



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRUEBA DUAL COOMASSIE/HOST CON
UNA TÉCNICA MODIFICADA DE CORTA DURACIÓN PARA EVALUAR LOS
ESPERMATOZOIDES DE VERRACO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARÍA DEL CARMEN VÁZQUEZ CAMACHO

ASESORES: M.V.Z GERARDO RAMÍREZ HERNÁNDEZ

M.V.Z OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ



MÉXICO D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

ÍNDICE	PÁGINA
1. RESUMEN -----	1
1.1 Abstract-----	3
2. INTRODUCCIÓN -----	5
2.1 Generalidades sobre la inseminación artificial -----	5
2.2 La evaluación de la calidad seminal -----	5
2.2.1 Espermiograma -----	5
2.2.2 Características Macroscópicas -----	6
2.2.3 Características Microscópicas -----	7
2.2.4 Pruebas de integridad y funcionalidad espermática -----	12
2.2.5 Pruebas de vitalidad/viabilidad: células vivas y muertas -----	13
2.2.6 Pruebas de integridad: valoración del estado del acrosoma ---	14
2.2.7 Principios de las tinciones para la evaluación de la integridad	
Estructural-----	15
2.2.8 Pruebas de funcionalidad espermática -----	16

2.2.9 Pruebas de osmolaridad-----	18
a) Prueba de estrés Hiperosmotico: HORT -----	18
b) Prueba de Resistencia Osmótica: ORT -----	20
c) Prueba de Hipo-osmolaridad: HOST -----	21
3. JUSTIFICACIÓN -----	23
4. HIPÓTESIS -----	24
5. OBJETIVOS -----	25
5.1 Objetivo general -----	25
5.2 Objetivos específicos -----	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS -----	26
6.1 Grupo A: Control -----	28
6.2 Grupo B: Técnica de laboratorio -----	30
6.3 Grupo C: Técnica modificada corta -----	34
7. RESULTADOS -----	38
8. DISCUSIÓN -----	41
9. CONCLUSIÓN -----	51
10. BIBLIOGRAFIA -----	52

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

- 1.** Evaluación acrosomal entre la prueba dual de laboratorio y la prueba dual modificada. 39

- 2.** Resultados obtenidos al comparar la tinción vital con los resultados de las pruebas duales. 39

- 3.** Diferencias en la realización de la prueba dual entre las dos metodologías. 40

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

1. Estructuras de un espermatozoide normal.	17
2. Espermatozoides que de acuerdo a la osmolaridad del medio presentan enrollamiento de la cola.	22
3. Espermatozoides con flagelo enrollado (HOST +), aquel con flagelo recto se interpreta como HOST – (a).	22
4. Espermatozoides vivos con la tinción vital.	36
5. Espermatozoides muertos con la tinción vital.	36
6. HOST +, la flecha señala el acrosoma integro.	37
7. HOST+, la flecha señala el acrosoma dañado.	37
8. Espermatozoides con reacción acrosomal (1) y acrosoma ausente (2)	37

Dedicatoria

En la vida para lograr lo que uno desea tiene que hacer muchos sacrificios, esfuerzos y dar más del cien por ciento para ello; pero también necesitamos el apoyo y motivación de personas que crean en nosotros, y el sueño que tuve desde la infancia no lo hubiera logrado sin ustedes.

Esto esta dedicado a mi familia, todos ustedes contribuyeron a mi sueño, muchas veces sacrificando sus prioridades y trabajando más de lo que podían ofrecer, para cubrir mis necesidades y hasta mis caprichos.

Cada uno en su particular forma de ser me ayudó a convertirme en una mejor hija, hermana y persona; son los castillos que sostienen mi vida y mis deseos.

A mis padres:

Anastacio: Me has enseñado que a pesar de los obstáculos y adversidades de la vida, debemos seguir esforzándonos para sobresalir y que nuestros actos son los que hablaran por nosotros, te agradezco por todas tus enseñanzas que he utilizado en mi vida.

Gloria: Compromiso, dedicación y amor por los que queremos y deseamos, sobrepasa cualquier adversidad, gracias por siempre tener un consejo y escucharme, así como por ser mi mejor amiga, confidente y mi cómplice.

A mis hermanos:

Marco Antonio: Amar lo que uno hace, disfrutar lo que se obtiene, reír y compartir con los que amamos, así es más hermosa la vida, espero estés orgulloso de mí donde quiera que estés, tú me motivaste a un más a seguir adelante y mejorar en todos los sentidos. Eres el ángel que cuida mis pasos.

Sonia: Todo lo que nos propongamos es cuestión de seguridad y querer mejorar en todos los sentidos, las dificultades forman nuestro carácter y que siempre hay que dar lo mejor de nosotros cada día.

Mucho de lo que tengo y logre es por mis hermanos, siempre estaré en deuda y agradecida con ustedes.

A mi sobrino:

Andrés: Alegría, paciencia y motivación trajiste a mi vida con tu llegada, esperó que algún día se te habrán muchas puertas y me veas como un ejemplo a seguir, ten por seguro que siempre podrás contar conmigo, te quiero mi pequeño "lechón".

En estas páginas esta el reflejo de todo lo que me han dado, porque no solo me realice yo, si no también todos ustedes conmigo.

Les agradezco todo y espero que se sientan orgullosos de mí, como yo lo estoy de ustedes.

Muchas Gracias; no me bastaran todos los días de mi vida para regresar parte de lo que me han dado, son los luceros que alumbran mi camino y mi vida, los amo.

Agradecimientos

A mis asesores: Gerardo Ramírez, Oscar Gutiérrez y Susana Espinoza, siempre estuvieron al pendiente y me ayudaron en todo momento en la realización de mi tesis, sirvieron de escalones para cumplir este propósito; su tiempo, apoyo y amistad fue valiosa en esta etapa de mi vida, se los agradezco, así como por transmitirme sus conocimientos y experiencias del mundo de la porcicultura y demás enseñanzas para la vida. Fue un placer haber trabajado con ustedes y haberlos conocido.

Al MVZ Juvencio García Sánchez, así como al dueño y personal de trabajo de la granja "La Nopalera" por proporcionar las dosis para la realización de este trabajo.

A los académicos del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM: Ana Delia Rodríguez Cortez, Juan Alberto Balcázar Sánchez y Susana Rojas Maya, por su apoyo en las mediciones con el osmómetro.

A los miembros del jurado por sus aportaciones para mejorar este trabajo: María Elena Trujillo, Jorge Hernández, Héctor Flores y Héctor Villaseñor

Al personal del DMZC que alguna vez me dieron clase, práctica o comentario que sirvió para confirmar que deseo dedicar todos los días de mi vida a esta noble especie: Roberto M. Gamba, Mario Haro, Marco A. Herradora, Alejandra Mercadillo, Carmen Mercado, Esperanza Galván, Rosalba Carreón, Pedro Pradal, Iván Sánchez, Germán Borbolla y Javier Olea.

Al personal del CEIEPP, que durante mi servicio social me transmitieron más conocimientos y practica en los porcinos, donde reafirme que esta especie es la mejor; Alejandro Vargas Martínez, Roberto M. Rodríguez y Mónica Sánchez Martínez, gracias por sus valiosas enseñanzas y formar mi carácter.

Los amigos son hermanos que elegimos y es un placer tenerlos como parte de mi familia: Maricela, Carmen, Massiel, por ser mis primeras y mejores amigas en la carrera.

A mis vecinas de la TP, fue un placer conocerlas mientras realice mi tesis: Jazmín e Isabel.

A Tamara: mi otra vecina de TP, gracias por permitirme conocerte, eres una gran amiga, hermana y compañera, siempre estaré agradecida por tus consejos y observaciones para ser mejor, así como a ver lo lindo que hay en cada persona, por soportar todo lo bueno y malo que hay en mí, y claro por hacerme más agradables los días junto al microscopio, un placer el haber conocido a una linda persona como tú, siempre podrás contar conmigo.

A mis otros amigos que hice en el SS: Angélica, Carlos, Paloma, Habacuc, Yadira, Cecilia y Edith, como nuestra camada ninguna, gracias por su amistad.

Al personal de laboratorio del DMZC: Don Inocente, Doña Carmen y Doña Evelia, fue un gusto convivir con ustedes.

A muchos compañeros y alumnos que he conocido, poner sus nombres tal vez no signifique nada para quien los lea, pero cada uno de ustedes me enseñó algo nuevo y bueno para mi vida, estén por seguros que siempre estarán en mi memoria.

A todos los animales que dieron, pero la mayoría de las veces fue involuntariamente su presencia, y en algunos casos hasta su vida para que yo pudiera aprender, por ustedes y los que siguen, ejerceré con responsabilidad y amor mi profesión para darles una buena atención a los de su especie.

A mis mascotas, cada uno de ustedes compartió momentos de mi vida y me enseñaron a entender el cariño y amor de sus ronroneos y ladridos, aprendí que su compañía y amor es el más puro y sincero con el que uno puede contar.

A la FMVZ-UNAM, por ser mi segunda casa en todo este tiempo, su personal académico y trabajadores que en algún momento contribuyeron a mi formación.

1. RESUMEN

MARÍA DEL CARMEN VÁZQUEZ CAMACHO: ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRUEBA DUAL COOMASSIE/HOST CON UNA TÉCNICA MODIFICADA DE CORTA DURACIÓN PARA EVALUAR LOS ESPERMATOZOIDES DE VERRACO. (Dirigida por los MVZ MCV. Gerardo Ramírez Hernández y Dr. Oscar Gutiérrez Pérez)

El objetivo de este estudio fue comparar dos metodologías para evaluar la membrana plasmática y la integridad acrosomal de los espermatozoides de verraco (una técnica convencional de laboratorio y una técnica modificada de la anterior de corta duración). Para ello se utilizaron dosis seminales de cinco machos activos en granja, realizando cuatro muestreos. A cada muestra se le realizó un espermiograma básico, después cada dosis se dividió en tres partes (control, laboratorio, modificada) seguidamente se realizó la prueba dual Coomassie/HOST. Se hizo un conteo de mínimo 200 células por muestra y grupo, clasificando las células en espermatozoides con reacción HOST+ (es decir que respondieron a la prueba de osmoresistencia hipo osmótica) y su grado de integridad acrosomal: integro (H+/AI), dañado (H+/AD), reacción acrosomal (H+/RA). Encontrando para la técnica de Laboratorio: H+/AI: 84.07 ± 5.24 , H+/AD: 11.24 ± 2.27 , H+/RA: 3.51 ± 1.30 . En el caso de la técnica modificada los resultados encontrados fueron: H+/AI: 85.51 ± 2.91 , H+/AD: 9.23 ± 2.23 , H+/RA: 4.437 ± 0.881 . A su vez, también se evaluó la cantidad de HOST+ de cada metodología obteniendo 44.35 ± 1.89 y 48.10 ± 1.62 , para la prueba de laboratorio y la modificada respectivamente.

Los resultados se analizaron con la prueba estadística de Mann-Whitney. Al comparar los conteos de ambas pruebas, en la técnica de laboratorio se observó un aumento numérico en acrosomas dañados y en la técnica modificada, de acrosomas reaccionados. Estos incrementos no representaron una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos ensayos. La comparación de los conteos de espermatozoides HOST+, entre ambas pruebas, tampoco presentaron diferencia significativa ($p < 0.05$). Con esto se establece que la prueba dual Coomassie/HOST modificada corta, se puede utilizar para evaluar los espermatozoides de verraco sin requerir de equipo de laboratorio o medios sofisticados. Su aplicabilidad a nivel de campo fortalecerá la información que brinda la evaluación seminal de rutina.

1.1 ABSTRACT

MARIA DEL CARMEN CAMACHO VAZQUEZ: A COMPARATIVE STUDY OF COOMASSIE / HOST DUAL TEST AND A MODIFIED SHORT TEST FOR IN FIELD BOAR SEMEN EVALUATION. (Directed by MVZ MCV. Gerardo Ramirez Hernández and Dr. Oscar Gutiérrez Pérez)

The aim of this study was to compare two methodologies for assessing the plasma membrane and acrosomal integrity of boar sperm (conventional laboratory technique and a modified technique of the previous short-term). This seminal doses were used in five male farm assets, making four samples. Each sample underwent a basic semen analysis after each dose was divided into three parts (control, laboratory, as amended) then the test was performed dual Coomassie / HOST. There was a count of at least 200 cells per sample and group, sorting the cells in sperm reaction HOST + (ie responding to the test osmoresistencia hypo osmotic) and its completeness acrosomal: Complete (H + / UA), damaged (H + / AD), acrosome reaction (H + / RA). Finding Technique for Lab: H + / AI: 84.07 ± 5.24 , H + / AD: 11.24 ± 2.27 , H + / RA: 3.51 ± 1.30 . In the case of the modified technique the results found were: H + / AI: 85.51 ± 2.91 , H + / AD: 9.23 ± 2.23 , H + / RA: $4,437 \pm 0,881$. In turn, we also evaluated the amount of each methodology obtained HOST + 44.35 ± 1.89 and 48.10 ± 1.62 for laboratory testing and modified respectively.

The results were analyzed with the statistical test Mann-Whitney. By comparing the counts of both tests, the laboratory technique showed a numerical increase in damaged acrosomes and the modified technique of acrosome reacted.

These increases did not represent a significant difference ($p < 0.05$) between the two tests. Comparison of HOST + sperm counts, between the two tests showed no significant difference ($p < 0.05$). This test provides that the dual Coomassie / HOST modified short, can be used to assess boar sperm without requiring laboratory equipment or rich media. Its applicability to strengthen field-level information provided by routine semen evaluation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades sobre la inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) se define como la transferencia de los gametos del macho para llegar al óvulo por medios distintos al apareamiento natural.¹

Actualmente, los productores de cerdos tienen la tendencia a aumentar el uso de la IA en las operaciones comerciales, ya que ésta constituye una biotecnología aplicada a la reproducción que ha permitido un avance acelerado en los programas tanto reproductivos como genéticos del cerdo y otras especies de importancia zootécnica.^{2, 3, 4, 5, 6}

Para lograr una IA adecuada, uno de los aspectos importantes a considerar es la calidad de las dosis seminales; de tal manera que por medio de una espermatobioscopia de un eyaculado fresco o de las dosis seminales, se pueden conocer y evaluar las características macroscópicas y microscópicas del semen, con lo que se asegura que el espermatozoide tiene la capacidad para fertilizar los óvulos liberados por la cerda.^{1, 2, 3, 4}

2.2 La evaluación de la calidad seminal

2.2.1 Espermiograma

Las cualidades que deben de tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético activo, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcionalidad de la membrana, que las

enzimas estén activadas sobre todo las asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia optima del material genético. ^{4, 5}

De manera rutinaria, en cualquier granja que se realiza la IA se lleva a cabo la evaluación de los eyaculados con un equipo elemental (microscopio, cámaras, porta y cubreobjetos, pipetas), cuya evaluación consiste en valorar algunas características macroscópicas y microscópicas del eyaculado.

2.2.2 Características Macroscópicas

Las características macroscópicas son aquellas que se pueden evaluar de primera intención y sin la utilización de equipos especiales. A continuación se enlistan y definen:

Color: Se considera como normal el blanco opalescente, variando la consistencia y tonalidad de acuoso transparente a cremoso amarillento, según la concentración espermática que se tenga o a alguna alteración propia del verraco. ^{1, 2}

Olor: Debe de ser *sui generis*, cualquier olor representa una alteración. ^{1, 2}

Volumen: Según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco el volumen oscila entre 125 - 300 ml. ^{1, 2, 3}

pH: Se utiliza una tira reactiva de pH o un potenciómetro, los valores normales varían de neutro o en la escala de 7.2 a 7.8. ^{1, 2}

Temperatura: Es importante mantener el semen a una temperatura de 35 - 36 °C para diluir. ^{1, 2, 7}

2.2.3 Características Microscópicas

Son aquellas características que requieren por lo menos de un microscopio para su valoración:

Motilidad: Es el movimiento en masa/general que los espermatozoides muestran al ser evaluados en el microscopio óptico. Con el objetivo seco débil (10x) se estima la movilidad general en una muestra de semen, otorgándole un valor porcentual de 0 – 100 %, el porcentaje aceptado oscila entre 70 – 90 %, conforme este valor sea menor la calidad seminal disminuirá, así como la probabilidad de éxito en la inseminación artificial. ^{2, 8, 9}

Vigor (tipo de movimiento o motilidad individual): Se refiere al tipo de movimiento progresivo que un espermatozoide tiene, el cual se evalúa con el objetivo seco fuerte (40x), al evaluar este parámetro, se observan diferentes movimientos, desde nulo, movimientos lentos, en círculos o vibratorios, hasta movimientos rectos y rápidos, para evaluar esta característica se le da un valor jerárquico de 0 a 5. ⁸ En donde, 0: Sin movimiento, 1: Sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismo, 2: Movimientos progresivos y algunos anormales. 3: Movimientos progresivos lentos y sinuosos. 4: Movimientos progresivos rápidos y 5: Movimientos progresivos muy rápidos. El vigor tiene una alta correlación con la capacidad individual de almacenaje del semen de cada verraco. ⁹

Grado de aglutinación: La **aglutinación espermática** es el acúmulo de espermatozoides, que puede ser observado durante la contrastación con el microscopio, tanto en el eyaculado fresco, como en el semen diluido en conservación. Las causas de este fenómeno no se pueden determinar con exactitud aunque de manera práctica se aplican diversos manejos para reducirla (recolección con un pequeño volumen de BTS, dosificación de vitamina C al verraco, medidas más estrictas contra la contaminación, etc.)¹⁰

El grado de aglutinación es la gravedad con que los espermatozoides se encuentran adheridos y se evalúa al mismo tiempo que la motilidad del eyaculado, observando la presencia de cúmulos de espermatozoides (muertos o vivos) que pueden estar adheridos a células epiteliales o bien, unidos cabeza con cabeza o cola con cola.¹⁰

El valor de aglutinación que un eyaculado puede presentar, se asigna de acuerdo a un orden jerárquico que va del 0 al 4. Todos los verracos presentan algún tipo y grado de aglutinación.^{7,8}

El grado 4 de aglutinación corresponde a más de un 30-40% de espermatozoides aglutinados. Si esta aglutinación se une a otros parámetros, como baja motilidad y presencia de abundantes formas anormales, se recomienda no continuar el procesado del eyaculado.

En algunas ocasiones, la presencia de aglutinación leve, desaparece al realizar la mezcla del eyaculado con el diluyente, gracias a la estabilización química que proporciona éste, observándose posteriormente, una disminución

importante de la presencia de espermatozoides aglutinados en las dosis conservadas.

Aunque ya se ha mencionado que la aglutinación tiene un origen multifactorial algunas de las causas más comunes se enlistan a continuación: ¹⁰

- Presencia de restos de tapioca procedente de las glándulas bulbo uretrales (glándulas de Cowper) por un mal filtrado o bien características individuales de los machos como por ejemplo, tapioca muy fluida.
- Un gran número de espermatozoides por ml. (elevada concentración espermática).
- Mala calidad espermática: Espermatozoides muertos o con baja vitalidad.
- Shock térmico por manipulación inadecuada del semen o bien provocado por efecto de la elevación térmica corporal durante procesos febriles (debido a distintas patologías o por reacciones vacúnales) o temperaturas ambientales excesivas.
- Contaminación bacteriana del eyaculado provocada por mala limpieza del semental al entrar al sitio de colecta.
- Otro tipo de contaminaciones como son la presencia de gran cantidad de células epiteliales, descamaciones, restos de paja, talco de los guantes, agua destilada de mala calidad, presencia de restos de jabón, etc.
- Cambios en presión osmótica o pH del diluyente de semen debido a una incorrecta preparación de éste.

- Por reacciones antigénicas que pueden producirse en semen heterospérmico por incompatibilidad entre eyaculados o bien contra anticuerpos específicos formados contra los componentes de la membrana espermática.

Grado de contaminación: se valora de la misma forma que el grado de aglutinación. Se considera un eyaculado contaminado a aquel que presente sustancias, objetos o microorganismos que no forman parte de él. Los contaminantes pueden ser células inflamatorias (leucocitos) que pueden observarse después de procesos infecciosos, células epiteliales de descamación, que aunque están presentes de manera normal por la renovación de los epitelios del tracto reproductivo, después de procesos inflamatorios se pueden hallar en una mayor cantidad. Las bacterias, las excretas, el polvo de la sementalera, el talco de los guantes y la orina, también pueden ser contaminantes del semen presentes por un pobre manejo higiénico a la hora de la recolección o un ambiente inadecuado (corrientes de aire). La contaminación bacteriana puede comprobarse mediante su aislamiento bacteriológico.²

Concentración espermática: Esta se define como el número de espermatozoides presentes por ml en un eyaculado o una dosis seminal. Esta se puede calcular de diversas formas, los métodos más usuales son la utilización de equipos que analizan la longitud de onda de la luz absorbida y/o reflejada por los espermatozoides, tal es el caso del espectrofotómetro y del fotocolorímetro. El método más popular por su economía y fácil manejo es el conteo por medio de cámaras de conteo celular o citómetros, existe una gran

variedad de éstos, como son la cámara de Makler (diseñada especialmente para espermatozoides, pero de alto costo), la cámara de Thoma, la cámara de Burker y la cámara de Neubauer (la más utilizada).¹

La cámara de Burker es el método más recomendado para centros de IA pequeños, debido a su facilidad en el cálculo y visualización en el microscopio. El procedimiento para obtener la concentración espermática mediante esta cámara es el siguiente: se realiza una dilución de semen puro 1:100 en una solución de citrato de sodio y formol al 4 %, posteriormente se toma una gota con una pipeta Pasteur, la cual se deposita en el retículo de la cámara, el conteo se realiza en un microscopio con el objetivo de 40x y se cuenta el número de espermatozoides de cada platina que se encuentran dentro de 40 cuadritos de cada una, después se multiplica por 10, 000, 000, para obtener la concentración de espermatozoides por mm³.¹

Malformaciones espermáticas: La teratozoospermia es un parámetro que nos indica si los espermatozoides presentes en el eyaculado del verraco tienen alteraciones morfológicas que puede afectar a su capacidad reproductiva. De acuerdo a su origen se dividen en dos grupos: anomalías primarias y secundarias.¹

Las primarias ocurren a nivel del testículo, durante el proceso de la espermatogénesis, en este grupo podemos encontrar anomalías a nivel de la cabeza como son: macrocabeza, microcabeza, ovalada, elongada, elíptica, piriforme, triangular, cuadrangular, achatada, alargada, desintegrada, suelta. A nivel de los flagelos los podemos encontrar de forma abaxial, corto, largo, grueso, delgado y múltiples.^{1,2}

Las anomalías secundarias se presentan durante el proceso de maduración a nivel del epidídimo, de las cuales las más comunes son: acrosoma vacuolado, aglutinación flagelo con flagelo, aglutinación cabeza-cabeza, múltiples cabezas, flagelo enroscado (a nivel intermedio, principal o terminal), gotas citoplasmáticas proximal y distal.^{1, 2, 7}

El porcentaje total de anomalías permitidas en cerdos va de un rango del 20 a un 25 %.

Para evaluar la morfología de los espermatozoides se utilizan diversas tinciones como son: tripan azul, eosina-nigrosina, cristal violeta, entre otras más. También se puede realizar esta evaluación a la vez que se hace el conteo en los citómetros.¹

2.2.4 Pruebas de integridad y funcionalidad espermática

Los parámetros desarrollados pertenecen al espermiograma básico y por sí solos no parece ser suficiente para predecir adecuadamente la fertilidad, aunque la información combinada de todos ellos ofrece una buena estimación bastante acertada de la calidad seminal, permitiendo la clasificación y selección de los mejores eyaculados para su almacenamiento y aplicación.^{4, 5}

En la búsqueda por optimizar el recurso que brinda la IA, se han desarrollado nuevas técnicas que pretenden alcanzar un mejor conocimiento de la célula espermática.¹¹ Estas pruebas son mucho más objetivas y buscan

determinar la integridad estructural del espermatozoide, así como su funcionalidad ^{1, 5, 11}

A continuación se describirán algunas de ellas.

2.2.5 Pruebas de vitalidad/viabilidad: células vivas y muertas

La ruptura de la membrana plasmática está claramente asociada con la pérdida de viabilidad celular. ⁴ Por lo tanto, para distinguir entre espermatozoides vivos y muertos se pueden utilizar diferentes técnicas de tinción, las cuales están fundamentadas en los mecanismos de la integridad membranal, de tal manera que si está intacta no deja pasar el colorante. Ejemplos de estas son: tinción tripan azul; en donde el espermatozoide vivo se observa transparente y el muerto azul, tinción con eosina-nigrosina: el espermatozoide vivo se ve transparente y el muerto rojizo. ^{1, 5}

La mayoría de estas pruebas dan solo información estructural parcial y aunque estas técnicas informan sobre el daño de la membrana plasmática, estos resultados no siempre están relacionados con la capacidad fertilizante del espermatozoide. ^{4, 5}

Otras técnicas son apoyadas con el uso de microscopio de contraste de fases, microscopía electrónica o de barrido, también se pueden usar tinciones fluorescentes. ^{1, 4, 5, 7}

2.2.6 Pruebas de integridad: valoración del estado del acrosoma

El acrosoma es una estructura situada en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, la cual juega un papel crucial en la fecundación y que por cambios fisiológicos (capacitación espermática y la reacción acrosomal) le es posible la penetración al ovocito.^{1, 4, 5, 12} Esta importancia hace que convenga realizar una valoración específica del mismo. Desafortunadamente su análisis queda limitado a laboratorios especializados que tengan el equipo y personal calificado.¹

Muchos estudios para fertilización requieren la evaluación del estado del acrosoma para conocer su integridad.¹² Existen diferentes tinciones para evaluar dicha estructura, entre estas tenemos: tinción de Kovacs y Foote (K-F), que es a base de azul tripano y Giemsa; tinción de eosina/verde rápido, eosina-nigrosina, dobles y triples tinciones, así como Azul de Coomassie, todas estas sirven para ver la integridad de esta región del espermatozoide.¹

La tinción de Coomassie es una técnica fácil, rápida para determinar el estatus y reacción acrosomal en varias especies, es claramente identificable esta estructura al teñirse intensamente de azul, además esta prueba tiene muchas ventajas en comparación con otros métodos de evaluación.¹³

En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir claramente tres regiones en la cabeza: región acrosómica con un borde apical, zona ecuatorial y zona post acrosomal.^{4, 12}

2.2.7 Principios de las tinciones para la valoración de integridad estructural

La técnica de tinción varía según la estructura a observar, hay colorantes básicos y ácidos que van a teñir macromoléculas ácidas o alcalinas (hematoxilina, eosina, Wright). Hay otros colorantes con afinidad a ciertos grupos químicos como son los colorantes proteicos que se unen a grupos aminos libres, sulfhídricos libres o hidroxilos libres (Coomassie, cristal violeta, nitrato de plata, azul de metileno), existen otros que son específicos a estructuras como son los dicromatos que tiñen proteínas de la matriz extracelular.¹⁴

Hay colorantes fluorescentes que solo son visibles con una lámpara de tungsteno, donde emite longitudes de onda ultravioleta. También existen las técnicas de inmunofluorescencia donde se utilizan anticuerpos que reconocen un antígeno específico y posteriormente se utiliza un segundo anticuerpo conjugado con un fluorocromo (FITC, rhodamina) o con una enzima y se visualiza con el sustrato colorimétrico (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.).^{4,14}

Con base a lo anterior, hay otros estudios para evaluar el acrosoma como son: inmunofluorescencia indirecta, marcaje de lectinas con fluorocromos, clortretaciclina fluorescente e incluso microscopía electrónica; todas éstas son técnicas y herramientas costosas por que requieren reactivos y equipo de alto valor monetario.¹

2.2.8 Pruebas de funcionalidad espermática

En el afán por tener la mejor calidad seminal, se han desarrollado exámenes para valorar la capacidad funcional del espermatozoide, ésta se define como el conjunto de parámetros que caracterizan la viabilidad de la célula y su potencial capacidad fertilizante, a su vez esta última se entiende como la habilidad que tienen estas células para fecundar un ovocito fisiológicamente normal y estructuralmente intacto, ¹¹

Las pruebas menos complejas y más útiles en la valoración seminal en el campo son las pruebas de **funcionalidad membranar**, estas son pruebas diseñadas para conocer otro aspecto de los gametos del macho, al permitir un conocimiento sobre la funcionalidad de la membrana. Ya se menciona que la membrana puede ser estudiada desde el punto de vista estructural mediante la utilización de tinciones, pero para su funcionalidad se han aplicado los test de osmolaridad. ^{4, 5, 11}

La membrana plasmática de los espermatozoides de los mamíferos, es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas, estructuralmente esta membrana es heterogénea y presenta cinco dominios diferentes: acrosoma, segmento ecuatorial, región post-acrosomal, pieza intermedia y cola (**Figura 1**). ¹⁵

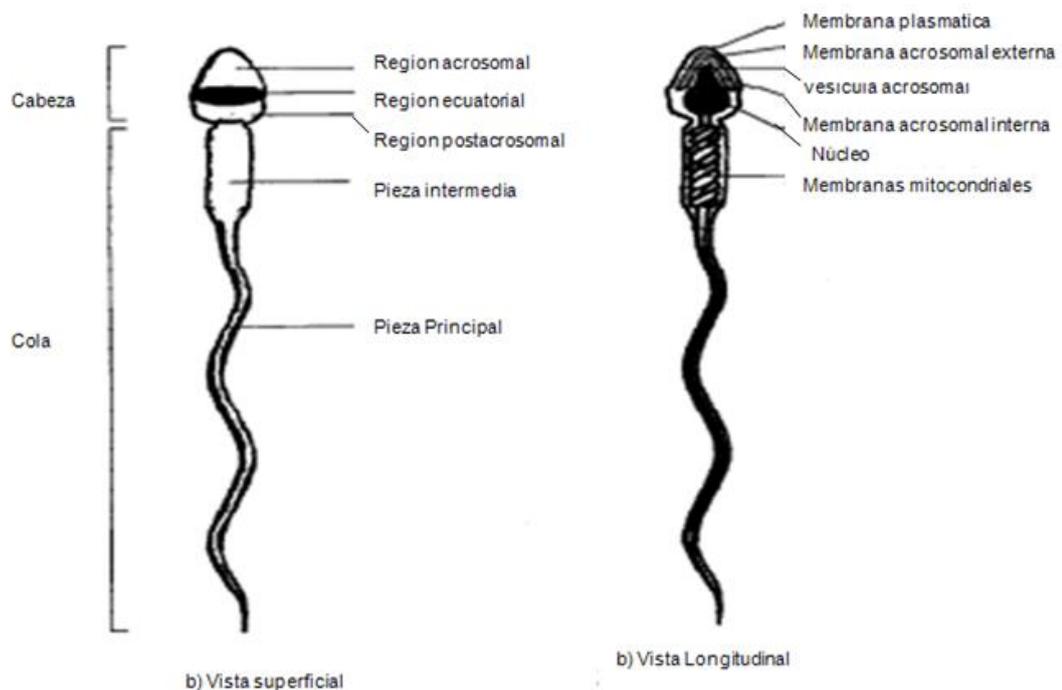


Figura 1. Estructuras de un espermatozoide normal. Tomado y modificado de Ladha S: J. Membrane Biol. 165:1-10.1998.

Cada una de estas regiones presenta diferentes funciones fisiológicas y contribuyen separadamente al estado del gameto. Por lo que antes y después de la eyaculación, la membrana espermática sufre cambios que están asociados a la capacidad fecundante de los espermatozoides, como son la capacitación, unión espermatozoide – ovocito y reacción acrosomal. Dichos sucesos requiere de la actividad bioquímica de la membrana y por lo tanto, es muy importante evaluar la estructura e integridad funcional de la misma.^{15, 16, 17}

Entre las pruebas de laboratorio disponibles, la prueba de funcionalidad de la membrana espermática es de particular importancia, por ser esta estructura la responsable de los procesos de capacitación, reacción del

acrosoma, la unión con el ovocito, algunos procesos metabólicos y de regular intercambio con el medio.¹²

Para ello existen distintas pruebas que evalúan la respuesta osmótica de la membrana: test de resistencia osmótica (ORT); test de resistencia hiperosmótica (HRT) y test de Endosmosis o hipoosmolaridad (HOST).¹⁶

Las pruebas mencionadas tienen como fundamento demostrar la resistencia osmótica de las membranas y así conocer su funcionalidad en el espermatozoide como una guía a la capacidad de preservar el semen y también a su potencial de fertilización.^{5, 16, 17}

2.2.9 Pruebas de osmolaridad

a) Prueba de estrés Hiperosmótico: HORT

La congelación de espermatozoides de cerdo ha sido limitada en comparación con otros animales domésticos, debido a los resultados de la fertilidad después de la inseminación con dosis seminales descongeladas. La composición del medio de congelación, las velocidades de congelación y descongelación, el tipo de empaque para su almacén (pajillas o bolsas), son otros factores que se han estudiado para comprender las complicaciones de la técnica. Dentro de estos estudios se ha visto que los espermatozoides durante el proceso de congelación se enfrentan a cambios osmóticos muy variables. Siendo el espermatozoide un "osmómetro natural", es decir una célula que tiene una gran capacidad de respuesta al intercambio hídrolítico (iones y otros

solutos), para mantener su funcionalidad los estudios con semen congelado abrieron un panorama nuevo de conocimiento que permitió el desarrollo de técnicas que permiten evaluar la capacidad osmótica de los espermatozoides.¹⁸

La prueba de estrés hiperosmótico (HORT por sus siglas en inglés) tiene como fundamento la evaluación de los mecanismos relacionados con la regulación de los cambios de presión osmótica que incluyen los canales de intercambio celular de la bomba de Na^+/K^+ , la bomba de ouabaina sensible a ATP-asa, y la bomba antiporte de Na^+/H^+ sensible a amilorida, que son tres mecanismos de resistencia osmótica muy activos en la membrana espermática.¹⁸

En esta prueba se someten muestras de semen a una osmolaridad mayor a la fisiológica (600-4000mOsm) por 5 minutos a distintas temperaturas (4, 16 y 37 °C) utilizando soluciones a base de cloruro de sodio, glicerol o glucosa.

Se evalúa el grado de acrosomas alterados después del estrés hiperosmótico y su relación con algunos parámetros del semen fresco, los resultados obtenidos sirven como un parámetro para predecir la calidad de espermatozoides de cerdo congelados-descongelados.

b) Prueba de Resistencia Osmótica: ORT

La integridad de la membrana plasmática y acrosomal, ha sido utilizada para valorar la calidad seminal, por sus roles como límite celular y por ser responsables de hacer efectivas las interacciones entre células, tanto desde el punto de vista morfológico como del funcional. El test de resistencia osmótica (ORT) evalúa la sensibilidad de estas membranas a cambios súbitos en la osmolaridad del medio y por tanto su salud, pudiendo predecir la capacidad fecundante de una muestra seminal dada.¹⁹

Esta prueba tiene como objetivo conocer las características de la membrana espermática y acrosomal del espermatozoide, lo que estará relacionado con la capacidad fecundante y de conservación del semen de verraco.

En esta técnica se evalúan dos muestras de semen de un macho al mismo tiempo: se incuba una muestra de semen en un medio isotónico (300mOsm) y se incuba en baño maría a 39 °C durante 15 minutos, después se determina el número de acrosomas normales apoyándose de un microscopio de contraste de fases (A). A su vez se pone otra muestra de semen en un medio de menor presión osmótica (150 mOsm), se incuba durante 2 horas a 39 °C en baño maría y a continuación se observa el porcentaje de acrosomas normales (B).

El valor de índice se calcula por la fórmula:

$$\text{O.R.T.} = \%A + \%B / 2$$

Se obtienen un valor que permite la clasificación del verraco dentro de las diferentes categorías. Schilling (1986) proponía hasta 5 diferentes categorías, pero actualmente solo se recomienda una clasificación con tres que engloban a las anteriores y son las siguientes:

Categoría 1: valores comprendidos entre 69 y 100.

Categoría 2: valores comprendidos entre 59 y 68.

Categoría 3: valores comprendidos entre 0 y 58.

c) Prueba de Hipoosmolaridad: HOST

La prueba de HOST (Hipo Osmotic Sweeling Test/Test de estrés hipo-osmótico/Host test/Prueba de endosmosis) es una modificación de la prueba de HOST realizada en humanos, la prueba mencionada tiene como principio la observación de las alteraciones morfológicas de las células al ser expuestas a condiciones de hipo-osmolaridad y el cambio en las membranas del espermatozoide que estará relacionado a su vez con el potencial de fertilización.¹⁷ El HOST es más sensible para evaluar vitalidad (distinguir entre poblaciones de vivos y muertos) e indirectamente también sobre su integridad morfológica.²⁰

Esta prueba consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más laxa que la fisiológica, lo que causa la entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la osmolaridad interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del

espermatozoide debe de estar funcionando correctamente tanto física como sus mecanismos de intercambio de fluidos. La entrada de agua provoca en la célula un hinchamiento y consecuentemente un enrollamiento del flagelo dentro de la membrana (**Figuras 2 y 3**)^{4, 16, 17, 20}.

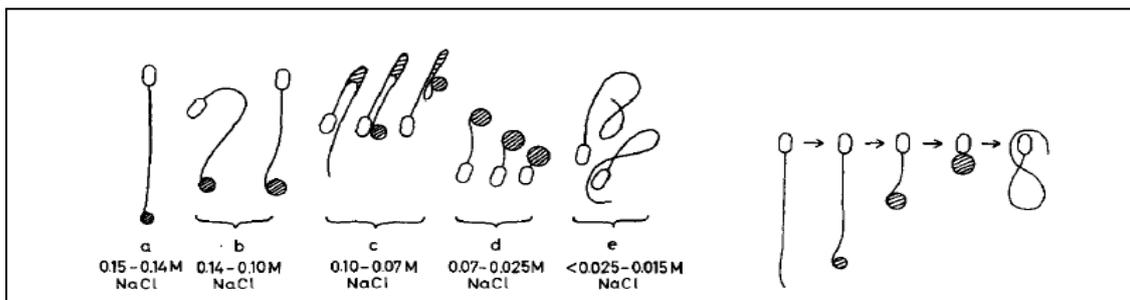


Figura 2. Espermatozoides que de acuerdo a la osmolaridad del medio presentan enrollamiento de la cola. Tomado de: Drevius L.O. Experiment Cell Research, 42: 136-156 (1966)

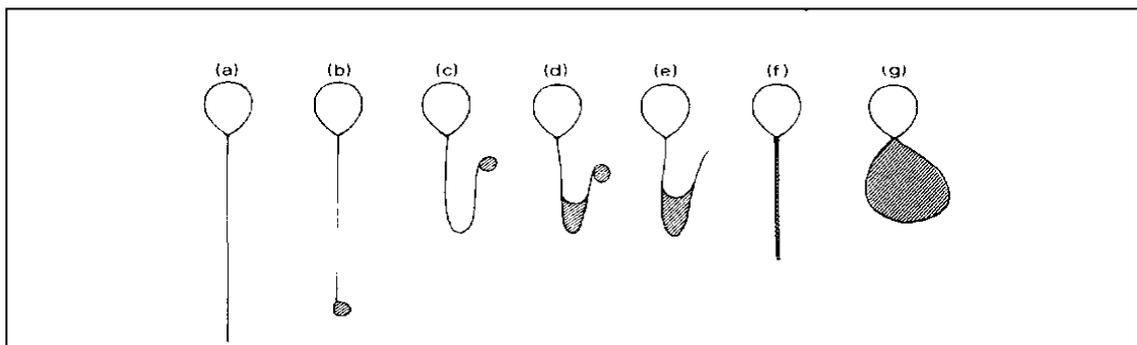


Figura 3. Espermatozoides con flagelo enrollado (HOST +), aquel con flagelo recto se interpreta como HOST – (a). Tomado de: Jeyendra et al: J. Reprod. Fert. 70:219-228. (1984)

También hay distintas técnicas con fluorocromos que permiten evaluar la funcionalidad espermática.⁴ La realización de estas pruebas nos permite conocer y mejorar la calidad seminal de cada verraco.^{1, 4, 17, 20}

3. Justificación

Hay muchos factores que influyen en la calidad de las dosis seminales, de las cuales las características propias del espermatozoide como son: funcionalidad de la membrana y un estado acrosomal son puntos importantes para tener una IA exitosa. Dado que en la mayoría de granjas porcinas y Centros de Transferencia Genética (CTG's) solo se realizan estudios básicos de semen, los cuales están limitados por el equipo, tiempo, además de personal calificado que pueda realizarlo, estas pruebas difícilmente se realizan. Dada la relevancia que tiene la IA en la producción porcina es necesario desarrollar técnicas con herramientas mínimas, de fácil realización e interpretación, una de éstas es la modificación de la prueba dual Coomassie/HOST con la cual se podrán evaluar características de integridad y funcionalidad, que fortalezcan la valoración espermática adecuada a nivel de campo.

4. Hipótesis

La prueba dual COOMASSIE/HOST modificada (corta), es una técnica de evaluación de semen mucho más fácil de aplicar en granja, y con los mismos resultados predictivos, que la prueba COOMASSIE/HOST desarrollada en el laboratorio.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general:

Valorar si los resultados obtenidos mediante la evaluación de la prueba dual COOMASSIE/HOST obtenidos con la técnica de laboratorio y la técnica modificada de corta duración no presentan diferencias, que permitan la aplicación de esta segunda técnica en campo.

5.2 Objetivos específicos:

- Estandarizar la prueba dual con modificaciones que permitan su aplicación en granja.
- Comparar resultados de conteos de la técnica de laboratorio y la técnica modificada de corta duración.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en una granja comercial ubicada en: Avenida constitucionalista #77, colonia La Nopalera, en el municipio de Yautepec, Estado de Morelos.

Los muestreos se realizaron los días lunes y se repitieron durante cuatro semanas en forma consecutiva, se recogieron las dosis seminales de cinco machos con fertilidad comprobada, activos en granja y de una edad de 14 meses en promedio. La toma de muestras se realizó entre los meses de Mayo-Julio.

Las dosis se transportaron en una hielera con refrigerantes y se aislaron con papel y/cartón para evitar el contacto directo con el refrigerante, así se mantuvieron hasta la llegada al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC), en la FMVZ-UNAM, en donde se colocaron en un conservador (Mobicool, Wine Chamber, Modelo D60, Geprüfte Sicherheit), el cual se conectaba y programaba a una temperatura de entre 15 – 17 °C para el almacenaje de las dosis y su procesamiento al día siguiente.

Al siguiente día se realizó una espermatobioscopia básica a cada muestra para conocer sus características e incluirlas en el estudio.

Para su evaluación se realizó lo siguiente:

Se identificó cada dosis, se pesaron en una báscula (Radway Wagi Electronczne), se evaluó su color y se tomó la lectura de pH, para esto se colocó una gota (entre 15 - 20 µl) de semen sobre una tira reactiva (Merck

KGaA, 64271, Darmstadt Germany), se esperaron 5 - 10 segundos para su lectura y se comparó con la colorimetría del patrón de referencia.

Después se procedió a evaluar la motilidad en masa/general e individual/progresiva, para esto se colocó una gota de semen sobre un portaobjetos previamente limpio y atemperado, se le colocó un cubreobjetos y se observó en un microscopio de luz (Zeiss, Primo Star) a 10x para observar la motilidad general y después a 40x para su evaluación progresiva.

Para la concentración espermática se hizo lo siguiente: Se realizó una dilución 1:10 para la cual se colocan 900 μ l de citrato de sodio (IMV Technologies) y 100 μ l de semen, se homogenizó y se dejó reposar durante un lapso de entre 30 segundos a un minuto. Después se tomó y colocó una gota de 15 μ l en cada una de las platinas de la cámara de conteo celular (Marienfeld Germany, Burkert CE), se observaron las platinas en el microscopio de luz a 40x, se contaron los espermatozoides de 40 cuadros de cada platina, se realizó la suma de los cuadros de las dos platinas y después se hizo la siguiente operación matemática:

- Promedio de las platinas x 1000000 x Volumen de la dosis= Concentración de la dosis

Después se evaluaron las anomalías espermáticas, las muestras se encontraron en los parámetros estándar.

Finalizada la espermatobioscopia básica, se formaron tres grupos por cada muestra que serían los que se trabajaron a lo largo de la prueba, quedando un grupo control, uno para la técnica de laboratorio y uno para la técnica modificada.

6.1 Grupo A: Control

Para este grupo se realizó lo siguiente:

Tinción de Coomassie

1. Se realizó un frotis para cada muestra, para ello se colocó una gota de 15 µl de semen en un portaobjetos, se pone otro portaobjetos atrás de la gota y se desliza suavemente a lo largo de éste para realizar el frotis.
2. Se dejó secar y después se procedió a poner el portaobjetos en un vaso Coplin, el cual ya tenía la tinción de Coomassie ¹³ al 0.22%. Esta se hizo de la siguiente manera: 0.20 grs de azul brillante de Coomassie (Blue G-250 de Fisher Scientific), 50 ml de etanol (J. T Baker), 10 ml de ácido Acético (J. T Baker), se aforó con agua destilada c.b.p 100 ml. La laminilla se sumergió en ella por 2 minutos, se sacó del vaso, se enjuagó el frotis con agua destilada y se dejó secar al medio ambiente. Para conservar las estructuras celulares y realizar posteriormente la lectura, a cada portaobjetos se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.
3. Este procedimiento se realizó también para los siguientes dos grupos, por lo que su explicación será omitida, solo se mencionará.

Tinción de Vitalidad.

1. Se realizó un frotis para cada muestra (siguiendo la metodología descrita anteriormente para realizar el frotis).
2. Se colocó 10 μl de semen y 1 μl de tinción de vitalidad (Prosemen ^{MR}), previamente atemperada a medio ambiente, se homogenizaron las gotas sobre el portaobjetos, se hizo el frotis y se dejó secar al medio ambiente.
3. Para conservar las estructuras celulares y realizar posteriormente la lectura, a cada portaobjetos se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

Conteos

Una vez realizadas las laminillas correspondientes por muestra, se llevó a cabo el conteo, contando mínimo 200 células por laminilla, con la tinción de vitalidad para saber el porcentaje de vivos - muertos y la tinción de Coomassie para observar el porcentaje de acrosomas íntegros, dañados y con reacción acrosomal.

6.2 Grupo B: Técnica de laboratorio.

Para este grupo se realizó lo siguiente:

Tinción Vital.

1. Se realizó un frotis para cada muestra (siguiendo la metodología descrita anteriormente).
2. Se colocó 10 μl de semen y 1 μl de tinción de vitalidad, previamente atemperada a temperatura ambiente, se homogenizaron las gotas sobre el portaobjetos, se realizó el frotis y se dejó secar al medio ambiente.
3. Para conservar las estructuras celulares y realizar posteriormente la lectura, a cada portaobjetos se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

Verificación de la osmolaridad de los medios a ser utilizados

Para verificar la osmolaridad tanto de las soluciones hipo-osmóticas, como la de todos los medios de dilución utilizados (BTS, semen sin diluir, etc.), en ambas técnicas se utilizó un osmómetro (Osmette A #5002 Automatic Osmeter.Precision Systems, INC.) propiedad del Departamento de Reproducción de la FMVZ-UNAM.

Todas las muestras utilizadas se verificaron mediante esta lectura para lo cual se tomaron alícuotas de 2 ml en un recipiente Ependorf y se conservaron a

temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron 500µl de cada alícuota y se colocaron en la copa de lectura del osmómetro.

El funcionamiento de este tipo de osmómetro se basa en el descenso crioscópico, que es una propiedad coligativa (es decir una propiedad que depende únicamente de la concentración), El descenso crioscópico depende del total de las partículas concentradas en la solución lo que permite determinar la osmolaridad de las mismas.

Prueba dual Coomassie/HOST.

1. Para realizar esta prueba se utilizó una solución hipo-osmótica (+), la cual se preparó de la siguiente manera: se utilizó un sobre de diluyente BTS (IMV Technologies), el cual se disolvió en un litro de agua destilada atemperada a 38 °C (colocada en un matraz Erlenmeyer), se homogenizó hasta disolver perfectamente el contenido del sobre; posteriormente se realizó una solución hipo- osmótica de este diluyente para trabajar las muestras.

La formula de la solución hiposmotica utilizada fue la siguiente:

- a. **Solución hipo-osmótica (+)** para 20 ml: Se colocan 15 ml de agua destilada atemperada a 38 °C y 5 ml del diluyente BTS en un vaso de precipitado, con esto se obtiene una dilución final 1:3 y una concentración de 75 mOsm.

2. En cada tubo de ensayo previamente identificado para cada muestra, se le colocaron 3 ml de semen. Se taparon los tubos, se formaron parejas de cada tubo procurando siempre que tuvieran el mismo peso, ya obtenidas éstas se procedió a colocar las muestras en una centrífuga (Drehen Zentrifuge, Modelo 80-2), se utilizó una velocidad de 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos.
3. Transcurrido el tiempo de centrifugación, cuidadosamente se sacaron los tubos para mantener lo más integra posible la pastilla de las muestras de semen, se quitó el sobrenadante con una pipeta Pasteur, tratando que la pastilla de espermatozoides quede en el fondo del tubo.
4. Posteriormente se reconstituyó la pastilla con 3 ml de la solución hiposmótica, para tener el mismo volumen inicial; una vez reconstituidas las muestras se colocaron en una gradilla y se dejaron reposar durante 60 minutos en Baño María (Grant Instruments, Cambridge, Ltd. Barrington) a 38 °C.
5. Transcurrido el tiempo de incubación de las muestras, se homogenizaron con un Vortex (Vortex Genie 2, Modelo G-560, Scientific Industries N.Y.)
6. Después de esto, se procedió a fijar cada muestra con paraformaldehído de la siguiente manera:

Se pusieron 500 µl de semen y 500 µl de paraformaldehído, se homogenizaron con el Vortex y se dejaron reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, esto se realizó con cada una de las muestras.

7. Después de fijadas y reposadas las muestras, se volvieron a centrifugar por 10 minutos a 1500 rpm, se sacaron y se les quitó el sobrenadante, tratando que la pastilla de espermatozoides quede en el fondo del tubo, una vez hecho esto con cada muestra, se le agregaron 100 μ l de cloruro de amonio a cada tubo y se homogenizaron suavemente con la mano.
8. Después se colocaron 15 μ l en un portaobjetos por muestra y se realizó la metodología del frotis descrita en el grupo control.
9. Una vez secos los frotis se les realizó la tinción de Coomassie, descrita en el grupo control, se dejaron secar y se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

6.3 Grupo C: Técnica modificada de corta duración

Se realizó lo siguiente:

Tinción de Vitalidad

1. Se realizó un frotis para cada muestra (siguiendo la metodología descrita anteriormente).
2. Se colocaron 10 μ l de semen y 1 μ l de tinción de vitalidad, previamente atemperada a medio ambiente, se homogenizaron las gotas sobre el portaobjetos, se hizo el frotis y se dejó secar al medio ambiente.
3. Se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

Prueba dual Coomassie/HOST

1. En un tubo de ensayo por muestra y previamente identificado, se colocaron 2 ml de agua destilada a 38 °C, después se le adicionó 1ml de semen, con su muestra correspondiente, quedando los tubos con un volumen final de 3 ml cada uno y teniendo una concentración de 75 mOsm. Se taparon los tubos, se colocaron en una gradilla y se Incubaron a 38 °C por 30 minutos en baño María.
2. Pasado este tiempo se sacaron del baño María y se homogenizaron suavemente con la mano.

3. Posteriormente se fijaron las muestras de cada tubo con paraformaldehído, para ello se depositaron 500 μ l de semen diluido y 500 μ l de paraformaldehído, se homogenizaron suavemente con la mano y se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente, este paso se hizo por cada muestra.
4. Después de los 5 minutos de reposo, se hizo un frotis con el semen fijado, colocando una gota de 15 μ l sobre un portaobjetos y se realizó el frotis como se describió en el grupo control, se dejó secar al medio ambiente.
5. A cada frotis se le realizó la tinción de Coomassie (descrita en el grupo control).
6. Finalmente a cada frotis se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

Conteos

Tanto para las laminillas obtenidas para la técnica de laboratorio y la técnica modificada, se evaluaron mínimo 200 células por muestra con la tinción de vitalidad para diferenciar vivos (transparentes) y muertos (rojos).

(Figura 4 y 5).



Figura 4. Espermatozoides vivos con la tinción vital.

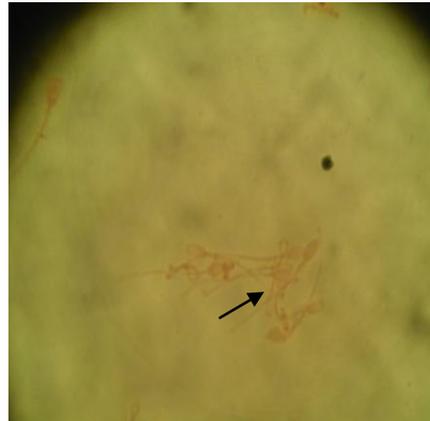


Figura 5. Espermatozoides muertos con la tinción vital.

Con la técnica dual se clasificaron los espermatozoides de la siguiente manera: Reacción HOST (+) con acrosoma integro (**Figura 6**); Reacción HOST (+) con acrosoma dañado (**Figura 7**) y Reacción HOST (+) con reacción acrosomal/ausente (**Figura 8**).



Figura 6. Host +. la flecha señala el acrosoma integro.

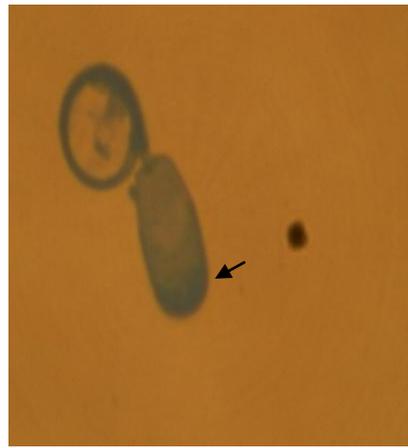


Figura 7. Host +, la flecha señala el acrosoma dañado.

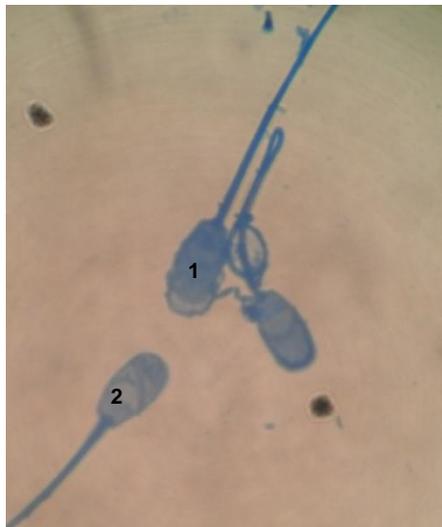


Figura 8. Espermatozoides con reacción acrosomal (1) y ausente (2).

Una vez realizados los conteos de todas las laminillas, se procedió a analizar las cantidades de cada grupo con el paquete estadístico Minitab 15. Se realizaron las pruebas para obtener estadística básica y un análisis de varianza por medio de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

7. RESULTADOS

En lo que respecta a la evaluación seminal básica de cada una de las dosis seminales, estas se encontraron con las características mínimas que se consideran para que una muestra sea de buena calidad, motilidad arriba del 70%, vigor mínimo de 3, concentración espermática en un rango de 3mil-4mil millones y un porcentaje de anormalidades ≤ 20 , por lo cual se incluyeron durante el estudio.

Los resultados obtenidos al comparar las dos metodologías de la prueba dual, se observó una ligera mayoría de espermatozoides con acrosoma íntegro y menos acrosomas dañados en la técnica modificada corta, a diferencia de la técnica de laboratorio, a su vez en esta hay un ligero aumento de acrosomas dañados. También se observó un aumento en la cantidad de espermatozoides con reacción acrosomal, esto en la técnica modificada corta al compararla con la técnica de laboratorio (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Evaluación acrosomal entre la prueba dual de laboratorio y la prueba dual modificada.

Grupos	Variables		
	Acrosoma Integro	Acrosoma Dañado	Reacción Acrosomal
Control	80.43±3.15 ^a	11.24±2.27 ^a	8.51±1.30 ^b
Técnica de laboratorio	84.07±5.24 ^a	11.67±3.16 ^a	3.78±4.82 ^a
Técnica Modificada Corta	85.51±2.91 ^a	9.23±2.23 ^a	4.437±0.881 ^a

Se presentan medias ± error estándar

^{a, b} – Literales distintas en la misma columna, indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Los resultados de estado del acrosoma, corresponden a los espermatozoides con HOST+.

Al término de cada una de las pruebas se observó una disminución de espermatozoides vivos al compararse con la tinción vital y los espermatozoides con reacción HOST (+) (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Resultados obtenidos al comparar la tinción vital con los resultados de las pruebas duales.

Grupos	Variable
	Vivos
Control	92.77±1.33 ^b
Técnica de laboratorio Larga	44.35±1.89 ^a
Técnica Modificada Corta	48.10±1.62 ^a

Se presentan medias ± error estándar

^{a, b} – Literales distintas en la misma columna, indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Se establecieron y compararon las diferencias tanto en el proceso y material utilizado durante la realización de cada una de las pruebas (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Diferencias en la realización de la prueba dual entre las dos técnicas.

Diferencias entre la prueba dual COOMASSIE/HOST	
Técnica Laboratorio *	Técnica Modificada °
BTS	Agua destilada
Centrifuga	No
60 minutos	30 minutos
Vortex	Manos
Paraformaldehido Cloruro de amonio	Paraformaldehido
Resina Filtros	Resina Filtros

La osmolaridad de las soluciones y los medios se verificaron con osmómetro, los resultados concuerdan con los rangos reportados por **Pérez et al (1998)** y **Jeyendra et al (1984)**.

8. DISCUSIÓN

En este estudio se valoraron las muestras utilizando las pruebas de evaluación seminal de rutina. Este procedimiento se realiza con la finalidad de trabajar con eyaculados de buena calidad; sin embargo, la valoración de las características macro y microscópicas (concentración, motilidad y morfología) suelen tener cierto grado de subjetividad, de ahí que se propusieran complementarlas para evaluar la funcionalidad espermática.

Este tipo de pruebas robustece el análisis del eyaculado, aportando información que permite tener un diagnóstico más confiable sobre la capacidad fertilizante de un semental sin tener que esperar hasta el parto.^{1, 4, 11, 21} Esto lo confirma **Díaz et al., (2009)**²² al evaluar 254 eyaculados de verracos jóvenes, maduros y viejos con gotas citoplasmáticas (GC) persistentes, a los cuales se les realizó una evaluación morfológica y una prueba de HOST (H+/H-), junto con una tinción de vitalidad y ver su correlación entre éstas; encontrando que la presencia de GC se correlaciona con daño en la integridad acrosomal, el cual, está relacionado con el ambiente epididimario, que genera espermatozoides inmaduros con presencia de GC. También puede alterar los componentes de la membrana acrosomal, cerdos con menos GC tendrán más integridad acrosomal, por lo tanto, estos investigadores concluyen que los defectos tanto morfológicos como de membrana se presentan conjuntamente en un eyaculado²². Así mismo **Pérez et al., (1998)** al realizar el test de HOST (H+/H-) en 119 eyaculados con diferente porcentaje de GC, observó que los eyaculados con GC distal pueden reaccionar bien a un H+, pero los que tienen

GC proximal tienden a reaccionar menos a los H+, encontrando correlación positiva en las muestras que tenían GC proximal y su grado de reacción de H+; ya que el tipo de anomalía indica el grado de madurez del espermatozoide, mismas que se asocian a defectos funcionales o estructurales de la membrana, lo que disminuye su capacidad fecundante.²³

Por otra parte, la motilidad no necesariamente correlaciona con la viabilidad o con la fecundidad, como lo reporta **Chun-Xia y Zeng-Ming (2000)**, al evaluar dosis seminales a diferentes temperaturas (4, 15, 20 y 39 °C) en los cuales se les evaluó la motilidad, viabilidad, integridad acrosomal y la presencia de GC, esto durante 48 horas, encontrando que se conservan las características de los espermatozoides a una temperatura de 15 – 20 °C, a su vez se observó una correlación alta entre las pruebas realizadas (0.8554 a 0.9729), también observó que hay espermatozoides móviles, pero que tiene reacción H-, al comparar los rangos de motilidad con los de H+; esto se debe tal vez a que aun que el espermatozoide tenga un daño en la membrana, estos siguen aún con movimiento.²⁴ En este estudio la motilidad en promedio estuvo en el rango arriba del 70%, pero al final los resultados de HOST variaron en un rango de 42 – 48 %, lo cual concuerda con lo propuesto por los investigadores antes mencionados.

En lo concerniente a las tinciones para membrana, estas están diseñadas para conocer la integridad estructural, pero no para conocer su integridad funcional.²¹ En esta investigación, se observa una gran variación entre los datos de espermatozoides con reacción HOST tanto en la técnica de laboratorio (44.35 ± 1.89) y la técnica modificada (48.10 ± 1.62), en comparación

con la tinción vital (92.77 ± 1.33) esto se explica ya que aún siendo la misma membrana, esta no pueda reaccionar a HOST, pero sí al paso de eosina, lo que concuerda con la investigación realizada por **Jeyendra et al., (1984)** al establecer las bases de la prueba de HOST para evaluación seminal en humano, en donde encontró que la combinación de fructuosa y citrato de sodio a una concentración de 150 mOsm se puede ver claramente la reacción H⁺, ya que los porcentajes de H⁺ se relacionan con el porcentaje de penetración de ovocitos de hámster, lo cual confirma los resultados de la prueba con la capacidad fecundante en el macho. Al mismo tiempo, comparó estos datos con los obtenidos por una tinción vital a base de eosina, encontrando diferencia en ambos, concluyendo que los datos de la prueba de H⁺ son las células realmente vivas y viables ¹⁷, lo que corrobora los resultados obtenidos en esta investigación.

Posteriormente en otro estudio realizado por **Vázquez et al., (1997)** al comparar la prueba de HOST con dos técnicas fluorescentes y una tinción vital, para evaluar la membrana espermática utilizando una mezcla de fructosa y citrato de sodio con 100 - 150 mOsm, con una incubación de 30 a 120 minutos. Al correlacionar los resultados de cada técnica, no encontró diferencia significativa entre las técnicas de fluorescencia y vitalidad, pero si entre éstas y los resultados de H⁺, por lo que concluye que un espermatozoide puede inactivar su membrana al momento de tener contacto con una osmolaridad diferente a la normal y que un espermatozoide vivo puede tener una membrana funcional incapaz de adaptarse a un medio hipo-osmótico, pero es capaz de prevenir la entrada de eosina. ²¹ Por tal motivo, la prueba de HOST es más

precisa para diferenciar poblaciones de vivos y muertos. Lo anterior respalda lo encontrado en esta investigación, ya que se observó una gran diferencia de espermatozoides al inicio y al final de cada prueba, concluyendo que los que tienen reacción H⁺ son realmente los que están vivos.

En este estudio se trabajó con BTS para realizar la solución hiposmótica a usar tanto en la técnica de laboratorio como la técnica modificada corta y se agregó agua destilada para bajar la osmolaridad a 75 mOsm en ambos casos, como lo reportó **Pérez et al (1998)**²⁵ quien observó la mayor cantidad de espermatozoides que reaccionan a H⁺ a esta concentración, esto al someter 28 eyaculados a diferentes tiempos de incubación (1, 5, 10, 15 y 120 minutos) y osmolaridad de 37, 75, 150, 300 mOsm, utilizando dos diluyentes comerciales, donde evaluó la cantidad de H⁺ e integridad acrosomal, esto para comparar lo propuesto por **Schilling et al (1984)**²⁶ quien propuso la prueba de resistencia osmótica (ORT) para evaluar la capacidad de conservación del semen de cerdo y su viabilidad, donde propone la utilización de un medio TRIS utilizándolo a 150 mOsm, incubando por 120 minutos a 37 – 38 °C las muestras de semen, su objetivo fue comparar la resistencia osmótica de las membranas del espermatozoide, para predecir el comportamiento en lo referente a la fertilidad y su capacidad de conservación. Donde concluye que los resultados obtenidos por el ORT presentan una correlación alta y positiva con la capacidad fecundante de los espermatozoides. **Pérez et al.**, encontraron que a los 75 mOsm y acortando el periodo de incubación, se tienen los mismos resultados que manejando 150 mOsm por 120 minutos, a su vez observó que a

los 37 mOsm se tiene un daño en las membranas muy rápido. Concluyendo que se tienen los mismos resultados en menor tiempo y menor osmolaridad.²⁵

Posteriormente esto quedo refutado cuando **Pérez et al., (1998)**²⁷ comparó los resultados obtenidos por ORT y HOST al realizar las pruebas a diferentes tiempos y concentraciones mencionadas con anterioridad. En esta ocasión encontró que se tiene la misma cantidad de H⁺ a los 75mOsm a 1 min y los 120 mins, que lo referente a 150 mOsm a los 30 y 120 mins. Solo encontrando diferencia entre el número total de colas enrolladas entre las osmolaridades que se manejan, pero no hay variación entre los tiempos de incubación al momento de realizar la toma de muestra para la lectura de H⁺. De acuerdo a estos resultados se eligió el tiempo de incubación para la técnica larga de 60 minutos y en la corta de 30 min.

Estos estudios sustentan ciertos pasos y tiempos a considerar para la realización de las técnicas de este trabajo, también se tomó como base lo propuesto por **Gutiérrez-Pérez (2011)** quien sugiere que al realizar la prueba de HOST, con una tinción para evaluar el acrosoma, se utilicen dos técnicas diferentes para analizar muestras de semen, pero al mismo tiempo. De tal manera que en una sola evaluación se puedan obtener datos de funcionalidad e integridad que sirvan como marcadores pronósticos de la capacidad fertilizante del semen.^{28, 29}

La importancia de una membrana integra es que la función de esta, sea una barrera selectiva, durante la fertilización el espermatozoide se encuentra con un medio hostil donde tiene que tener integridad para atravesar el tracto de la hembra y llegar al sitio de fertilización.

Los resultados de H+ obtenidos en este trabajo se pueden clasificar como aceptables de acuerdo a la clasificación propuesta por **Pérez et al.**³⁰, al realizar la lectura de espermatozoides con HOST, arrojando cuatro clasificaciones de los eyaculados: malos (30 – 40 %), aceptable (41 – 60 %), bueno (61 - 70 %), muy bueno (de 71 - 100 %), estos grupos los relacionó con el porcentaje de fertilidad, encontrando que a rangos de H+ altos, se tendrá una mejor fertilidad. Los valores que se obtuvieron al realizar la prueba dual en esta investigación van de 44.35 a 48.10%. 37

Se observó que las muestras trabajadas bajo las condiciones de Laboratorio presentan mayor cantidad de espermatozoides dañados (11.67 ± 3.16) a diferencia de la técnica modificada corta (9.23 ± 2.23). Esto puede explicarse debido a que la centrifugación y la re-suspensión del pellet tienen un efecto negativo en la membrana del espermatozoide.³¹

Lo anterior lo respalda **Carvajal et al. (2004)**³² al someter muestras de semen porcino a diferentes tiempos (3, 5, y 10 minutos) y a 2400, 1600 y 800 rpm, respectivamente. Encontrando que se tiene menor daño sobre las membranas del espermatozoide utilizando menor tiempo de centrifugación y altas rpm (2400 x 3mins), y todo lo contrario al manejar menores rpm y mayor cantidad de rpm (800g x 10 mins), recomendando el primer tiempo para los protocolos de conservación de semen de cerdo. El daño es debido a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual concuerda con otras investigaciones realizadas en rata³³, ratón³⁴ y humano^{35, 36, 37} donde se evidencia el daño mecánico y la lipoperoxidación que causan las ROS lo que

genera daños irreversibles y altera la función de los espermatozoides, reduciendo su capacidad fertilizante y viabilidad.³²

Aunque los resultados de este estudio concuerdan con otros reportes encontrados en diferentes especies, la presencia de acrosomas dañados en el proceso de laboratorio no es estadísticamente significativa, por lo cual es una prueba que se puede realizar, sin que estos hallazgos demeriten su aplicación.

Lo mismo pasa en la técnica modificada, en la cual el aumento de acrosomas reaccionados es porque en esta metodología, no se utiliza el cloruro de amonio, el cual es un estabilizador y buffer de las membranas, por eso los espermatozoides, siguen con el proceso normal de su degeneración acrosomal y se observa el aumento de acrosomas perdidos, pero son resultados que no tienen significancia estadística.

Dado lo anterior, las dos metodologías son igual de validas, pero la técnica modificada implica un ahorro de tiempo, material y obtención de un diagnóstico.

El acrosoma es una estructura localizada en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide, en específico en la región acrosomal, es una vesícula formada por una membrana acrosomal interna y una membrana acrosomal externa, el acrosoma se compone de dos segmentos(región acrosomal y región ecuatorial) y cubre la parte anterior del núcleo del espermatozoide. La forma y tamaño de esta estructura varía según la especie, en el interior de él se encuentra una gran cantidad de enzimas de las cuales se conocen gran cantidad, de entre las cuales destacan: Hialuronidasa, acrosina,

proacrosina, proteinasa acida, esterasa, neuraminidasa, fosfatasa, fosfolipasa A, N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa, arilaminidasa, colagenasa, N-acetilexosaminidasa, galactosidasa, L-fucosidasa, fosfolipasa C, catepsina D, catepsina L, ornitina descarboxilasa, calpaina II, metaloendoproteasa, esterasa caproyl, peptidasa peptidil. Estas enzimas tienen un papel importante, para el proceso de fertilización, para esto se necesita que los espermatozoides tengan un acrosoma integro y que la membrana plasmática este estructural y funcionalmente activa, dicho proceso consiste en tres etapas importantes, capacitación espermática, unión espermatozoide-ovocito y la reacción acrosomal.³⁸

La capacitación se lleva a cabo durante el trayecto del espermatozoide por el tracto reproductor de la hembra, proceso por el cual el espermatozoide por medio de cambios fisicoquímicos adquiere la capacidad de fertilizar, en esta etapa la célula espermática sufrirá cambios en la concentración intracelular de K^+ y Na^+ , tendrá un aumento en su metabolismo (actividad glucolítica y consumo de oxígeno), aumento de la actividad de la cAMP adenil ciclasa para mantener en movimiento al espermatozoide, a su vez en el núcleo se tendrá una salida de Zn^+ para tener una mejor estabilidad de sus membranas, en el interior del acrosoma algunas enzimas pasarán de ser una forma inactiva a activas y la membrana espermática tendrá cambios, ya que algunos componentes que la recubren se removerán o se alteraran por factores descapacitantes.³⁸

La importancia que tiene el acrosoma, es que cuando se da el reconocimiento entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito, se lleva

a cabo un proceso especializado, en el cual se unen las membranas citoplasmáticas interna y externa de la vesícula acrosómica, lo que genera la formación de poros y la liberación de las enzimas de su interior, proceso llamado reacción acrosomal, lo que le da al espermatozoide la oportunidad de que entre el núcleo del espermatozoide al ovocito y se lleve a cabo la fecundación, que es el objetivo del proceso de IA, el cual, es utilizar espermatozoides con excelentes características que puedan culminar todos los procesos para la fertilización.

De acuerdo a lo explicado anteriormente, es necesario contar con técnicas que permitan valorar esta estructura para determinar la calidad del espermatozoide.

Como el acrosoma contiene las enzimas necesarias para que el espermatozoide pueda penetrar y fertilizar el ovocito, un menor daño acrosomal durante su proceso de evaluación y criopreservación, aumenta la tasa de fertilidad resultante.³⁹

También se sabe que si hay más reacción acrosomal o acrosomas dañados, hay una alta probabilidad de tener una baja fertilidad, por lo cual la evaluación de la integridad de esta estructura es un diagnóstico importante para conocer la calidad del eyaculado.²²

Con base a lo anterior, existen metodologías confiables y efectivas, las cuales nos ayudan a conocer esta estructura como las propuestas por **Pursel y Johnson (1973)**⁴⁰ a base de fijación de los espermatozoides con glutaraldehído, o la descrita por **Berger (1989)**⁴¹ utilizando una tinción

fluorescente. Estas técnicas son bastante utilizadas, a nivel de investigación o para laboratorios que tengan los microscopios adecuados (contraste de fases, electrónico de transmisión); lo cual, dificulta una aplicación práctica en granjas que practican la IA.

La técnica propuesta por **Larson y Miller (1999)**¹³ utilizando la tinción de Coomassie para la evaluación de acrosoma, es económica, fácil de realizar y se puede utilizar un microscopio de luz convencional, lo cual hace más efectiva su aplicación en cualquier tipo de explotación porcina que usa la IA, motivo por el cual se utilizó en el desarrollo de la metodología de la prueba dual Coomassie/HOST, propuesta por **Gutiérrez –Pérez (2011)** y modificada en este estudio.

Lo más importante es que esta prueba dual nos da la oportunidad de valorar al mismo tiempo la integridad acrosomal y la funcionalidad membranal, aunque sean técnicas diferentes y que en la vida real se realizan independientemente una de otra, se pueden evaluar al mismo tiempo en una misma laminilla.

9. CONCLUSIÓN

La prueba dual Coomassie/HOST es una técnica de evaluación de espermatozoides de verraco aplicable a nivel de campo, que fortalecerá la información que brinde una evaluación seminal de rutina.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. M.E. Trujillo O; R.G. Martínez G; M.A. Herradora L.: La Piara Reproductora. Mundi-prensa.1° Edición. México, 2002. Capítulos 14 y 15. Páginas.: 147-163, 165-187.
2. S. Martin Rillo: Reproducción e Inseminación Artificial Porcina. AEDOS. 1° Edición. España, 1982.
3. P. E. Hughes; M.A. Varley: Reproducción del Cerdo. Editorial Acribia. Zaragoza, 1984.
4. C.O. Olegario H; C. Tamargo M; C. Diez M.: Análisis del semen bovino. Información ganadera. Boletín informativo del SERIDA. N° 2.
5. Quintero M. A: Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis de Doctorado. Ballaterra, Barcelona, 2003.
6. Roberto G. Martínez Gamba: Principales factores que afectan la reproducción del cerdo. Ciencia Veterinaria (8). México, 1998.
7. Hafez E.S.E: Reproducción e inseminación en animales domésticos. Mc Graw-Hill. 3° edición. México, 1996. Capítulos 19 y 20. Páginas 379 - 396 y 397 - 411.

8. Tapia V. E: Efecto de la adición del ácido lipoico a distintas dosis en la dieta de verracos y su repercusión sobre la calidad del eyaculado. Tesis licenciatura. FMVZ-UNAM. México D.F. 2008
9. Córdova I, M. S. Córdova J, C. A. Córdova J, J. Pérez G, S. Martín R.: Congelación de semen de verraco en dos tipos de pajillas y capacidad fecundante un vitro de los espermatozoides. *Ciencia Ergo Sum*. Vol.12. N°003. UAEM. Toluca. México, 2005.
10. Inseminación artificial. Boletín técnico KUBUS: Aglutinación espermática.
Disponibile en:
<http://www.kubus-sa.com/articulos/pdf/AGLUTINACION-ESPERMATICA.pdf>
11. J. Gadea: La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro* (Revisión). *Invest. Agr. : Prod. Sanid. Anim.* Vol. 16 (1), 2001.
12. Osorio S. Ricardo E, Giraldo J. F, Mesa H, Gómez L. G, Henao-Uribe F. J.: Evaluación de la integridad acrosómica en semen de verraco. *Vet. Zootec.*1 (1): 41 - 47, 2007.
13. Larson L. Jennine, Miller J. David: Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Molecular Reproduction and Development*. 52: 445 - 449 (1999).
14. Manual de laboratorio de histología y anatomía: Manejo de las técnicas histológicas. Q.F.B. BUAP. Puebla. 2009

15. S. Ladha.: Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. *J. Membrane Biol.* 165:1-10 (1998).
16. Campi S, González J, Blasi C, Suhevic J, Bonet S, Cisale H.: Comparación entre distintos tiempos de lectura en el test de endosmosis.

Disponible en:
[http://www.laboratoriollamas.com.ar/articulos/porcinos/Semenporcino test de endosmosis.pdf](http://www.laboratoriollamas.com.ar/articulos/porcinos/Semenporcino%20test%20de%20endosmosis.pdf)
17. R. S. Jeyendra, H. H. Van der Ven, M. Pérez- Peláez, B. G. Crabo, L. J. Zaevelde: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.* 70: 219 - 228 (1984).
18. Caiza C. F, Rigau T, Pujol R, Piedrafita J, Rodríguez – Gil J. E: Resistance to hyperosmotic stress in boar spermatozoa: the role of the ionic pumps and the relationship with cryosurvival. *Animal Reproduction Science.* 48, 301-315 (1997)
19. García R. José A: Tecnología de punta en la inseminación artificial. *Nuestro acontecer porcino.* Vol. II. No. 8. Jul- Ago. 1994

20. Pérez Llano B; Lorenzo G. J. L; Clemente M. J; García C. P: El test de endosmosis (HOST) en semen de Ganado Porcino. Gestión Veterinaria Porcina S. L: Madrid.

Disponible en:

<http://194.30.13.80/administracionweb/imagenes/grporcina/albeitar30host.pdf>

21. Vazquez J. M, Martínez E. A, Martínez P, Garcia-Artiga C, Roca J: Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. Theriogenology 47: 913 - 922. 1997.

22. Díaz Franco. O, Mesa H, Valencia Mejía J. G, Gómez L. G, Henao Uribe F .J: Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplasmáticas persistentes. Revista Científica, FCV-LUZ/Vol. XIX, N° 5. 500 - 505. Colombia, 2009.

23. Pérez-Llano B., Sánchez-Sánchez, R. Clemente-Portales, M.J. García-Casado, P: Plasma membrane functionality of boar spermatozoa with abnormal forms. Gestión Veterinaria Porcina.

Disponible en:

www.194.30.13.80/Administracionweb/Imágenes/gvporcina/bsp99_hostcfa.pdf

24. Chun-Xia Zou, Zeng-Ming Yang: Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during in vitro storage under different temperatures. *Theriogenology*. 53: 1477 - 1488 (2000).
25. Perez L. B, Sanchez S. R, Lorenzo G J. L, Garcia C. P: A short version of the osmotic resistance test for boar semen. 15th IPVS Congress, Birmingham, England.1998.
26. Schilling E, Vergust M., Smith D. A new test to predict the freezability and storage of board spermatozoa. 15th IPVS congress, Birmingham, England.1998.
27. Perez L. B, Garcia C. P. Lorenzo J. L, Sanchez S .R: The response of boar sperm to the HOST test and relationship between HOST and ORT results.15th IPVS congress, Birmingham, England. 1998.
28. Gutiérrez P. Oscar: Valoración In Vitro de la capacidad fecundante del espermatozoide de cerdo, criopreservado en diluyentes formulados con trehalosa y una baja concentración de glicerol. Tesis Doctorado.FMVZ-UNAM.Mexico.2009.
- 29 Gutiérrez - Pérez O, Juárez M. M. L, Uribe C. S, Trujillo O. M. E: Assesment of the fertilizing ability of trehalose/cryopreserved boar sperm

by the dual HOST/BBC assay. Rep. J. Dom. Anim.46 (suppl2).101-102.
(2011)

30 B. Pérez-Llano, R. Sánchez- Sánchez, J. L Lorenzo G, P. García-Casado: Study of the relationship between HOST and fertility in boar semen. Gestión Veterinaria Porcina.

Disponible en:

www.194.30.13.80/Administracionweb/Imágenes/gvporcina/bsp99_hostfertilidad.pdf

31 D. Lechniak.: The use of HOST test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacited *in vitro*. Short communication. Reprod. Dom. Anim. 37: 379 - 380 (2002).

32 G. Carvajal, C. Cuello, M. Ruiz, J. M. Vázquez, E. A. Martínez, J. Roca: Effects of Centrifugation Before Freezing on Boar Sperm Cryosurvival. Andrology, 25 (3): 389 - 396 (2004).

33 Cardullo R. A, Cone R. A: Mechanical immobilization of rat sperm does not exchange their oxygen consumption rate. Biol. Reprod. 34:820-830.1986.

34 Schreuders P. D, Jetton A. E, Baker J. L, Crister J. K, Mazur P: Mechanical and chill sensitivity of mouse sperm. Cryobiology.33:676-677.1996.

- 35 Markel A, Jakobi P: Effects of shaking and centrifugation on human sperm motility. Arch. Androl.7:21-26.1981.
- 36 Ng S. C, Bongso T. A, Sathananthan H, Tok V. C. N, Ratmam S. S: Microcentrifugation of human spermatozoa: its effect on fertilization of hamster oocytes after micro-insemination spermatozoa transfers. Human. Reprod. 5:209-211.1990.
- 37 Argawal A, Ikemoto I, Loughlin K. R: Effect of sperm washing on levels of reactive oxygen species in semen. Arch. Androl. 33:157-162.1994.
- 38 Knobil E. Neill D. J.: The physiology of reproduction. Mammalian fertilization. Vol.1. 2° edic. Raven Press, NY. Páginas: 192-245.
- 39 M. Barrientos M, M. L Juárez M, M. E. Trujillo O, F. Montiel P.: Alteraciones en la integridad del acrosoma y de la teca perinuclear en semen criopreservado de verraco. Zootecnia Trop. 27 (1): 17 - 24 (2009).
- 40 Pursel V. G, Johnson L. A: Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. Theriogenology. Vol. 1. No.2. 1974.
- 41 Berger T : Pisumsavitum agglutinin used as an acrosomal stain of porcine and caprine sperm.Theriogenology. Vol 33. No. 3. 1990.