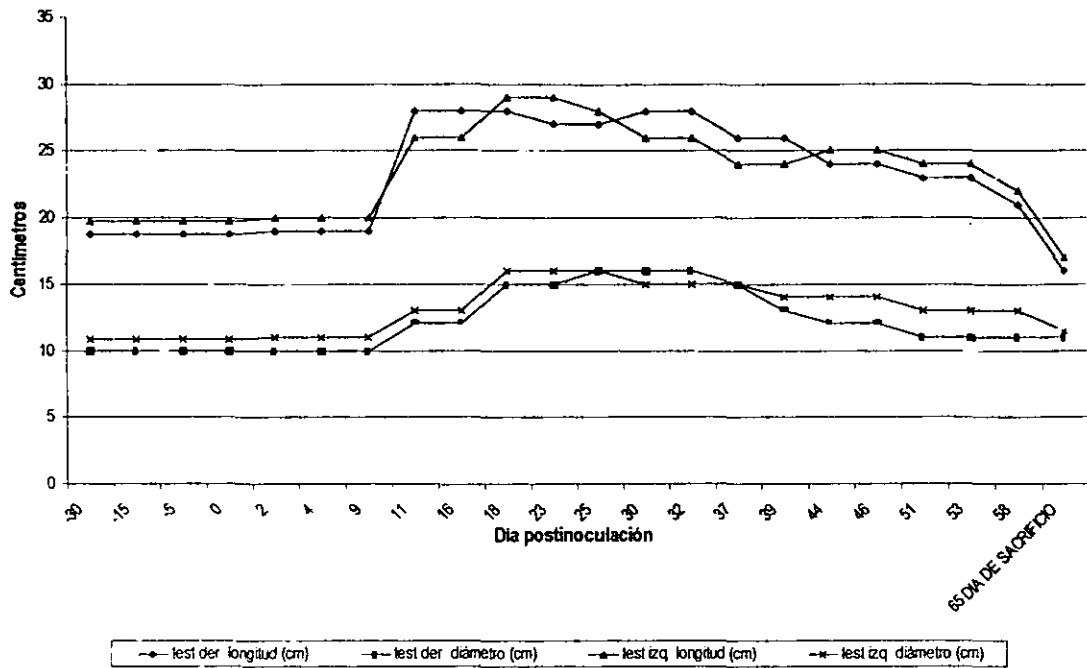
**Figura A. DIMENSIONES TESTICULARES DEL SEMENTAL "A" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



**Figura B. DIMENSIONES TESTICULARES DEL SEMENTAL "B" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



**Figura C. DIMENSIONES TESTICULARES DEL SEMENTAL "C" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



**Figura D. DIMENSIONES TESTICULARES DEL SEMENTAL "D" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**

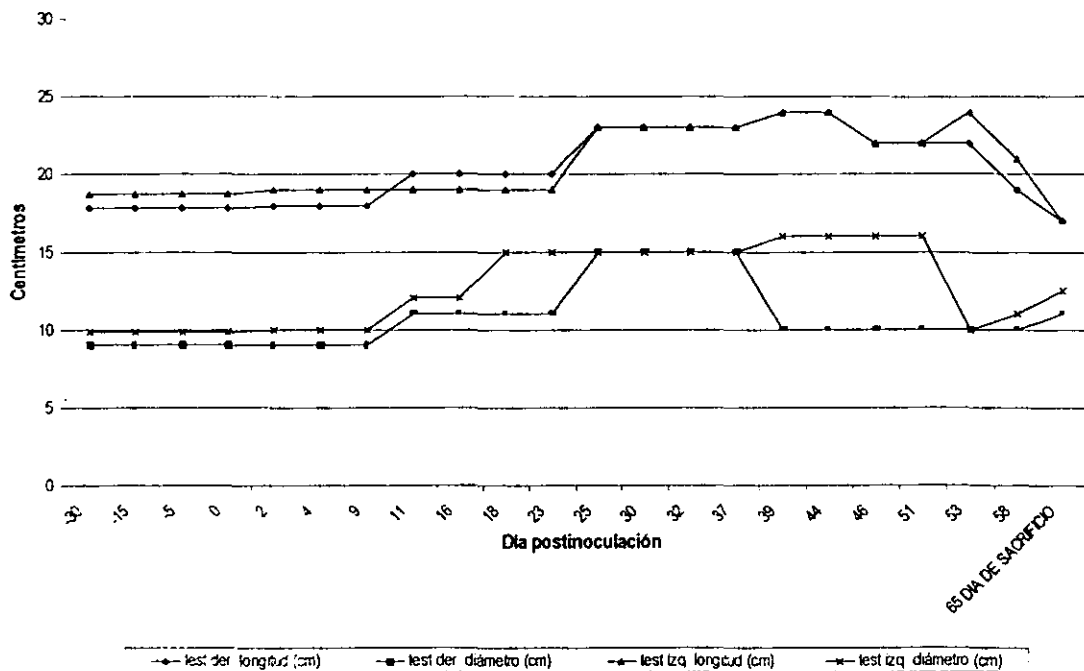
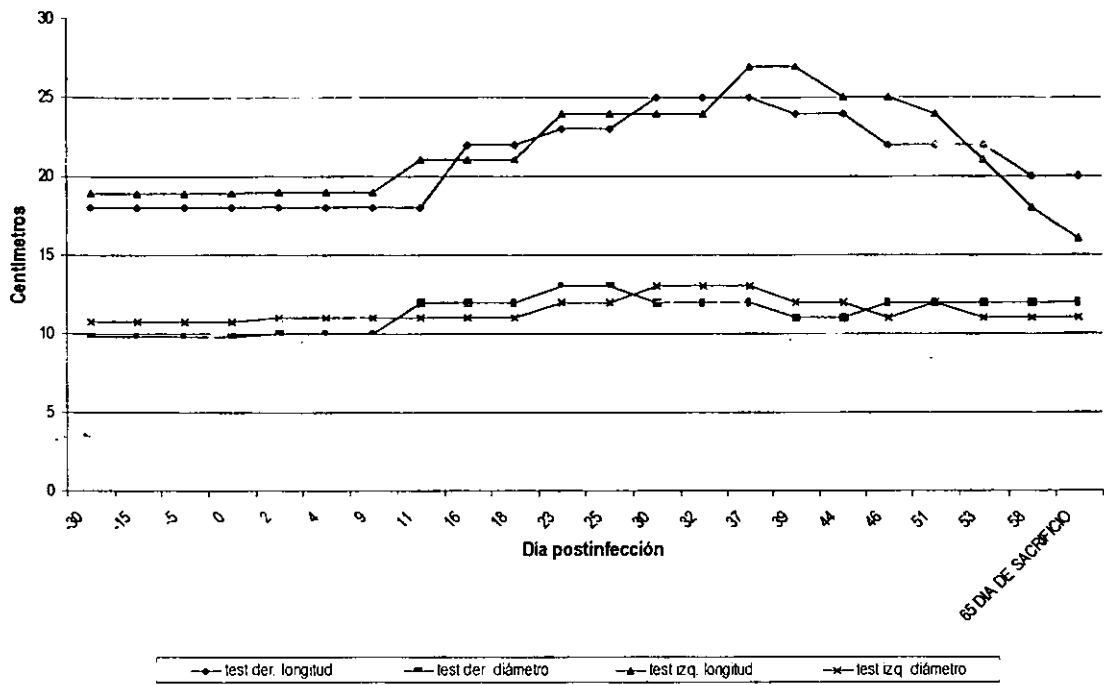
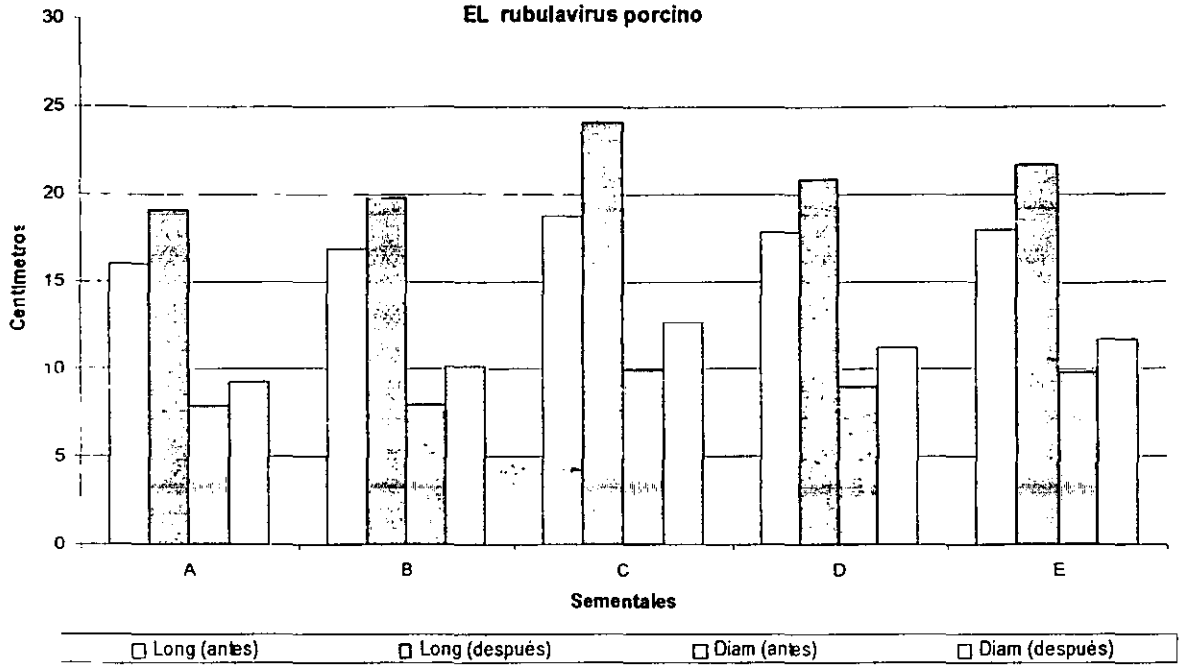


Figura E. DIMENSIONES TESTICULARES DEL SEMENTAL "E" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

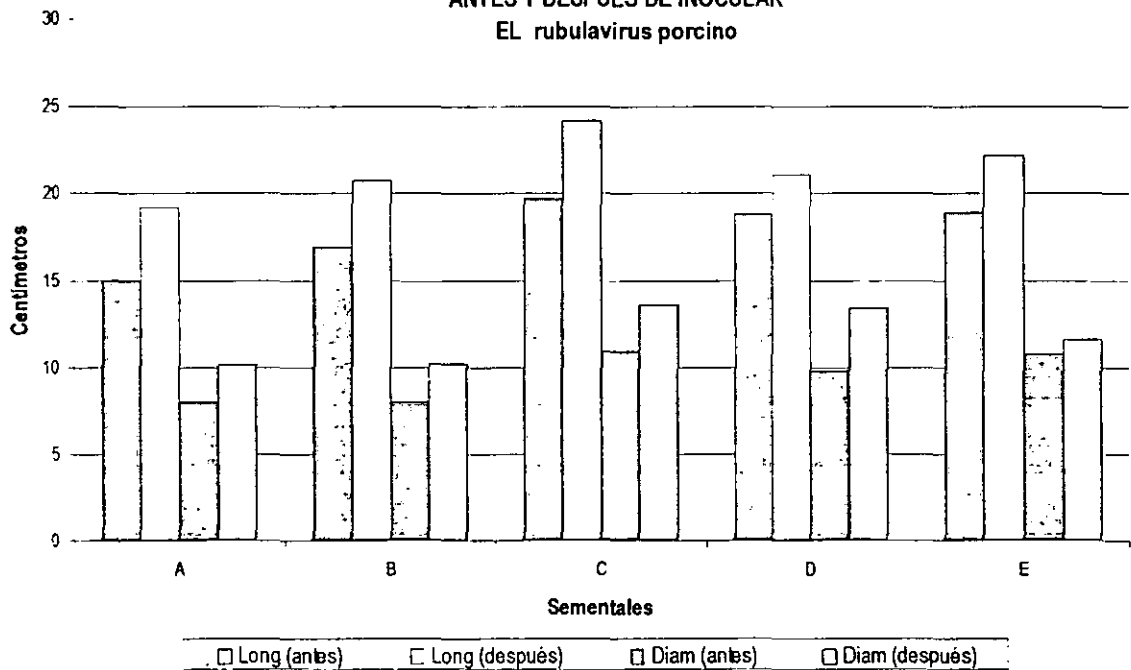




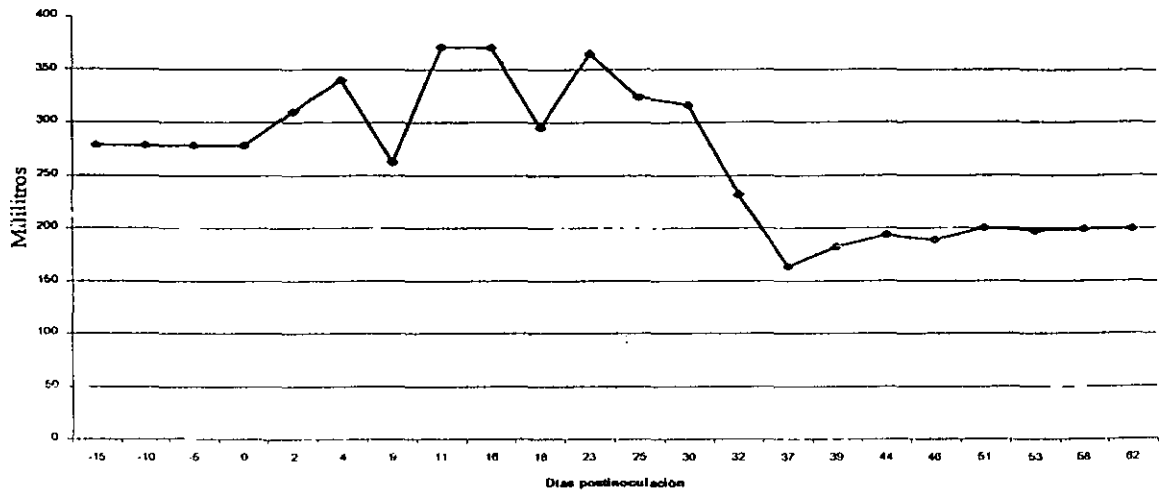
**Figura F. PROMEDIOS DE LAS DIMENSIONES DEL TESTÍCULO DERECHO DE LOS VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE INOCULAR EL rubulavirus porcino**



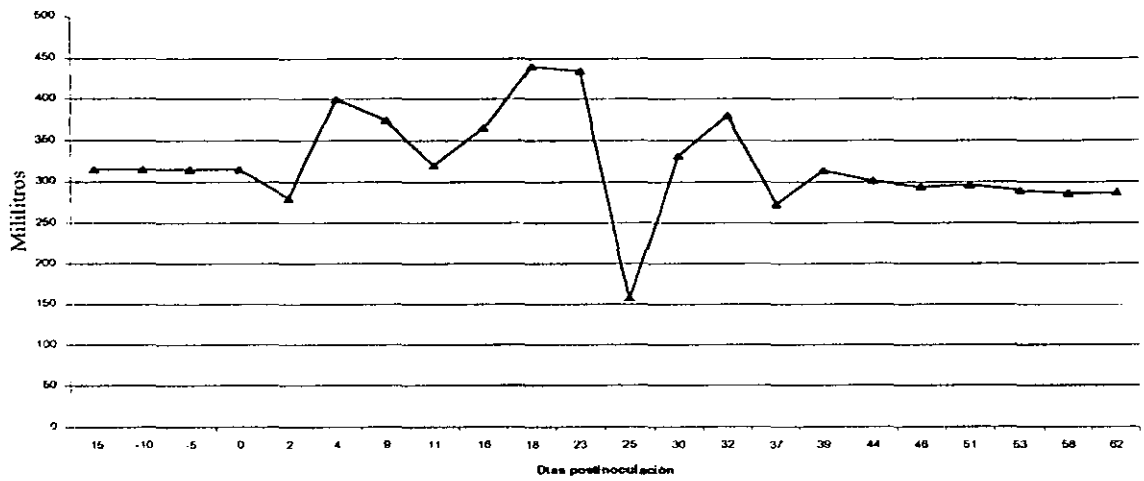
**Figura G. PROMEDIOS DE LAS DIMENSIONES DEL TESTÍCULO IZQUIERDO DE LOS VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE INOCULAR EL rubulavirus porcino**



**Figura H. VOLUMEN DEL EYACULADO DEL SEMENTAL "A" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



**Figura I. VOLUMEN DEL EYACULADO DEL SEMENTAL "B" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



**Figura J. VOLUMEN DEL EYACULADO DEL SEMENTAL "C" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**

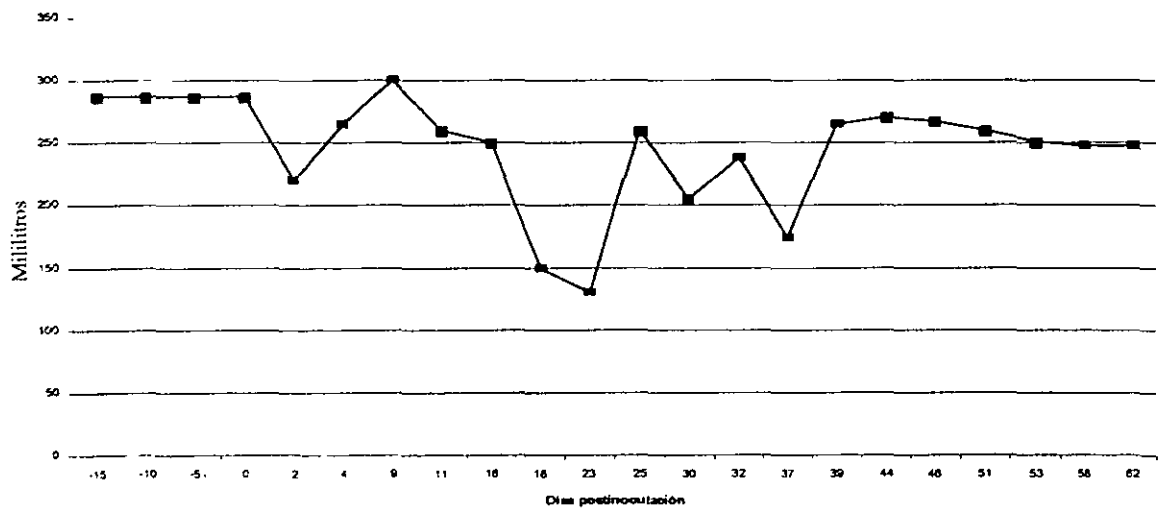


Figura K. VOLUMEN DEL EYACULADO DEL SEMENTAL "D" ANTES Y DEPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

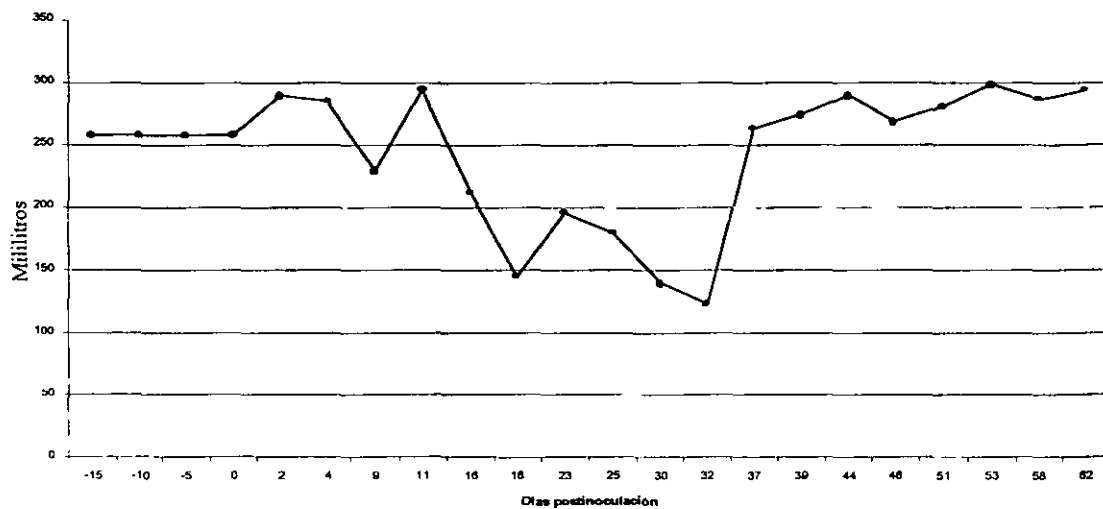


Figura L. VOLUMEN DEL EYACULADO DEL SEMENTAL "E" ANTES Y DEPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

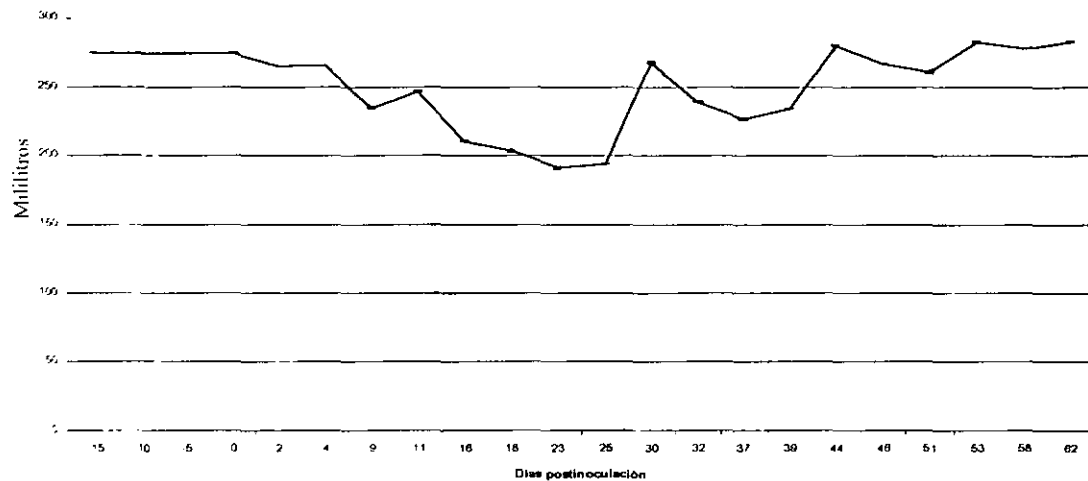


Figura M. PORCENTAJE DE MOTILIDAD DEL SEMENTAL "A" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

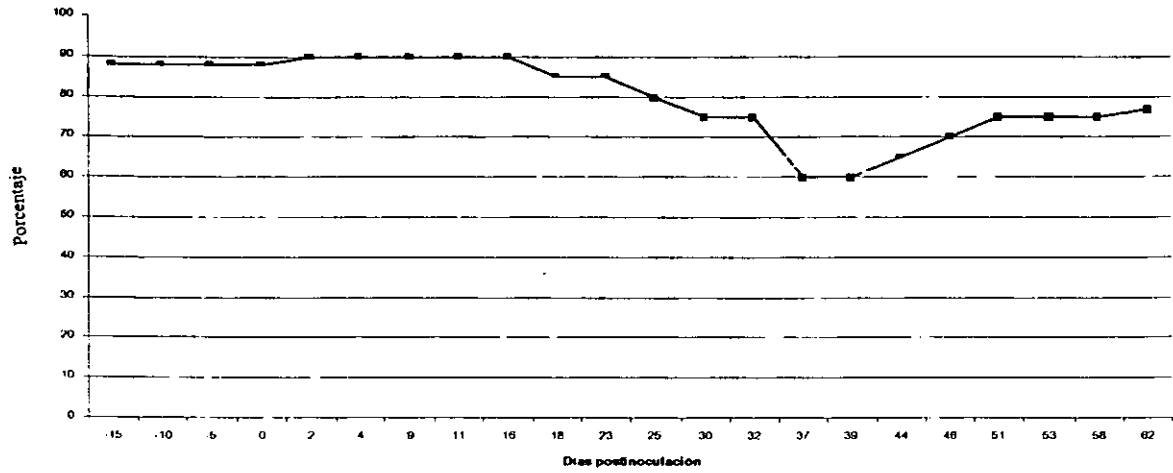


Figura N. PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMENTAL "B" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

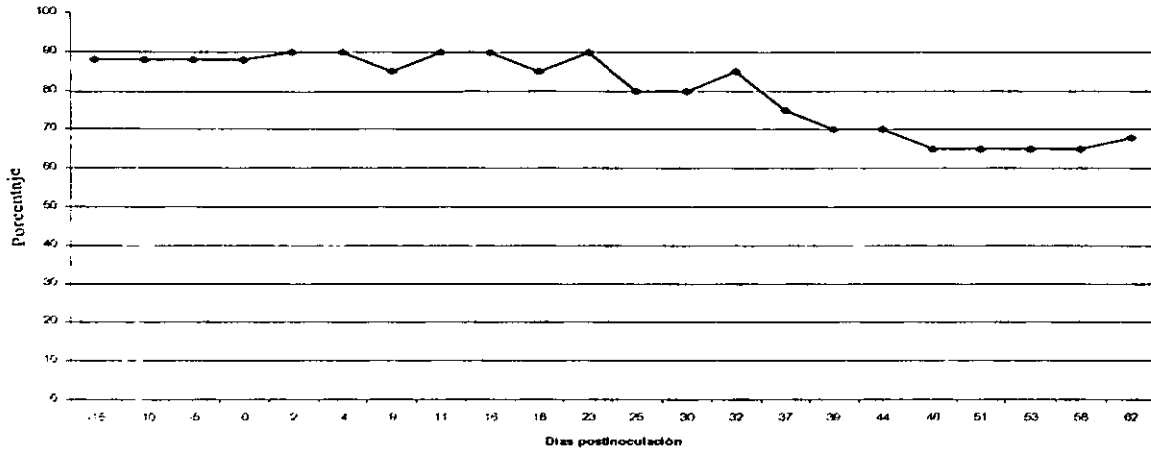
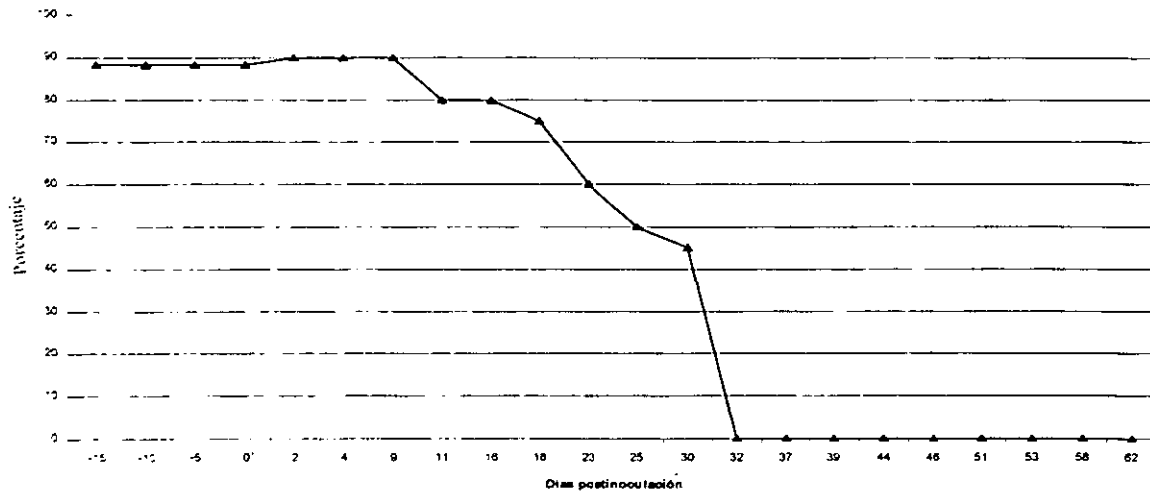
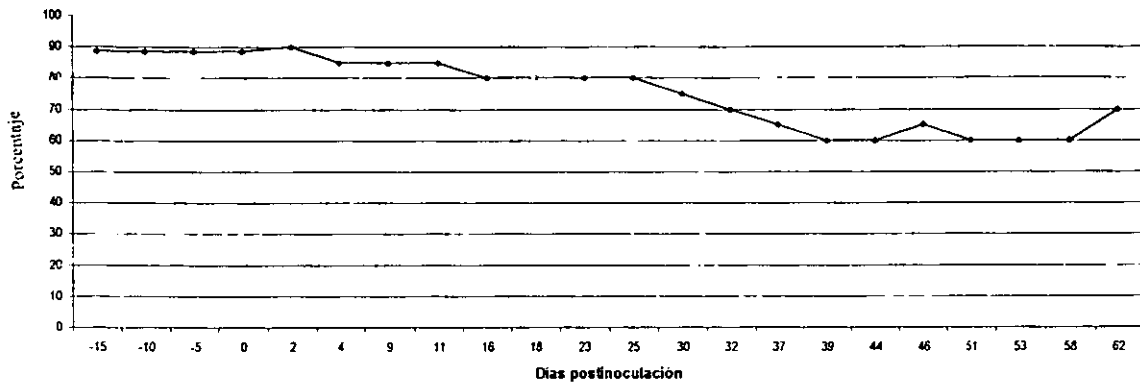


Figura O. PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMENTAL "C" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino



**Figura P. PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMENTAL "D" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



**Figura Q. PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DEL SEMENTAL "E" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**

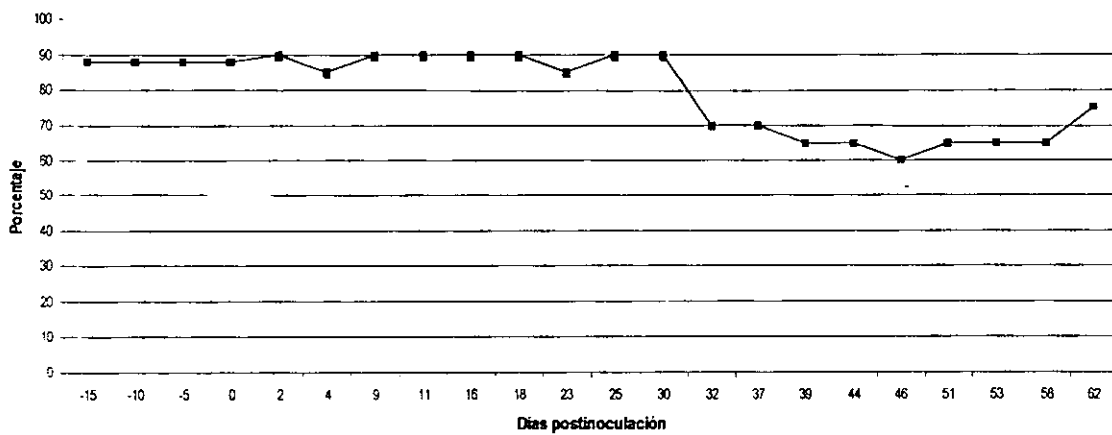


Figura R. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA/ml DEL SEMENTAL "A" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

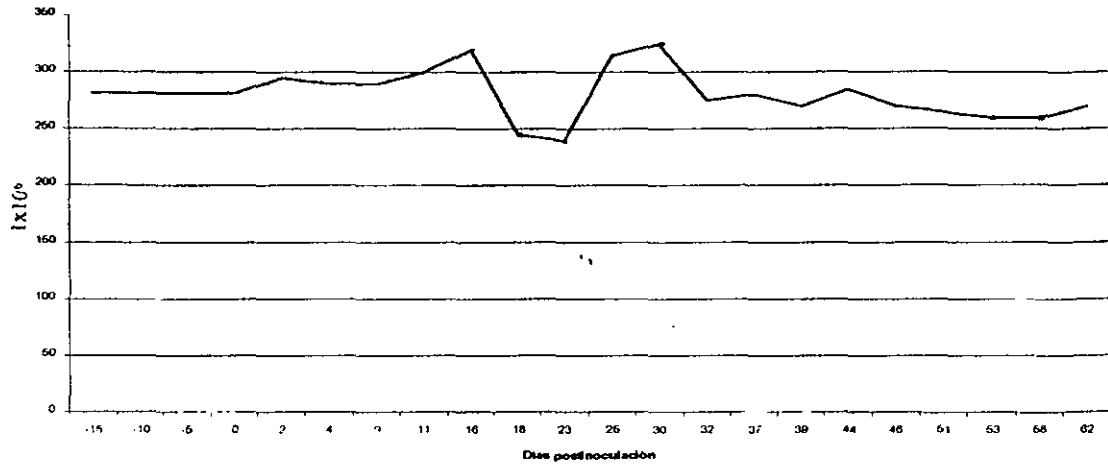


Figura S. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA/ml DEL SEMENTAL "B" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

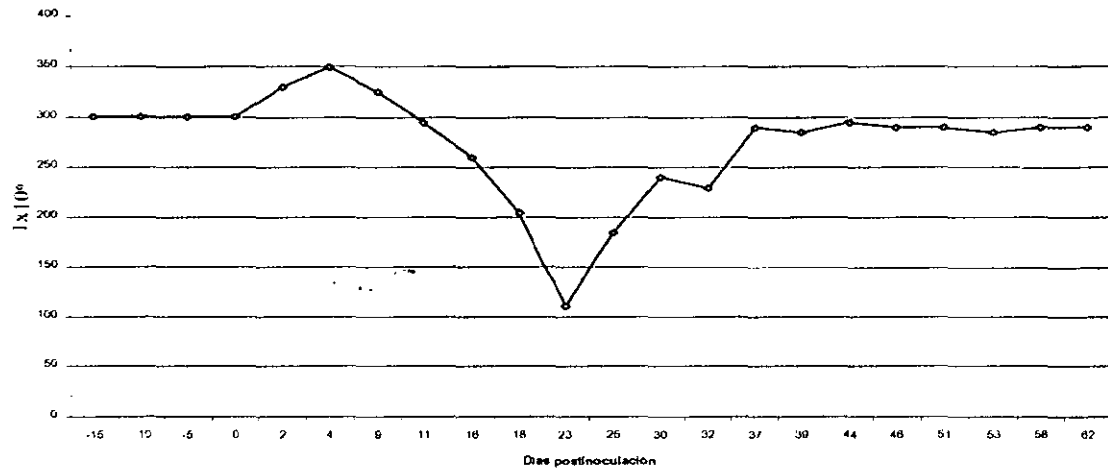


Figura T. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA/ml DEL SEMENTAL "C" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino



Figura U. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA/ml DEL SEMENTAL "D" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

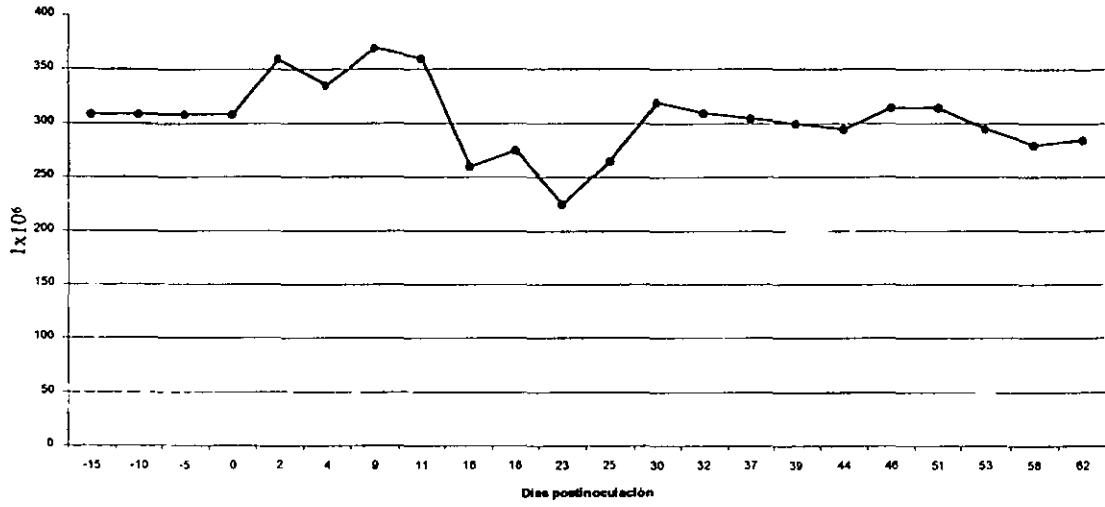


Figura V. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA/ml DEL SEMENTAL "E" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

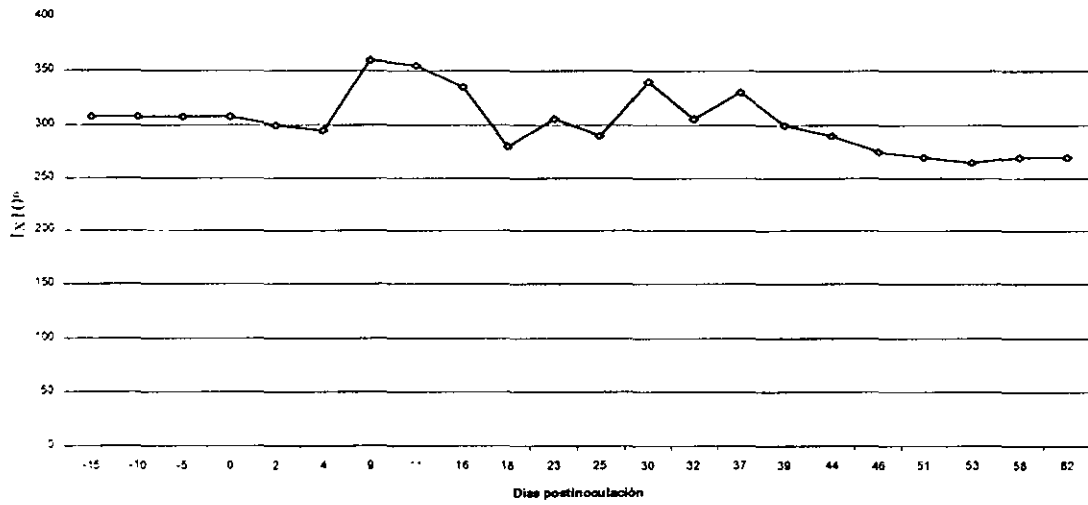


Figura W. PORCENTAJE DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS DEL SEMENTAL "A" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

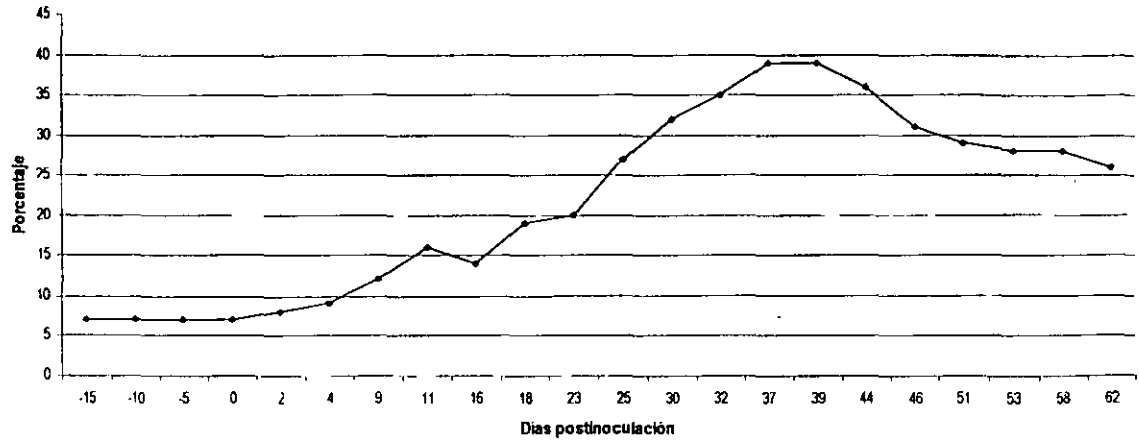


Figura X. PORCENTAJE DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS DEL SEMENTAL "B" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

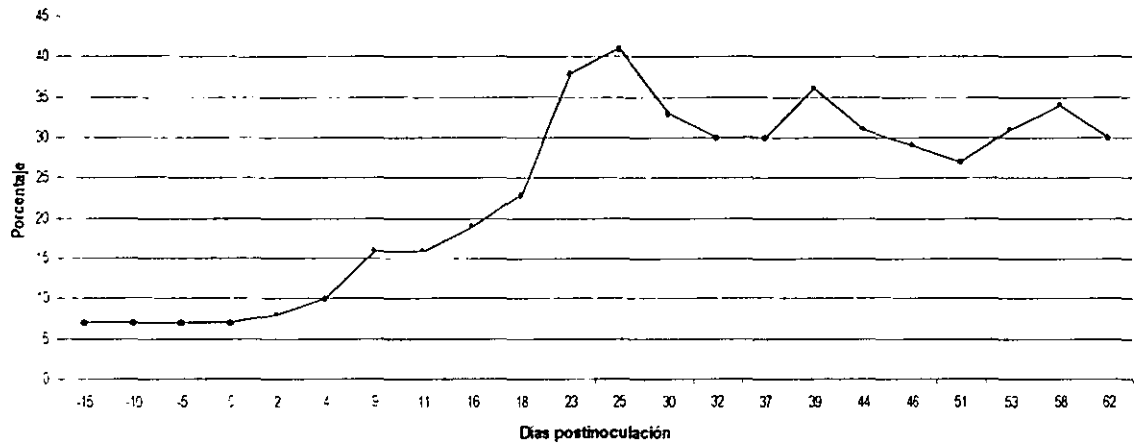


Figura Y. PORCENTAJE DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS DEL SEMENTAL "C" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

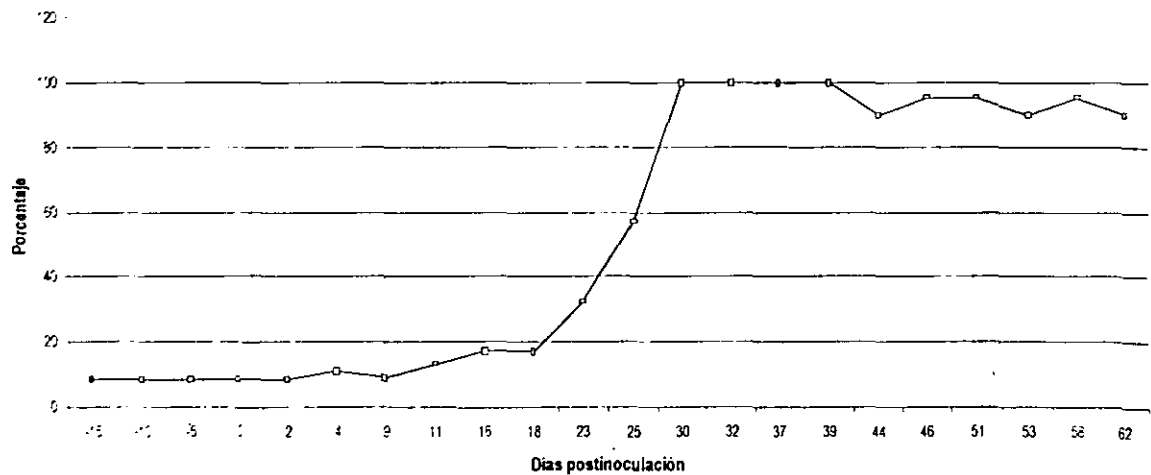




Figura Z. PORCENTAJE DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS DEL SEMENTAL "D" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

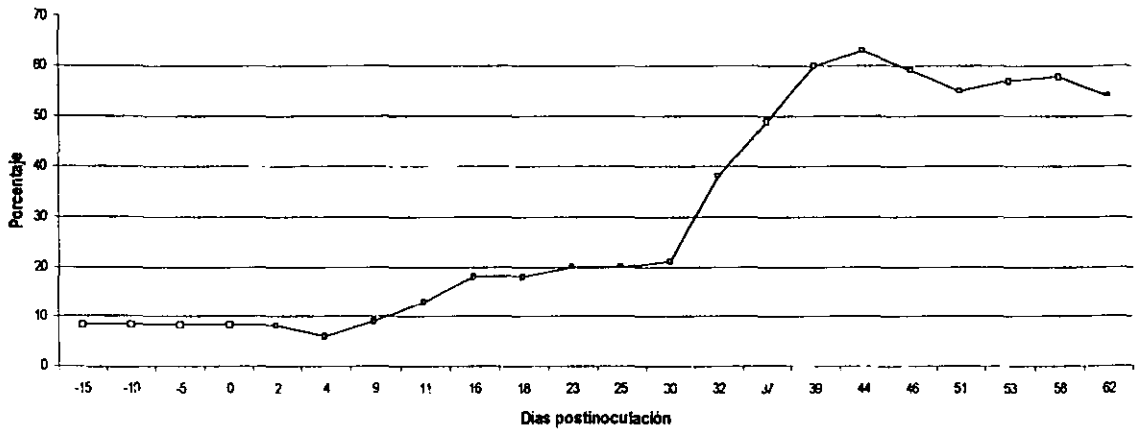
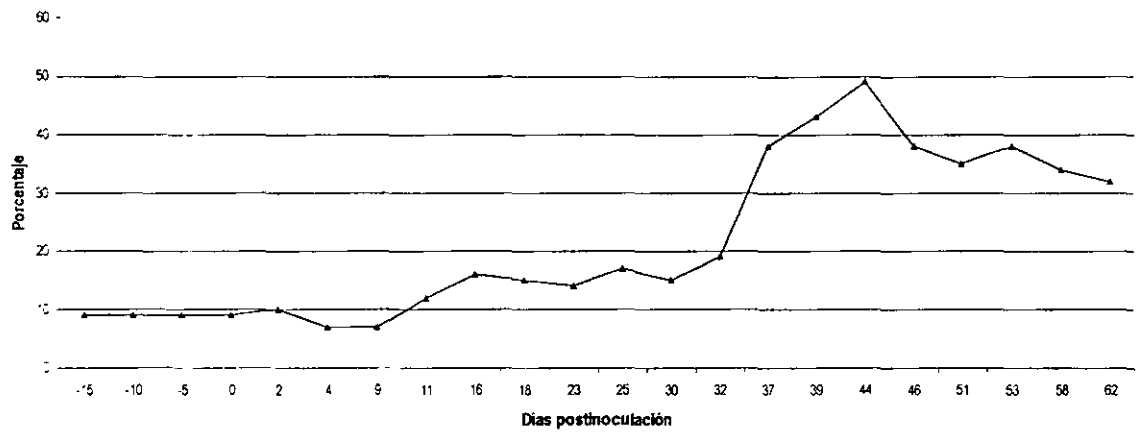
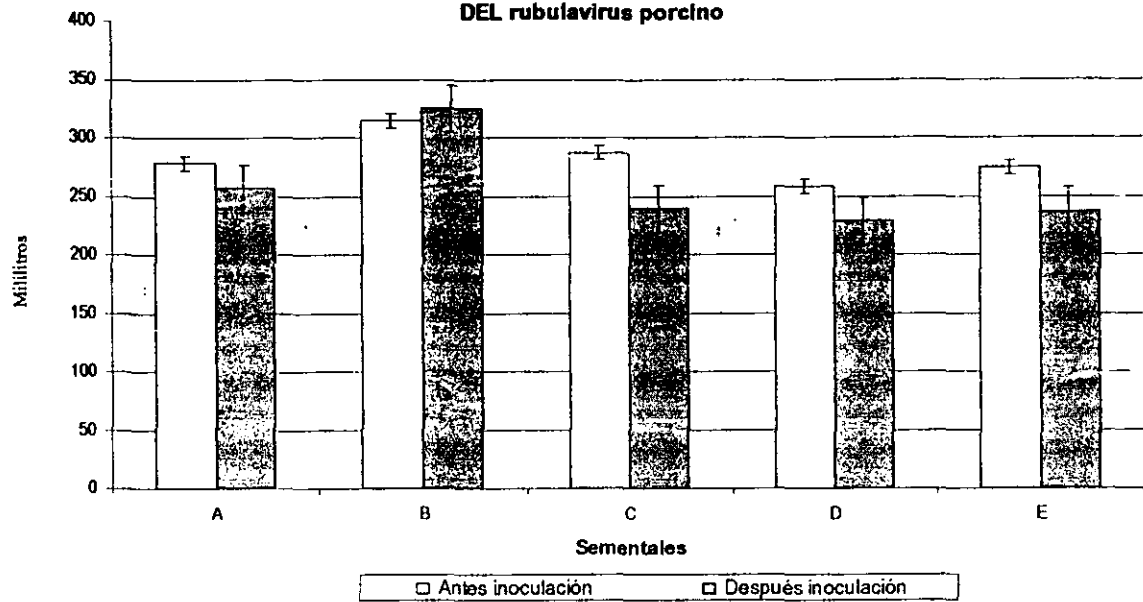


Figura ZZ. PORCENTAJE DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS DEL SEMENTAL "E" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

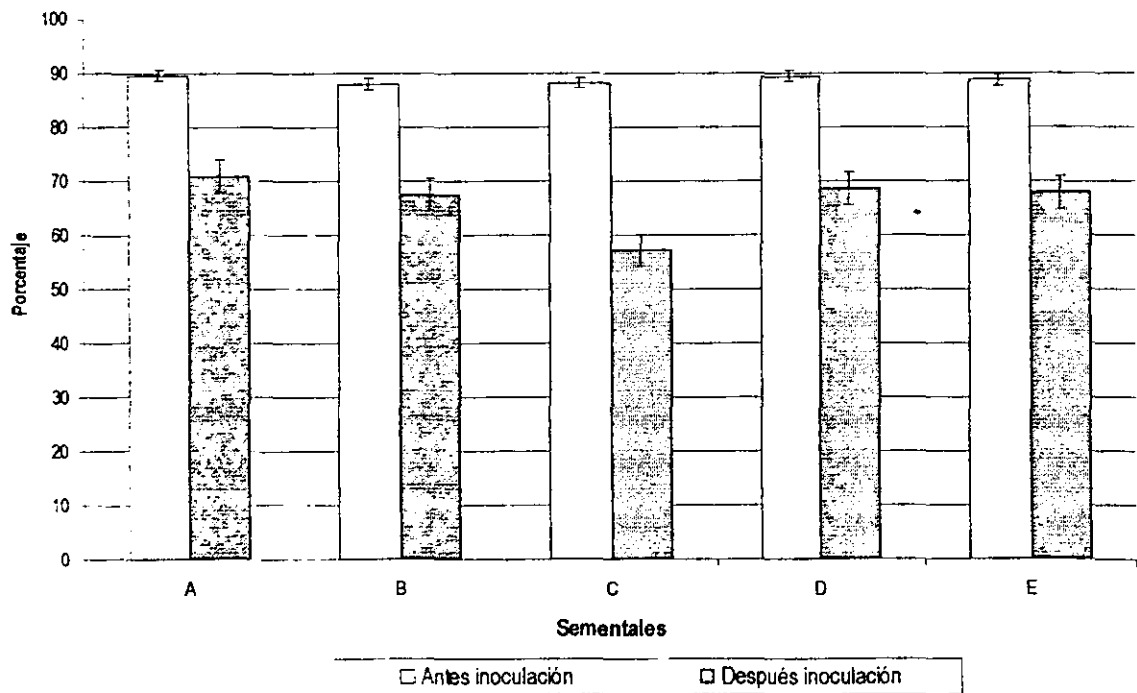


**Figura 1. VOLUMEN DEL EYACULADO DE LOS CINCO VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



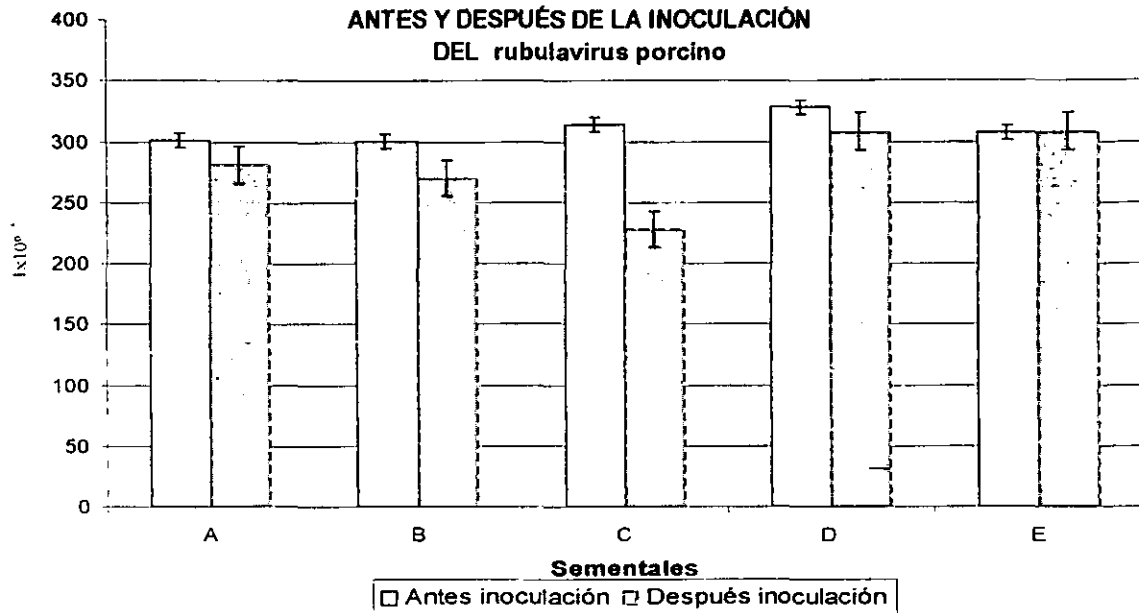
\*Se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar antes (40 eyaculados/semantal) y después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semantal).

**Figura 2. PORCENTAJE DE MOTILIDAD ESPERMÁTICA DE LOS CINCO VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



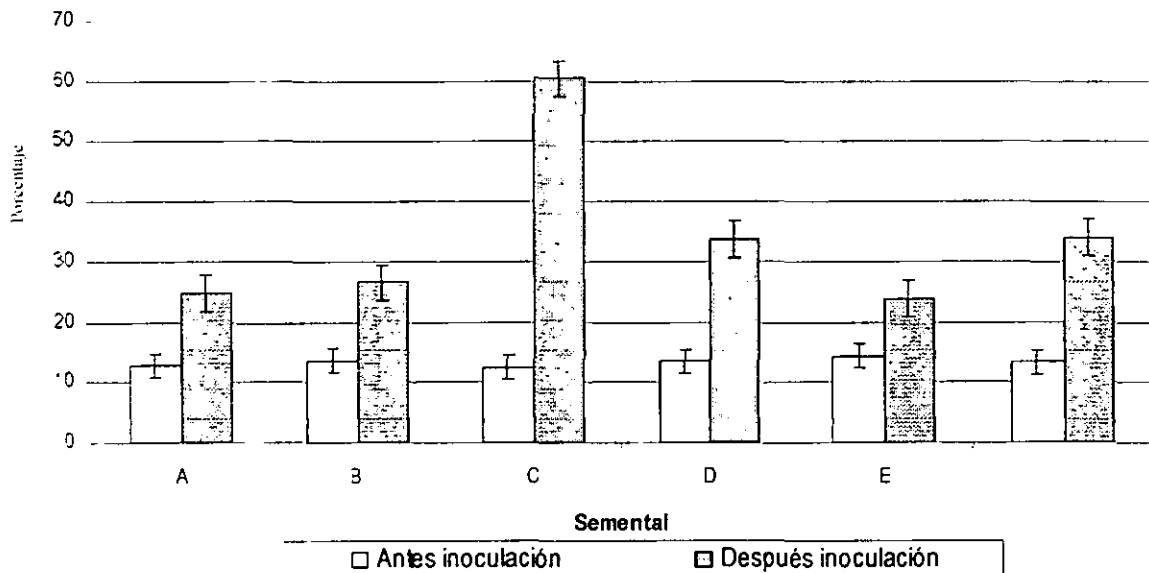
\*Se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar antes (40 eyaculados/semantal) y después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semantal).

**Figura 3. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA/MI DE SEMEN DE LOS CINCO VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



\*Se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar antes (40 eyaculados/semantal) y después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semantal).

**Figura 4. PORCENTAJE DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS DE LOS CINCO VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



\*Se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar antes (40 eyaculados/semantal) y después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semantal).

Figura 5. ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS PRIMARIAS IDENTIFICADAS EN LOS CINCO SEMENTALES ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

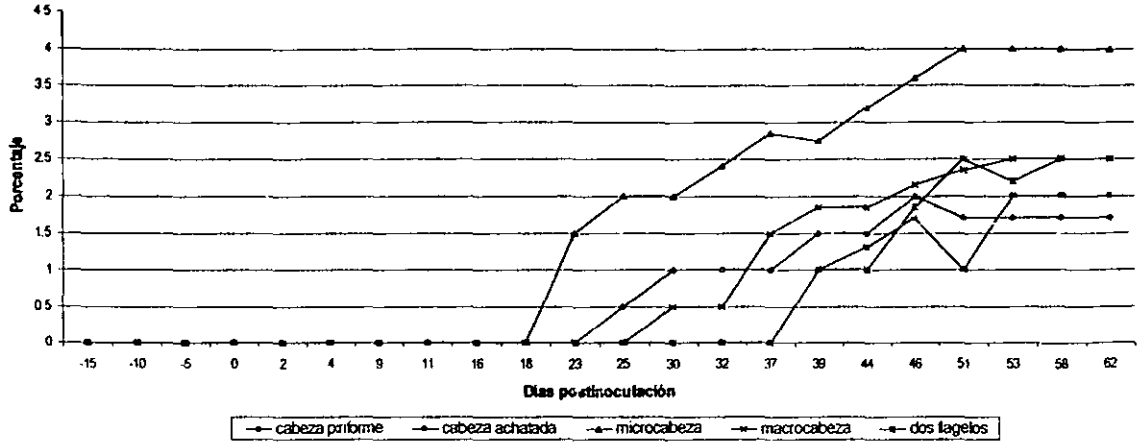


Figura 6. ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS SECUNDARIAS IDENTIFICADAS EN LOS CINCO SEMENTALES ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

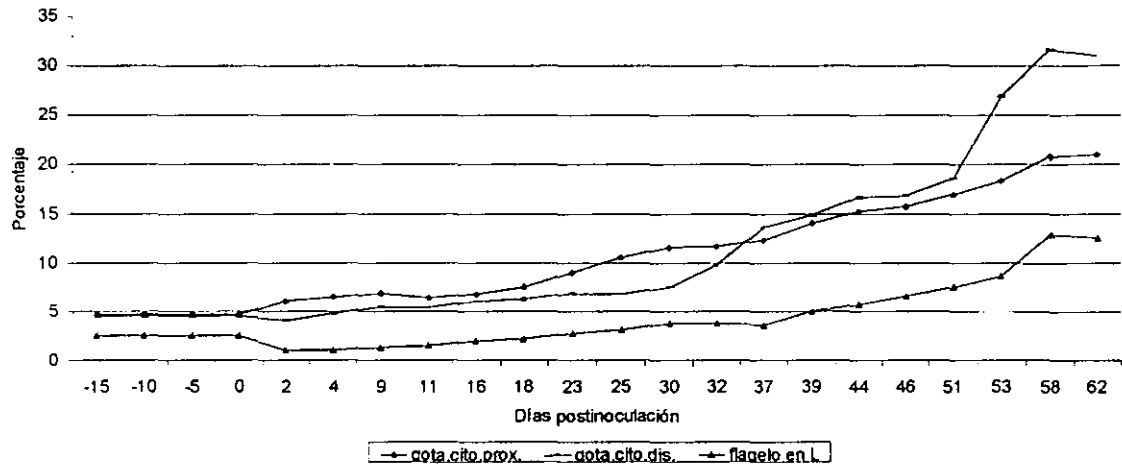
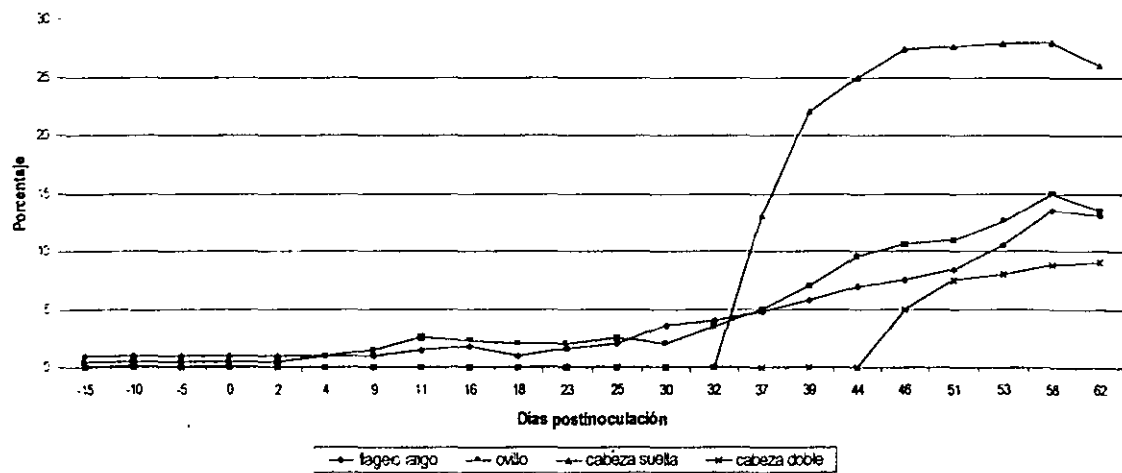
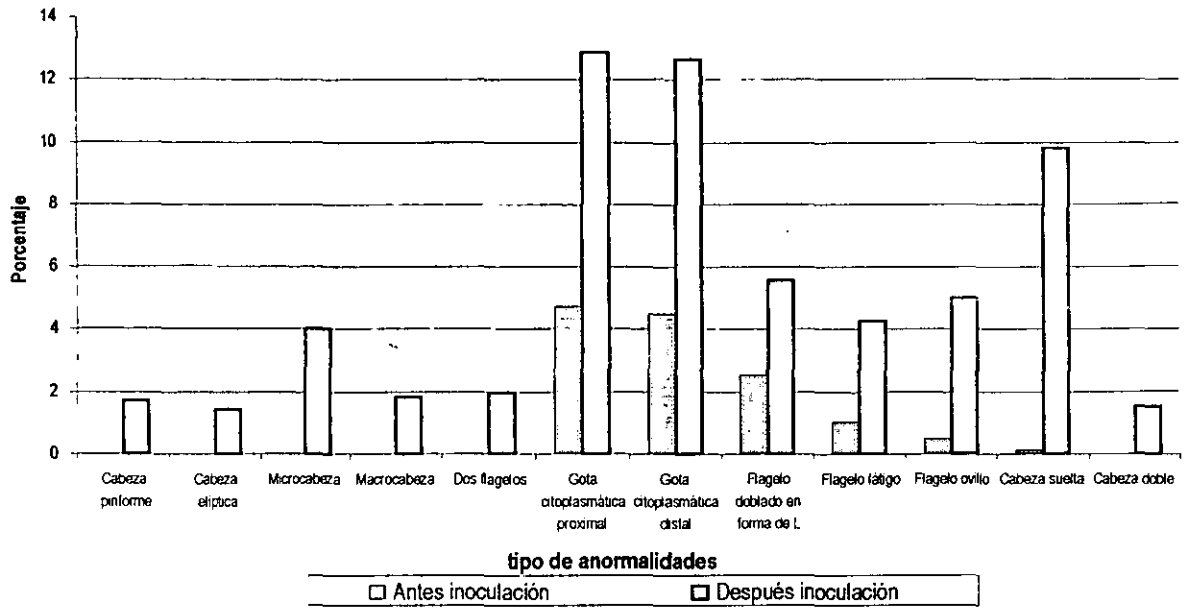


Figura 7. ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS SECUNDARIAS IDENTIFICADAS EN LOS CINCO SEMENTALES ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino

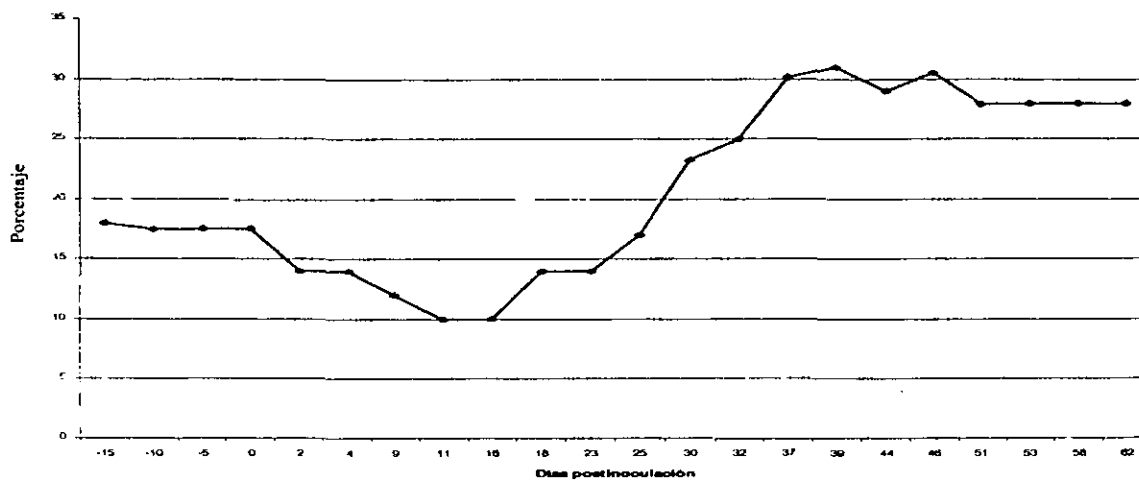


**Figura 8. TIPO DE ANORMALIDADES ESPERMÁTICAS IDENTIFICADAS EN LOS VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**

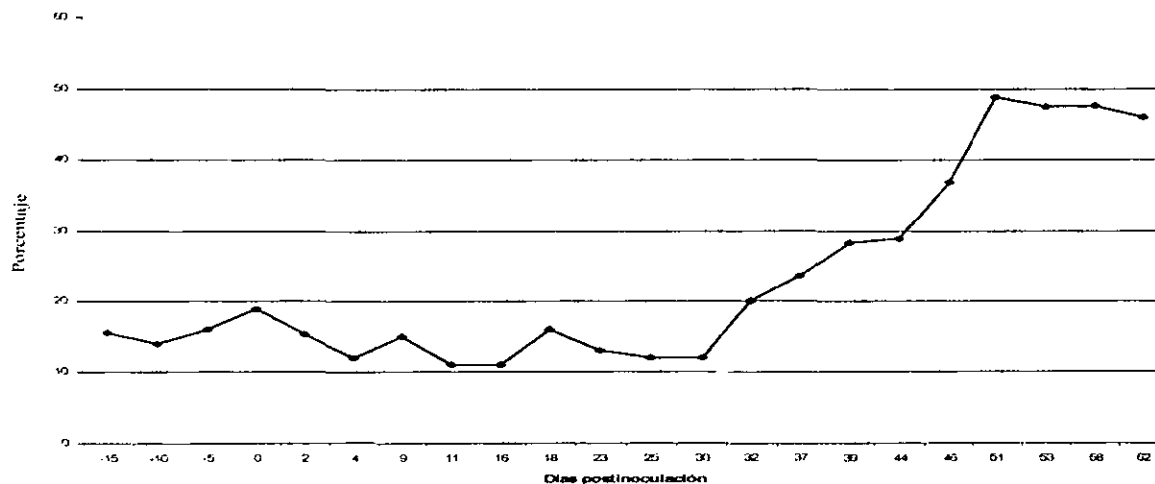


\*Se obtuvieron los promedios antes (40 eyaculados/semental) y después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semental).

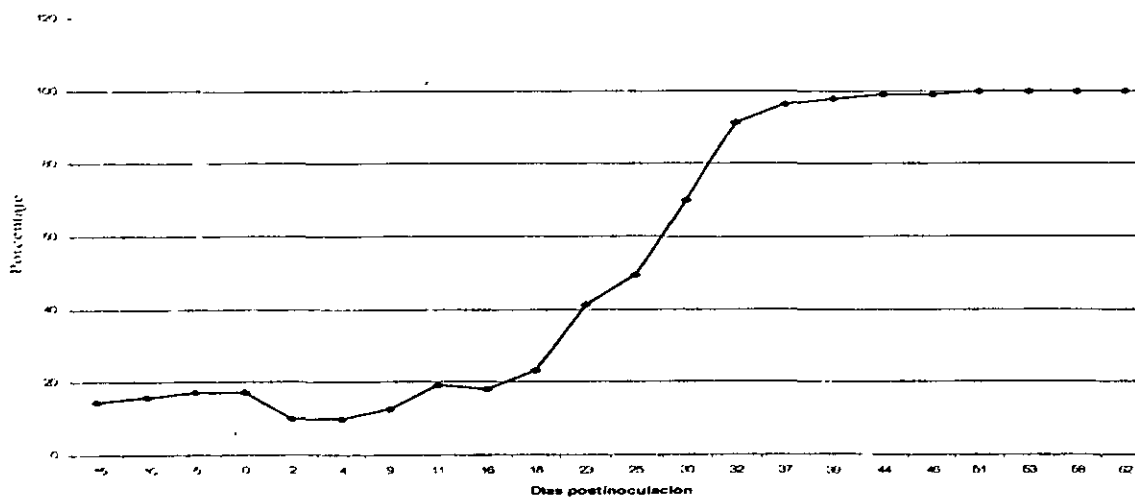
**Figura 9. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS DEL SEMENTAL "A" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



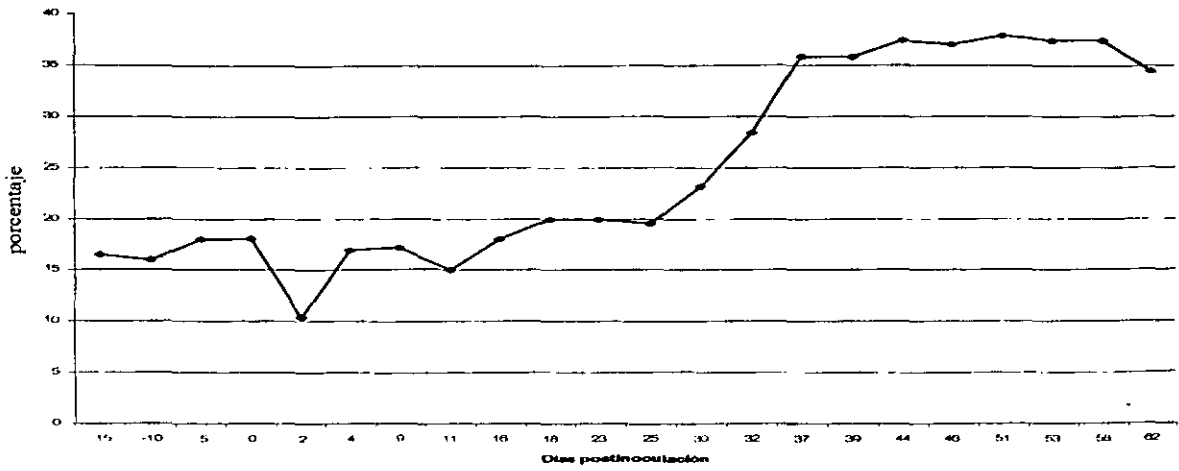
**Figura 10. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS DEL SEMENTAL "B" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



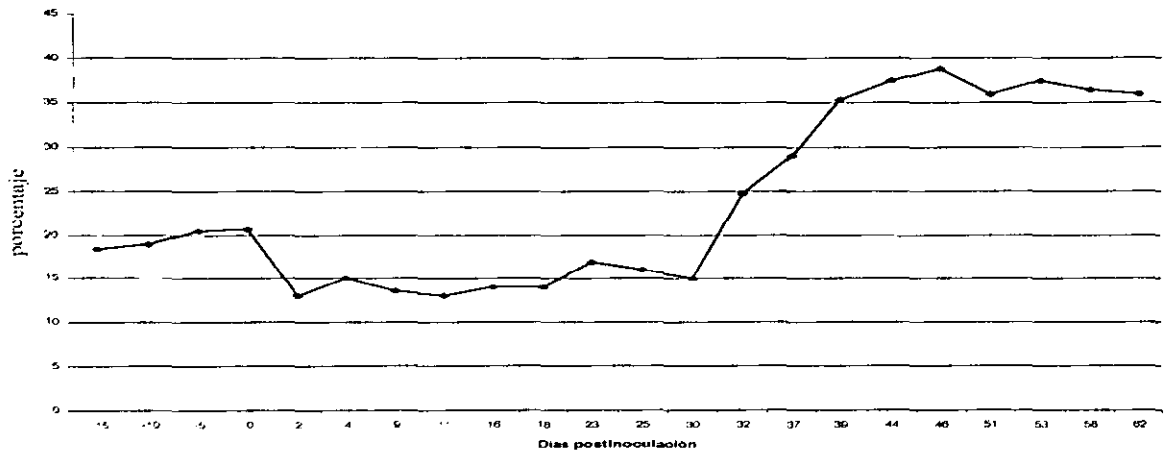
**Figura 11. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS DEL SEMENTAL "C" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



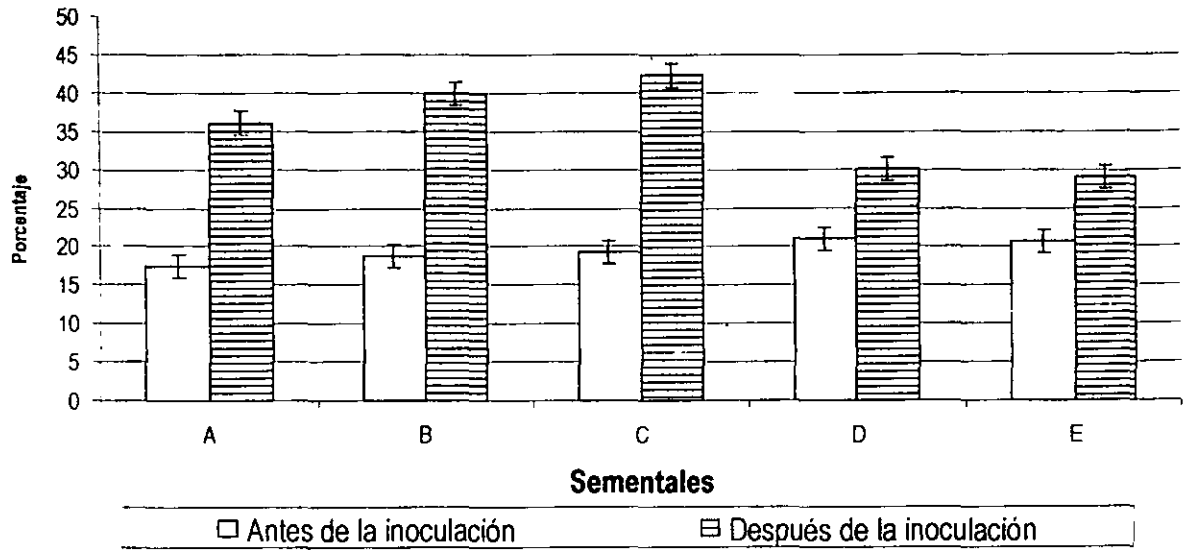
**Figura 12. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS DEL SEMENTAL "D" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



**Figura 13. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS DEL SEMENTAL "E" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



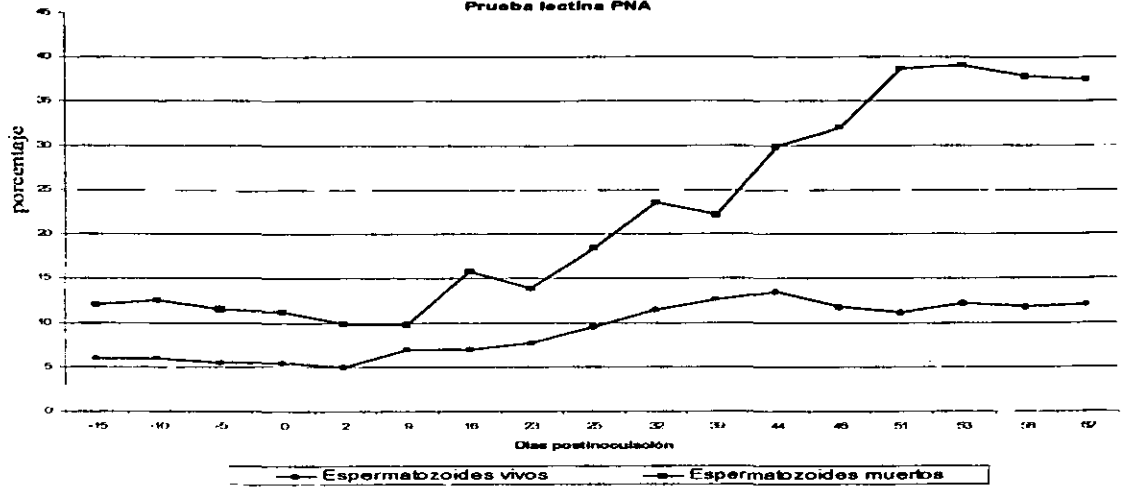
**Figura 14. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS DE LOS CINCO VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**



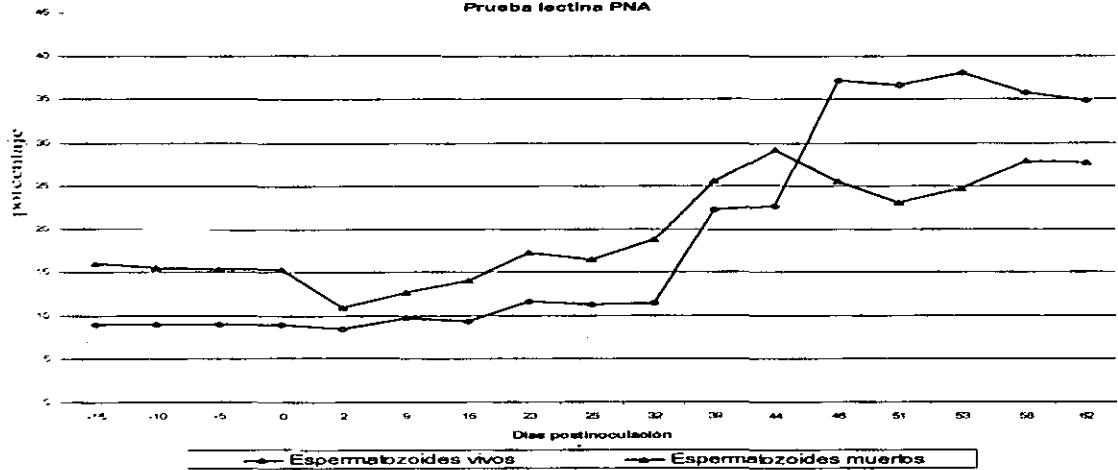
\*Se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar antes (40 eyaculados/semental) y después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semental).



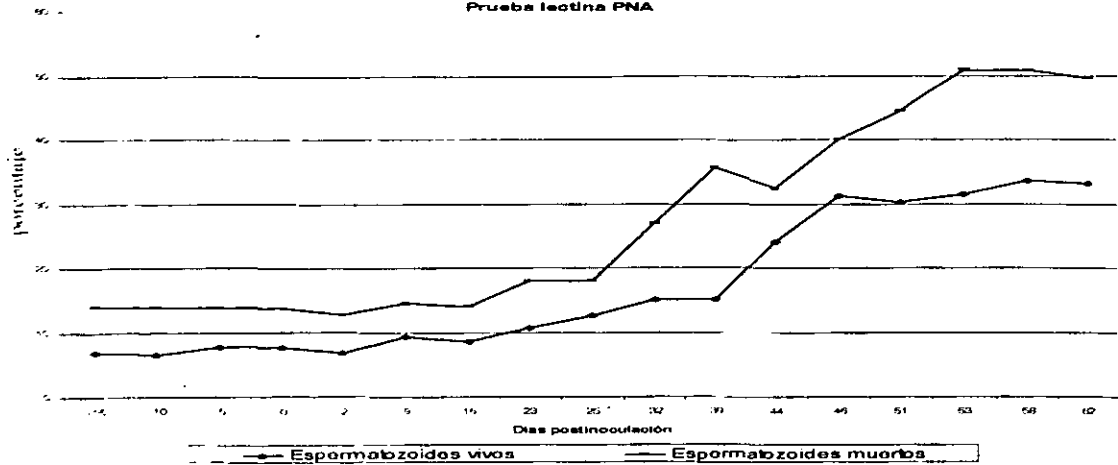
**Figura 15. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS CON DAÑO ACROSOMAL DEL SEMENTAL "A" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**  
Prueba lectina PNA



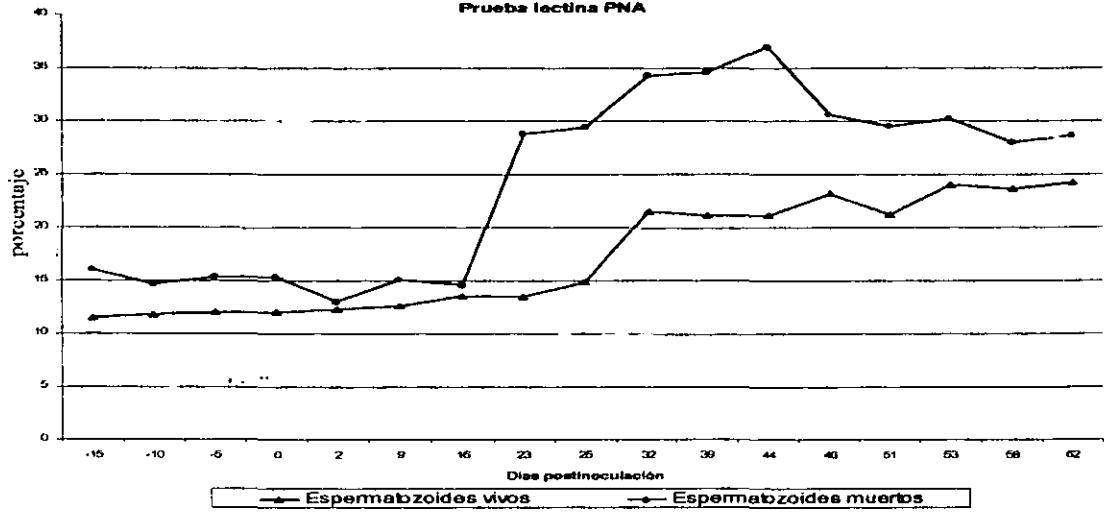
**Figura 16. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS CON DAÑO ACROSOMAL DEL SEMENTAL "B" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**  
Prueba lectina PNA



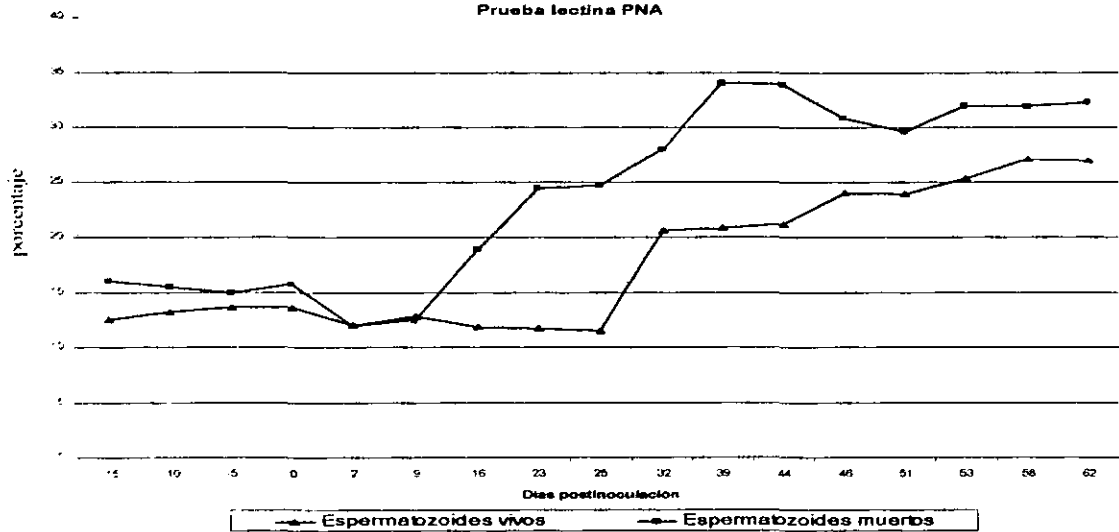
**Figura 17. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS CON DAÑO ACROSOMAL DEL SEMENTAL "C" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**  
Prueba lectina PNA



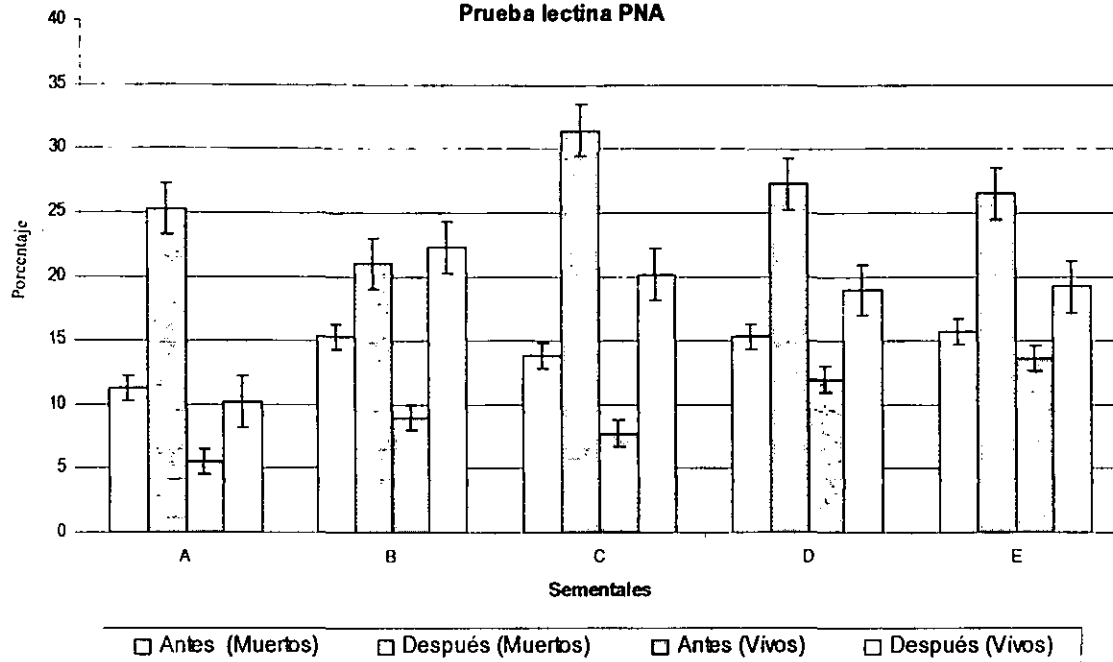
**Figura 18. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS CON DAÑO ACROSOMAL DEL SEMENTAL "D" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**  
Prueba lactina PNA



**Figura 19. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS CON DAÑO ACROSOMAL DEL SEMENTAL "E" ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino**  
Prueba lactina PNA

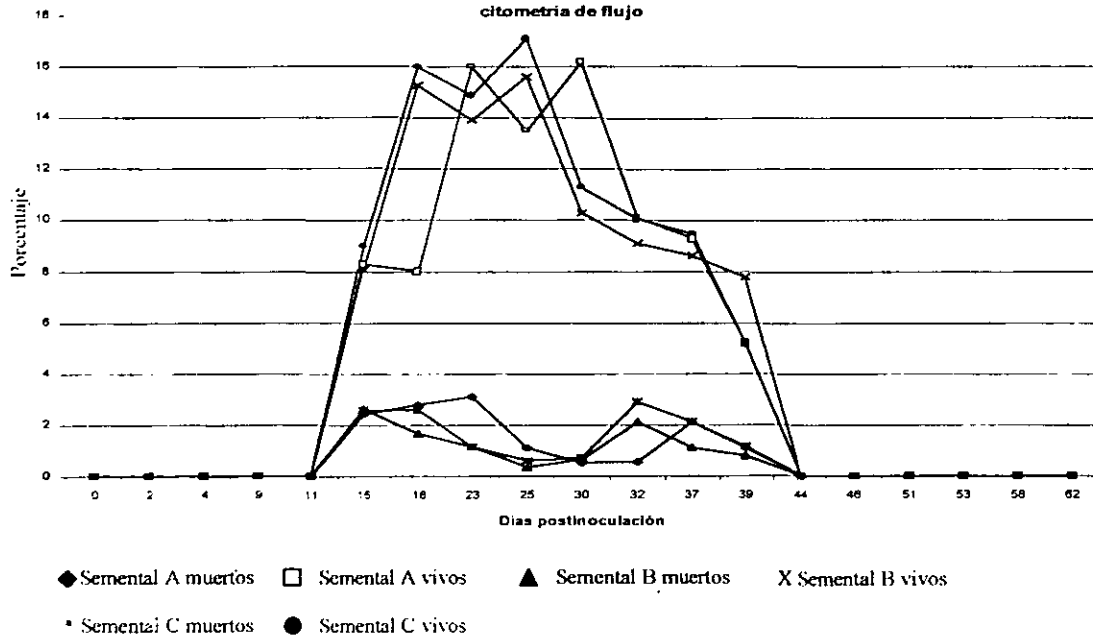


**Figura 20. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS CON DAÑO ACROSOMAL DE LOS CINCO VERRACOS ANTES Y DESPUÉS DE LA INOCULACIÓN DEL rubulavirus porcino Prueba lectina PNA**

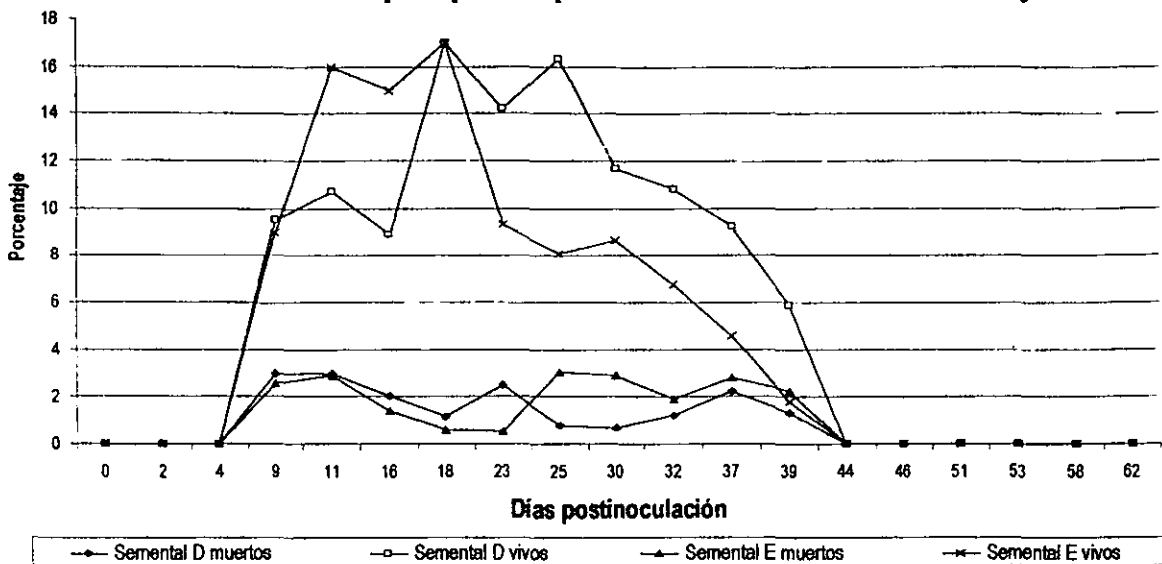


\*Se obtuvieron los promedios y desviaciones estándar antes (40 eyaculados/semantal) y después de la inoculación del virus (18 eyaculados/semantal).

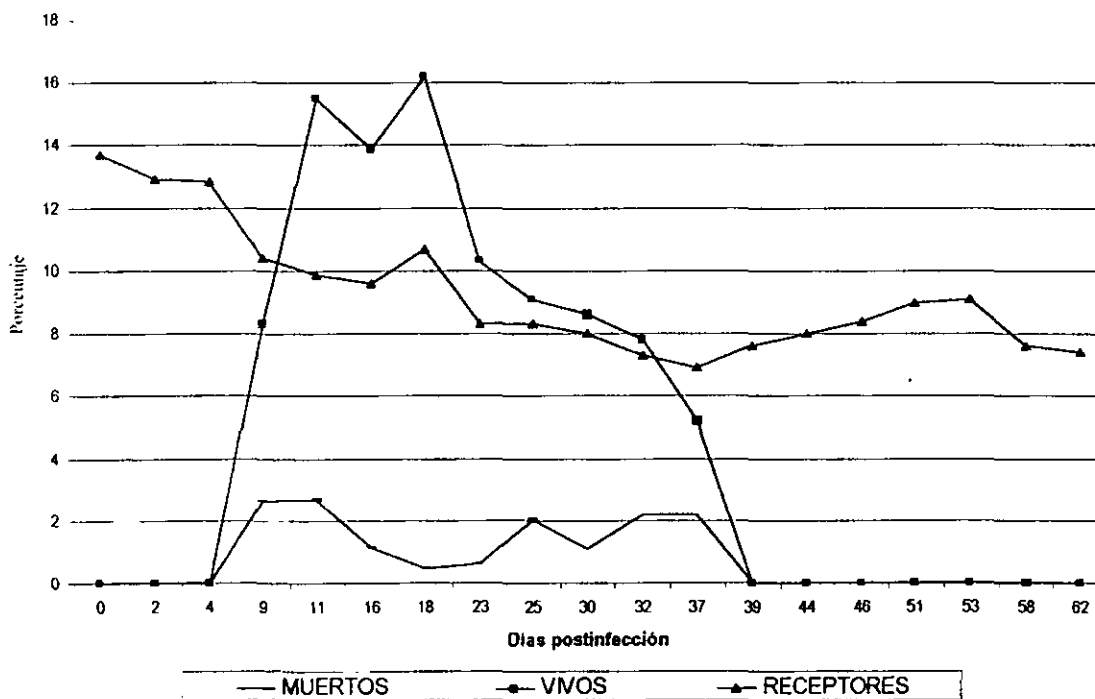
**Figura 21. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS POSITIVOS AL rubulavirus porcino EN LOS SEMENTALES A, B Y C. Utilizando anticuerpos específicos para el virus a través de citometría de flujo**



**Figura 22. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES VIVOS Y MUERTOS POSITIVOS AL rubulavirus porcino DE LOS SEMENTALES D Y E. Utilizando anticuerpos específicos para el virus a través de citometría de flujo**



**Figura 23. PORCENTAJE DE ESPERMATOZOIDES POSITIVOS AL VIRUS Y RECEPTORES CELULARES DETECTADOS A TRAVÉS DE LA LECTINA MAA**



## REFERENCIAS

- 1.- Stephano HA, Gay GM, Ramírez TC, Maqueda AJJ. Estudio de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias XVII Convención AMVEC; 1981 Ixtapa, (Guerrero), México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1981: 44-51.
- 2.- Ojeda ZP, Diosdado VF, González VD, Campomanes CA, Hernández-Jauregui P, Mercado PM, Moreno LJ, Morilla GA. Estudio comparativo de tres pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad del ojo azul. Memorias XXXIV Convención AMVEC, Querétaro (Querétaro), México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1998: 216.
- 3.-Correa GP, Pérez SJ, Martínez LA, Coba AMA, Córdoba LD. Encuesta para detectar cerdos finalizados seropositivos al rubulavirus porcino por inhibición de la hemaglutinación (IH) y seroneutralización (SN). Memorias XXXIV Convención AMVEC, Querétaro (Querétaro), México (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1998: 218.
- 4.- Zermeño MF. Evaluación de las características testiculares y seminales después de un brote de la enfermedad del ojo azul por paramyxovirus en verracos. (tesis licenciatura). D.F. (México): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1994.
- 5.- Fuentes RM, Carreón NR, Ramírez MH, Trujillo ME, Fraire BI. Estudio piloto de la frecuencia de anticuerpos contra el paramixovirus del Ojo Azul en cerdos de la República Mexicana. Vet Mex 1992; 23: 37.
- 6.- Ramírez MH, Hernández JP, Reyes LJ, Zenteno E, Moreno LJ, Kennedy S. Lesions in the Reproductive Tract of Boars Experimentally Infected with Porcine Rubulavirus. J Comp Path 1997; 117: 237-252.
- 7.-Stephano HA, Gay GM, Ramírez TCA. Encephalomyelitis reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs associated with paramyxovirus infection. Vet Rec 1988; 122: 6-10.
- 8.- Moreno LJ, Correa GP, Martínez LA, Ericsson A. Characterization of a Paramyxovirus isolate from the brain of a piglet in Mexico. Arch Virol 1986; 91: 221-231.

- 9.- Reyes Leyva JR. Mecanismos de respuesta al Paramixovirus porcino LPM (tesis de doctorado).D.F. (México): Facultad de Medicina. UNAM, México, 1998.
- 10.- Stephano HA, Gay GM. Encefalitis, falla reproductiva y opacidad corneal. Ojo Azul. Sínt porc 1986; 5: 25-39.
- 11.- Flores JJ, López MR, Fuentes RM, Ramírez MH. Inoculación experimental del paramyxovirus del ojo azul (POA) en el pecarí de collar (*Dicotyles tajacu*) XXVII Congreso Nacional AMVEC Acapulco (Guerrero), México (DF): 1992: 8-9.
- 12.- Stephano HA. El síndrome del ojo azul en cerdos. Sínt porc 1985; 4: 42-49.
- 13.- Stephano HA, Gay M, Kreese J. Properties of a paramyxovirus associated to a new syndrome (blue eye syndrome) characterized by encephalitis, reproductive failure and corneal opacity. Proc 9<sup>th</sup> IPVS Congress, 1986 July 15-18; Barcelona Spain. 1986: 455.
- 14.- Ramírez MH, Carreón NR, Mercado GC, Rodríguez TJ. Hemoaglutinación e inhibición de la hemaglutinación del Paramixovirus porcino a través de la modificación de algunas variables que participan en la prueba. Vet Mex 1996; 27: 257-259.
- 15.- Linné T, Berg M, Bergvall AC, Hjertner B, Moreno-López J. 1992. The Molecular Biology of the Porcine Paramyxovirus LPMV. Vet Microbiol 1992; 33: 263-273.
- 16.- Lamb RA, Kolakofsky D . 1996. Paramyxoviridae: The virus and their replication. Virology 3<sup>a</sup> Lippincott- Raven Publishers, 1996: 1177-1204.
- 17.- Sundqvist A, Ver M, Hernández JP, Linne T, Moreno LJ. The structural proteins of a porcine paramyxovirus (LPMV) J. Gen Virol 1990; 71: 609-613.
- 18.- Ray R, Compans R. Paramyxovirus. In: Van Regenmortel MHV. Immunochemistry of viruses II. The Basis for serodiagnosis and vaccines. Elsevier Science Publishers B.V. 1990: 217-236.
- 19.- Morrison TG. Structure, function and intracellular processing of Paramyxovirus membrane proteins. Virus Res 1988; 10: 113-136.
- 20.- Berg M, Hertner B, Moreno LJ, Linné T. The P gene of the porcine Paramyxovirus LPMV encodes three possible polipeptides, P, V and C; the protein mRNA is edited. J Gen Virol 1992; 73: 1195-1200.

- 21.- Zenteno CR, Hernández JP, Espinoza B, Reyes LJ, Zenteno E. Secondary structure prediction of hemagglutinin-neuraminidase from porcine rubulavirus. *Arch Virol* 1998; 143.
- 22.- Kingsbury WD. Paramyxoviridae and their replication. *Virology*. Raven Press. New York 1991: 507-522.
- 23.- Huang J, Rott R, Wahn K, Klenk H-D, Kohama T. The function of the neuraminidase in membrane fusion induced by Myxoviruses. *Virology* 1980; 107: 313-319.
- 24.- Kingsbury WD. Paramyxoviridae and their replication. *Virology*, 2<sup>nd</sup> ed. Raven Press. New York. 1990: 945-961.
- 25.- Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL. *Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Vienna, New York: Springer-Verlag. 1995: 265-274.
- 26.- Stephano HA, Gay GM. El síndrome del Ojo Azul en cerdos. *Avances en las enfermedades del cerdo*. AMVEC. México 1985: 299-311.
- 27.- Correa GP, Martínez LA, Ericsson A, Moreno LJ. Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of piglet in Mexico. *Proc. 9<sup>th</sup> IPVS Congress*; 1986 July 15-18; Barcelona, Spain. 1986:205.
- 28.- Gay GM, Stephano HA, Vergara LI M. Determinación de anticuerpos contra un virus aislado en cerdos afectados con el síndrome del ojo azul en sueros de perros en contacto. *Memorias de XX Congreso Reunión Nacional AMVEC*; 1995 Mérida (Yucatán), México. (DF): Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos, 1985: 69-70.
- 29.- Flores JJI. Inoculación experimental del Paramixovirus del Ojo Azul (POA) en el pecaí de collar (*Dicotyles tajacu*) (tesis licenciatura). D.F.(México): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1991.
- 30.- Cuetero RS, Ramírez MH, Carreón NR, Campuzano GJ. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. *Vet Mex* 1995; 26: 231-236.
- 31.- Arellanes AEC. Inoculación experimental del Paramixovirus de ojo azul en el gato doméstico (*Felis catus*) (tesis licenciatura). D.F. (México): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1992.
- 32.- Rosales EF, Correa GP. El síndrome del ojo azul. *Tec. Pec. Méx*, 1989; 27: 101-116.

- 33.- Martínez LAC, Correa GP, Rosales EJAF, Vásquez PCG, Garibay SM. Curva de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el paramixovirus porcino de la Piedad, Michoacán, en cerdos de una granja de ciclo completo. *Téc Pec Méx* 1987; 25: 163-167.
- 34.- Stephano HA, Gay GM. El síndrome de ojo azul. Una nueva enfermedad en cerdos asociados a un paramixovirus. *Vet Mex* 1986; 17: 120-122.
- 35.-Pérez F, Stephano HA, Gay M. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus del Ojo Azul. *Memorias de XXIII Congreso AMVEC*; 1988; León (Guanajuato), México (DF): 1988: 81-83.
- 36.- Stephano HA. Blue Eye Disease. Straw BE, Allaire SD, Men WL, Taylor DJ, editors. *Diseases of Swine*. Iowa U.S.A.: Iowa State University Press, 1999: 103-112.
- 37.- Reyes-Leyva J, Espinosa B, Hernández J, Zenteno R, Vallejo V, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E. NeuAcalpha 2,3 gal-glycoconjugate expression determines cell susceptibility to the porcine rubulavirus LPMV. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 1997; 118: 327-32.
- 38.- Hernández J, Reyes-Leyva J, Zenteno R, Ramírez H, Hernández-Jáuregui P, Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult swine. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 64: 367-81.
- 39.- Zenteno-Cuevas R, Hernández J, Espinosa B, Reyes J, Zenteno E. Secondary structure prediction of the hemagglutinin-neuraminidase from a porcine rubulavirus. *Arch Virol* 1998; 143: 333-52.
- 40.- Martín Rillo S, Martínez E, García AC, De Alba C. Boar semen evaluation in practise. *Reprod Dom Anim* 1996; 31: 519-526.
- 41.- Hughes P, Varley M. *Reproduction in the pig*. London: Butterworth & Co (Publishers), 1980.
- 42.- Thacker BJ, Larsen RE, Joo HS, Leman AD. Swine diseases transmissible with artificial insemination. *JAVMA* 1984; 185: 511-516.
- 43.- Larsen RE, Shope RE, Leman AD, Kurtz HJ. Semen changes in boars after experimental infection with Pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 1980; 41: 733-739.



- 44.- Glossop CE. Disease transmission in boar semen. Allen D. Leman Swine Conference; Minnesota 1995; 22: 97-100.
- 45.- Gradil C, Molitor T, Harding M, Crabo B. Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. *Am J Vet Res* 1990; 51: 359-362.
- 46.- Thacker B, Joo HS, Leman A, Barnes D. Studies on porcine parvovirus infection in boars. Proc. of the 7<sup>th</sup> International Pig Veterinary Society Congress México; 1980 July 26-31 México, 1980: 189.
- 47.- Hennigns JC, Nelson EA, Hines RJ. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adults boars. *J Vet Diagn Invest* 1995; 7: 456-464.
- 48.- Swenson SL, Hill TH, Zimmerman JJ. Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *JAVMA* 1994; 204: 1943-1948.
- 49.- Hafez ESE. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6<sup>a</sup> ed. Interamericana McGraw-Hill, 1996.
- 50.- Frankenhuis MT, Kramer MF, Rooij DG. Spermatogenesis in the boar. *The Veterinary Quartely* 1982, 4: 57-61.
- 51.- Pérez-Pérez R, Martí AI, Tejedor T, Muiño-Blanco, Cebrián-Pérez JA. Sperm-lectin agglutination combined with swim-up leads to an efficient selection of highly motile, viable and heterogeneous ram spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51: 623-636.
- 52.- Lee MCH, Damjanov I. Lectin Binding Sites on Human Sperm and Spermatogenic cells. *The Anatomical Record* 1985; 212: 282-287.
- 53.- Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA, Plummer JM, Watson PF. Flow cytometric detection of bicarbonate-induced changes in lectin binding in boar and ram sperm populations. *Mol Reprod Dev* 1995; 40: 164-176.
- 54.- Pinart E, Camps R, Briz MD, Bonet S, Egozcue J. Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism: structural and ultrastructural study of sperm morphology. *Anim Reprod Sci* 1998; 49: 247-268.

- 55.- Bonet S, Briz M, Fradera A. Estudio comparativo entre la morfología espermática del eyaculado de verracos sometidos a extracciones de semen cada dos días y la morfología del esperma procedente de las tres regiones epididimarias. *Anaporc* 1993; 129: 5-17.
- 56.- Bonet S, Pinart E, Briz M, Sancho S, Escuder M. Aporiación al conocimiento de la criptorquidia espontánea abdominal y unilateral en porcino: análisis microscópico del eyaculado. *Anaporc* 1998; 178: 91-112.
- 57.- Burlenson FG, Chambers TM, Wiedbrauk DL. *Virology: a laboratory manual*. Academic Press, Inc. 1992.
- 58.- Freshney RI. *Culture of animals cells*. 3<sup>rd</sup> ed. Wiley-Liss. Inc., New York, U.S.A. 1994.
- 59.- Ling NR, Catty D. Haemagglutination and hemolysis assays. Catty D., editors. *Antibodies. Vol 1. A. Practical approach*. IRL Press. 1989: 169-188.
- 60.- Gardner PS, Mc Quillen J. *Rapid virus diagnosis application of immunofluorescence*. Butter worth Inc. Great Britain. 1980.
- 61.- Harlow E, Lanne D. *Antibodies: Laboratory manual*. Cold Spring Harbor. NY. USA. 1988.
- 62.- Hames BD, Wood DR. *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*. 2<sup>nd</sup> ed. IRL Press. Oxford England. 1990.
- 63.- Kubus, S.A. *Manual de Inseminación Artificial*. Madrid España: MAR-CAR, 1993.
- 64.- Conejo NJJ. *Manual de Inseminación Artificial del Ganado Porcino, con semen diluido*. Hidalgo, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 1991.
- 65.-Fragoso, VMA. *Manual de Inseminación Artificial en Cerdos (Tesis licenciatura)* D.F. (México): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1993.
- 66.- Magistrini M, Guitton E, Levern Y, Nicolle JC, Vidament M, Kerboeuf D, Palmer E. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. *Theriogenology* 1997; 48: 1229-1235.
- 67.- Sukardi S, Curry MR, Watson P.F. Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim Reprod Sci* 1997; 46: 89-96.

- 68.- Mortimer D, Curtis EF, Miller RG. Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon. *J Reprod Fert* 1987; 81: 127-135.
- 69.- Ravid A, Sagiv M, Bartoov B, Eltes F, Novogrodsky A, Allalouf D, Levinsky H, Singer R. Separation of sub-populations of sperm with higher fertility potential from normal and pathological semen by peanut agglutinin. *Andrologia* 1990; 22: 225-230.
- 70.- Singer R, Sagiv M, Allalouf D, Levinsky H, Malik Z, Novogrodsky A, Servadio C, Ravid A. Separation of normozoospermic human spermatozoa into subpopulations by selective agglutination with peanut agglutinin. *Andrologia* 1986; 18: 17-24.
- 71.- Peña A, Johannisson A, Linde-Forsberg C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 1999; 52: 965-980.
- 72.- Hayat, M.A. Principles and techniques of electron microscopy. Biological applications. 2<sup>a</sup> ed. Baltimore Maryland: University Park Press, 1981.
- 73.- Trump FB, Jones RT. Diagnostic electron microscopy. USA: Jonh Wiley and Sons, 1980.
- 74.- Weakly BS. Biological transmission electron microscopy. 2<sup>a</sup> ed. New York USA: Churchill Livingstone, 1981.
- 75.- Neter J, Wasserman W, Kutner MH. Applied linear statistical models. Third ed. U.S.A.: IRWIN, 1990.
- 76.- Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. 2<sup>a</sup> ed. Tokyo Japan: McGraw-Hill, 1980.
- 77.- Moberg GP. Influence of stress on reproduction: Measure of well-being. Moberg GP, editor. *Animal Stress: American Physiological Society*, 1985: 245-267.
- 78.- Ladds PW. The male reproductive tract. Sims LD, Glastonbury JRW, editors. *Pathology of the pig. A diagnostic guide. Agriculture Victoria*, 1996: 407-422.
- 79.- De Mirjyn A. Inseminación Artificial en granjas porcinas. I Curso internacional de reproducción porcina. México (DF): Academia de investigación en biología de la reproducción A.C., 1997: 35-45.

- 80.- Carreón R, Fuentes M, Stephano A, Ramírez H. Estudios preliminares del paramixovirus del Ojo Azul en la República Mexicana. Memorias del curso de actualización de las enfermedades del cerdo. AMVEC, 1989: 78-82.
- 81 - Gledhill BL. Cytometry of mammalian sperm. *Gamete Research* 1985; 12: 423-438.
- 82.- Rajalakshmi M, Prasad MRN. Changes in the sialic acid content of the accessory glands of the male rat. *J Endocr* 1968; 41: 471-476.
- 83.- Flesch FM, Voorhout WF, Colenbrander B, Van Golde LMG, Gadella BM. Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: A novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol reprod* 1998; 59: 1530-1539.
- 84.- Levinsky H, Allalouf D, Sagiv M, Barnet M, Singer R. Sialic acid content of human spermatozoa in relation to age and quality of sperm. *Int J Fertil* 1988; 33: 68-71.
- 85.- Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology* 1975; 44: 394-436.
- 86.- Revell S.G, Chasey D. Morphological defects of the acrosome in boar spermatozoa. *Research Veterinary Science* 1988; 45: 149-151.
- 87.- Zamboni L. The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertility and Sterility* 1987; 48: 711-734.
- 88.- Escalier D, David G. Pathology of the cytoskeleton of the human sperm flagellum: Axonema and peri-axonemal anomalies. *Biol Cell* 1984; 50: 37-52.
- 89.- Jones RC. Changes occurring in the head of boar spermatozoa: vesiculation or vacuolation of the acrosome. *J Reprod Fert* 1973; 33: 113-118.
- 90.- Holt WV. Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *J Reprod Fert* 1982; 64: 485-489.