



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

**UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**EFEECTO DEL VIRUS DE “OJO AZUL” ASOCIADO A
LEUCOSPERMIA SOBRE LA CALIDAD Y VIABILIDAD
ESPERMATICA EN VERRACOS**

T E S I S D E M A E S T R Í A
(Idónea Comunicación de Resultados)

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA

SILVIA GUADALUPE ESTRADA BARRÓN

COMITÉ TUTORAL

Director:

M. en C. Adelfa Del Carmen García Contreras

Asesor:

Dr. Humberto Ramírez Mendoza

Asesor:

Dr. José Antonio Herrera Barragán

MÉXICO D. F.

JULIO, 2008.

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones que otorgaron las facilidades necesarias para realizar este trabajo.

Laboratorio de Diagnóstico Clínico de La Policlínica Veterinaria y de Asesoría Zootécnica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (POLIVET-AZ-UAM-X) localizada en el Predio Académico de Las Ánimas, en Tulyehualco, Delegación Xochimilco, D. F.

Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México, D. F.

Contó con el apoyo de Proyecto SAGARPA-CONACYT 2004 C01-61

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

A mi directora de tesis, M en C Adelfa del Carmen García Contreras por haberme brindado la oportunidad, los conocimientos y todo lo necesario para realizar este trabajo; a mis asesores, Dr. Humberto Ramírez Mendoza y al Dr. José Antonio Herrera Barragán por aportar sus conocimientos y apoyo.

Al Dr. Héctor Castillo Juárez, por su enorme colaboración y asesoría, para realizar la parte estadística, además de sus valiosas aportaciones para la mejoría de este trabajo; al Dr. Germán D. Mendoza Martínez, por su colaboración para complementar este trabajo.

A ti mi amado Alfonso, por estar junto a mí con tu amor, comprensión, apoyo y tu valiosa ayuda para terminar este trabajo; a nuestros queridos hijos Alfonso y Citlalli, porque a su manera me apoyan y comprenden.

A mi gran familia, Padres y hermanos con sus familias, porque estamos unidos y con cariño siempre, los quiero.

A mi otra familia, en especial a Simo y Francisco, porqué siempre cuento con ellos y por el cariño mutuo.

A mi amiga Patricia Edurne, por coincidir en esta etapa de nuestra vida.

Al gran equipo de trabajo Ma. de Lourdes, Rebeca, Francisco, Miriam, Karen, que con su valiosa y enorme colaboración logramos alcanzar uno de los objetivos de este enorme proyecto.

A Camilo, Yazmin, Daniel y Faviola, por contribuir en este trabajo.

INDICE

	Página
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO	9
2.1. GENERALIDADES	9
2.1.1 Etiología de la enfermedad	9
2.1.2 Patogenia	11
2.1.3 Signos clínicos	12
2.1.4 Lesiones macroscópicas en órganos y sistemas	14
2.1.5 Diagnóstico	15
2.1.6 Epidemiología	16
2.2 RESPUESTA INMUNE	17
2.3 EYACULADO	18
2.3.1 Espermatozoides	19
2.3.2 Evaluación seminal	22
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. Objetivo general	26
4.2. Objetivos particulares	26
5. HIPÓTESIS	27

6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Periodo experimental	28
6.2. Evaluación sanitaria	30
6.3. Sistema de inoculación de los verracos	31
6.4. Evaluación seminal básica	32
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8. CONCLUSIONES	48
9. LITERATURA CITADA	49
10. ANEXOS	61

RESUMEN

Se determinó el efecto del virus de la enfermedad de ojo azul (EOA) asociado a leucospermia, sobre la calidad y viabilidad espermática en verracos. Se utilizaron 9 sementales híbridos de línea materna York-Landrace, con una edad de 6 meses, peso vivo promedio de 100 kg, clínicamente sanos. El estudio se desarrolló en dos etapas una de campo (EC) y otra de etapa en condiciones controladas de experimentación (ECC), ésta última se subdividió en dos fases una previa a la inoculación (FPI) vía oronasal con el *Rubulavirus porcino* (virus de la enfermedad de ojo azul), donde el semen fue colectado durante 10 semanas y 20 semanas en la fase posterior al desafío con el virus (FPOI), una vez cada semana, utilizando la técnica de la mano enguantada. Se evaluó volumen seminal, porcentajes de espermatozoides vivos, de anomalías espermáticas, de motilidad progresiva, concentración espermática, y cuantificación de leucocitos en semen. Los resultados mostraron diferencias entre las fases en la concentración espermática, en porcentaje de anomalías y en la concentración de leucocitos en semen ($P < 0.05$). Así, el virus de la EOA, estuvo asociado a leucospermia, disminuyó la concentración espermática, incrementó las anomalías morfológicas pero no afectó el volumen seminal, la motilidad progresiva ni la viabilidad espermática.

Palabras clave: virus de ojo azul, leucospermia, semen, verraco, calidad y viabilidad espermática

Abstract

It was determined the effect of blue eye virus disease associated to leukocytospermia on the sperm quality and viability in boars. Nine boars were used, hybrids of maternal line (York-Landrace), with an age of 6 months years old, with an average body weight 100 kg, clinical healthy. The study was divided into two stages, one in farm (EC) and other in experimentation controlled conditions (ECC), the last one was subdivided in two phases, one before oronasal inoculation (FPI) with the porcine *Rubulavirus* (virus of blue eye disease) where the semen was collected during 10 weeks and 20 weeks in the phase after the challenge with the virus post inoculation (FPOI), once every week, using by the gloved hand technique. It was evaluated the seminal volume, percentages of live spermatozoa, abnormal morphology, progressive motility of spermatozoa, sperm concentration, and quantification of leukocytes in semen. Results showed differences among phases in sperm concentration, percentage of abnormal spermatozoa and leukocytes numbers ($P < 0.05$) in semen. Then, the blue eye virus was associated to leukocytospermia, decreased sperm concentration, increased the morphologic abnormalities, but did not affected the seminal volume, the progressive motility neither the sperm viability.

Keywords: blue eye virus, leukocytospermia, semen, boar, quality and sperm viability

1. INTRODUCCIÓN

A principios de 1980 se observó, por primera vez en México una enfermedad caracterizada por signos nerviosos en lechones y opacidad de la córnea en cerdos mayores, a la que se le denominó como Enfermedad de “Ojo Azul” (EOA). Es causada por un virus que pertenece a la familia *Paramixoviridae*, del género *Rubulavirus* especie *porcino* (RVP) (Stephano *et al.*, 1981).

Los primeros casos de la enfermedad fueron observados en granjas de La Piedad, Michoacán, pero rápidamente ésta se difundió a granjas de los Estados de Guanajuato, Jalisco y al resto de Michoacán; con frecuencia los animales afectados presentaban opacidad en la córnea, tanto en cerdos de granja como de traspatio (Stephano, 1986c).

En 1982 la enfermedad se diagnosticó en el Estado de México; en 1983 en el D. F., Nuevo León, Hidalgo, Tlaxcala, Yucatán, Tabasco y Querétaro; y, en 1984 en Tamaulipas. Muestreos serológicos han determinado que en los Estados mencionados, existe la presencia de anticuerpos contra el *Rubulavirus porcino*. Los Estados del altiplano de México y especialmente La Piedad Michoacán continúan siendo la principal zona de infección y diseminación de la EOA hacia estados libres de la enfermedad (Solís, 2002a).

El virus se diseminó rápidamente por la falta de conocimientos de los porcicultores, así como de los médicos veterinarios ante la nueva enfermedad. El manejo inadecuado de los animales, la propagación del virus por efecto iatrogénico e ingreso de los animales seropositivos, favoreció la diseminación y expansión de la EOA hacia las granjas no infectadas (Stephano, 1986b).

En un análisis de los brotes de la enfermedad se encontró que además de los signos mencionados, encefalitis y la opacidad de la córnea, se produce neumonía intersticial, aumentos de la mortalidad en lechones y cerdos recién destetados y falla reproductiva en las cerdas; también se caracteriza por disturbios del sistema nervioso central. Además, se le responsabiliza como predisponente de problemas respiratorios. Los signos clínicos son variables y dependen de la edad y susceptibilidad de los cerdos (Stephano, 1986a). El virus de la EOA altera sensiblemente los parámetros de las características productivas de las granjas, presentándose un claro efecto sobre la reproducción aunado con la elevación de la mortalidad en lechones y un ligero efecto sobre la mortalidad de animales en etapa de destete (Carreón, 1986).

La enfermedad puede afectar la capacidad reproductiva y provocar infertilidad en el verraco (Stephano *et al.*, 1990). Los verracos que se ven afectados con este padecimiento no muestran cambios en su comportamiento sexual, sin embargo, la integridad testicular y los parámetros reproductivos se ven seriamente afectados (Ramírez *et al.*, 1997; Solís *et al.*, 2001a).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES

Desde el inicio de los 80's Stephano *et al* asociaron la enfermedad con un virus hemaglutinante (Stephano *et al.*, 1981). Debido a la dificultad inicial de reproducir los signos en animales, estos autores denominaron al problema como síndrome del ojo azul. Al tener certeza de que la enfermedad era generada por un *paramixovirus porcino*, denominaron la infección como la enfermedad del ojo azul. Constituye un padecimiento de los cerdos y fue descubierta en México en 1980. Ha sido diagnosticada únicamente en este país, la zona más afectada es la que comprende los Estados de Michoacán, Jalisco y Guanajuato. Además se ha diagnosticado en los Estados de México, Querétaro, Hidalgo, Tlaxcala y Puebla (Stephano *et al.*, 1981; Stephano *et al.*, 1988). Este padecimiento es uno de las más graves en el centro del país, en la actualidad provoca fuertes estragos sanitarios (Stephano *et al.*, 1985a).

2.1.1. Etiología de la enfermedad

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es un virus emergente; es el agente etiológico de la EOA. Debido a su similitud estructural, funcional y genética con los virus de la parotiditis humana (VPH), parainfluenza humana 2, 4 y parainfluenza 5, este virus fue clasificado como especie porcina del género *Rubulavirus*, subfamilia *Paramixovirinae*, familia *Paramixoviridae*, orden *Mononegavirales*. El genoma del virus está formado por una sola molécula de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa, la cual se divide en seis genes. La nucleocápside es de forma helicoidal

y se constituye por la unión íntima de la nucleoproteína con el ARN, al cual también se asocian las proteínas L y P que forman un complejo con la actividad de polimerasa de ARN. La nucleocápside se encuentra rodeada por una membrana lipoproteínica de origen celular que presenta hacia el interior del virión la proteína matriz (M) y hacia el exterior las glicoproteínas de fusión (F) y la hemaglutinina neuraminidasa (HN). La glicoproteína F es responsable de la fusión de las membranas celular y viral, la lisis de eritrocitos y la formación de sincicios en cultivos celulares; mientras que la glicoproteína HN reconoce al receptor celular y posee la capacidad de hidrolizar ácidos siálicos celulares (actividad neuraminidasa). La función de la glicoproteína HN es crucial porque constituye el primer paso en la introducción del virus a la célula, en el RVP este proceso involucra el reconocimiento de moléculas de ácido siálico unido por enlace glucosídico α 2.3 a galactosa, las cuales se localizan en las porciones terminales de glicolípidos y glicoproteínas de membranas celulares. La expresión de estas moléculas en el sistema nervioso central es abundante en animales recién nacidos y sufre modificaciones durante el proceso de maduración de los cerdos, lo que constituye un factor determinante de la susceptibilidad de este tejido a la infección por el RVP en cerdos lactantes y de resistencia en cerdos adultos. Además, la proteína HN es el antígeno inmunodominante en las infecciones experimentales en cerdos adultos (Hernández *et al.*, 1998; Reyes *et al.*, 2004).

Este virus se replica con facilidad en cultivos primarios de células del riñón de cerdo (PK15) y líneas celulares de testículo de cerdo (ST). Las propiedades fisicoquímicas del *Rubulavirus* son: Capacidad de hemoaglutinar eritrocitos de una

gran variedad de mamíferos y aves, incluyendo al humano tipo A, B, AB y O; hemoadsorción en células PK15 infectadas 72h antes, se inactiva a 56°C después de 4h y la hemoaglutinación viral se pierde hasta 48-60h a 56°C; es sensible a solventes de lípidos como el éter y cloroformo, los cuales lo inactivan; resiste a la actinomicina D, indicando presencia de RNA en su genoma (Carreón, 1986; Stephano, 1986b; Taylor, 1995).

2.1.2. Patogenia

El RVP tiene afinidad por tejido nervioso de cerdos neonatos y lactantes, por células germinativas testiculares y de los conductos epididimarios en individuos pospúberes, por el tejido glandular como las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, ovarios e hígado, y por los órganos linfoides y hematopoyéticos. En cerdos infectados por vía intranasal se ha observado que el virus avanza progresivamente de la mucosa nasal hacia el sistema nervioso central, a través del nervio olfatorio y del trigémino, y hacia los pulmones por vía aérea. Sin embargo, el aislamiento del virus en órganos tan alejados del sitio de entrada sugiere que las vías sanguínea y linfática también están implicadas en la diseminación viral en el organismo (Reyes *et al.*, 2004).

La ruta natural de la infección es la nasofaringe, el sitio inicial de replicación es mucosa nasal y tonsilas, pasando de ahí al sistema nervioso central en un estado temprano de la infección, y se disemina por vía hematogena (Carreón, 1986).

En cerdos adultos se han identificado cambios en la expresión de sialoglicoconjugados; estos cambios se asocian con la maduración del tejido nervioso y están relacionados con la susceptibilidad a la infección con *Rubulavirus porcino*. Las modificaciones presentadas en la mucosa olfatoria y el sistema nervioso central (SNC) durante la maduración son suficientes para evitar el reconocimiento y la adhesión, de manera que el virus no logra infectar al SNC de los cerdos adultos, es por eso que las manifestaciones clínicas se limitan al aparato reproductor (Solís, 2002b).

Las diferencias patológicas entre cerdos de diferentes edades se deben en parte a la expresión diferencial de NeuAca2, 3Gal en los tejidos, ya que se encuentra una mayor proporción de este oligosacárido en el sistema nervioso central de cerdos neonatos y en el sistema reproductor de cerdos adultos que en otros tejidos (Santos *et al.*, 2004).

2.1.3. Signos clínicos

Las características de la infección con el RVP varían de acuerdo con la edad de los cerdos, en animales neonatos y lactantes menores de 3 semanas de edad, la infección afecta principalmente al sistema nervioso central, la cuál resulta fatal en el 90% de los casos. Los signos se presentan súbitamente, los animales se ven postrados, deprimidos o con problemas nerviosos. Los primeros signos son: fiebre, eritema cutáneo, pelo erizado, lomo arqueado, esta semiología se acompaña de 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 nistagmus. 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 (Pérez *et al.*, 1988; Stephano *et al.*, 1985a; Stephano, 1985c).

En cerdos de más de 30 días los signos nerviosos son raros y pocos animales mueren, el único cambio observado es la opacidad de la córnea en 1 al 4% de los animales infectados. Cuando llegan a presentarse los signos nerviosos existe: anorexia, depresión, incoordinación, marcha en círculo y movimientos pendulares de la cabeza, entre otros. También se presenta conjuntivitis y opacidad de la córnea. Se ha sugerido retraso en el crecimiento y disminución en el consumo de alimento. Los animales de mayor edad son más resistentes a la infección, la cuál se localiza principalmente en el aparato respiratorio (Stephano *et al.*, 1985a; Stephano, 1985b).

Es poco frecuente que los animales adultos desarrollen opacidad corneal. Las cerdas con camadas afectadas pueden no presentar semiología (Stephano *et al.*, 1985a; Stephano, 1985c). Al analizar los diferentes parámetros productivos en las granjas afectadas se observó incremento en el número de hembras

repetidoras, lo que ocasionó una caída en 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 al 50%; en estos lechones afectados, la mortalidad es del 87 al 99%. Este efecto en la maternidad dura entre dos y nueve semanas (Stephano, 1985b; Stephano, 1986c). En los cerdos machos adultos la infección afecta básicamente al epidídimo, testículos, próstata alterando los parámetros de las características productivas y ocasionando infertilidad (Solís, 2002b).

2.1.4. Lesiones macroscópicas en órganos y sistemas.

Los cambios macroscópicos que se le atribuyen a la infección por el virus de la EOA son escasos y ocasionalmente están ausentes. Frecuentemente 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 (Stephano, 1986c; Stephano *et al.*, 1988). La opacidad de la córnea por edema se aprecia con baja frecuencia en los cerdos muertos por la enfermedad, ésta generalmente es unilateral. En cerdos mayores de 30 días y convalecientes, la córnea edematosa llega a tener un grosor de hasta 3mm, 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 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 linfocitaria perivascular, en donde se observan linfocitos, células plasmáticas y células reticulares, neurofagia, 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 cornoescleral, la lámina limitante posterior o interna (membrana de Decement), 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 (Pérez *et al.*, 1988; Stephano, 1986c; Stephano *et al.*, 1988).

2.1.5. Diagnóstico

Se puede realizar serológicamente, utilizando el método de ELISA (acrónimo de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El diagnóstico diferencial deberá realizarse contra otras enfermedades que causen encefalitis y falla reproductiva como el caso de Aujezky (Stephano, 1986d).

El virus deja de circular libremente en la sangre a partir del momento en que la producción de anticuerpos muestra un nivel elevado, que ocurre en la segunda semana de infección (Reyes *et al.*, 2004). La EOA se auto limita y la inmunidad de la piara se adquiere naturalmente después de un brote y persisten los anticuerpos hasta por 15 meses (Ramírez *et al.*, 1999).

2.1.6. Epidemiología

La principal vía de entrada de la enfermedad a una granja es la introducción de cerdos infectados con o sin la opacidad de la córnea a piaras libres de anticuerpos. La transmisión por contacto directo se facilita debido a que los cerdos de más de 30 días son resistentes generalmente a la presentación de signos nerviosos y sólo un reducido número de cerdos desarrollan la opacidad de córnea. Se disemina más fácilmente en sistemas continuos de producción por la introducción constante de cerdos de diferente origen, también se puede diseminar por personas o vehículos provenientes de granjas infectadas (Stephano, 1986b).

Santos *et al.* (2004) sugieren que el *Rubulavirus* es capaz de permanecer por periodos prolongados produciendo una infección persistente subclínica en el hospedero, lo que puede tener un peso epidemiológico importante en la enfermedad, ya que un animal infectado asintomático puede servir como reservorio y fuente de infección para otros cerdos.

2.2. RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune es la capacidad del organismo animal para reconocer y destruir toda sustancia o cuerpo que se identifique como extraño. Esta respuesta puede ser de dos maneras: humoral, donde hay producción de anticuerpos, o celular, donde la función la llevan a cabo los leucocitos, células de la serie blanca de la sangre. Dentro de los leucocitos hay diferentes tipos: linfocitos (B y T), monocitos y granulocitos; los que normalmente se encuentran en plasma seminal, son los granulocitos, macrófagos y linfocitos T, una función de éstos últimos es que en presencia de un antígeno, emiten señales, éstas son moléculas de su membrana plasmática que interaccionan con los receptores de otra célula con la que coopera y con otras células más lejanas. Estas moléculas, verdaderas hormonas inmunológicas, se denominan genéricamente citoquinas; las cuales son proteínas reguladoras que son producidas y secretadas por leucocitos y otras células, las cuales tienen influencia en el crecimiento, diferenciación o función de las células. Las citoquinas son sintetizadas y secretadas bajo demanda, por ejemplo durante una infección viral, los virus se unen a los receptores de la célula activada productora de citoquinas, esta unión da como resultado una señal en cascada de transducción que involucra una fosforilación de Tirosina o Serina, y favorece la activación de los factores de transcripción que migran hacia el núcleo y regulan la expresión de los genes. Las diferentes citoquinas interactúan unas con otras, lo que resulta en un trabajo complejo que permite a la célula reaccionar a los estímulos patogénicos de una manera bien controlada (Ochsendorf, 1999).

Las citoquinas están implicadas en la fertilidad masculina. Son secretadas por diversas partes de la zona genital masculina y pueden ejercer efectos sobre la espermatogénesis y sobre funciones de espermatozoides. El semen humano contiene un repertorio de citoquinas, interleucinas (IL) y ciertos receptores solubles. Sin embargo, las concentraciones seminales de citoquinas no proporcionan sólo una medida de su liberación sino que también reflejan sus diversas interacciones con el espermatozoide (Dousset *et al.*, 1997).

La leucospermia, también conocida como leucocitospermia, leucospermia, ó piospermia, es usada para designar las concentraciones anormalmente altas de células blancas en semen (WHO, 1992). La mayoría de los glóbulos blancos en semen derivan del testículo y epidídimo. Una posible etiología de leucospermia es una infección genital subclínica (Keck *et al.*, 1998). Wolf *et al.* (1990) en un estudio determinaron que la leucospermia está asociada con la pobre calidad seminal en humanos, hay disminución en la motilidad, tipo de motilidad, concentración espermática y volumen seminal. Posteriormente González *et al.* (1992) encontraron resultados similares, además de la disminución en el porcentaje de espermatozoides viables y una hipofunción de las vesículas seminales humanas.

2.3. EYACULADO

Se divide en tres fracciones bien determinadas. (1) Fracción pre-espermática. Está constituida por las secreciones de las glándulas accesorias, principalmente de la próstata, vesículas seminales y algunos grumos procedentes de la glándula de Cowper. Esta fracción es transparente sin espermatozoides, con

alto contenido de bacterias y tiene un volumen aproximado de 10 mL (Martín-Rillo, 1982). (2) Fracción espermática. También se le llama fracción rica en espermatozoides, es de color blanco lechoso, constituida principalmente de espermatozoides normalmente conformados y de secreciones de las vesículas seminales y de la próstata. Esta es la fracción que interesa colectar para la inseminación artificial. Su volumen varía de 30 a 100 mL, dependiendo de factores como: estación del año, duración del día (horas luz), temperatura ambiente, medio ambiente social, nutrición, raza, edad y tamaño de los testículos (Martín-Rillo, 1982; Colenbrander y Kemp, 1990; Trujillo *et al.*, 2002). (3) Fracción post-espermática. A esta fracción también se le ha llamado fracción pobre en espermatozoides, está constituida por las secreciones de la próstata y de las glándulas de Cowper, principalmente al final de la fracción. Es de color blanquecino transparente con abundantes grumos de tapioca, con volumen de 200 mL o más (Martín-Rillo, 1982; Trujillo *et al.*, 2002).

2.3.1. Espermatozoides

Los espermatozoides se forman en los túbulos seminíferos de los testículos por una serie de divisiones celulares seguidas de metamorfosis que acompañan la maduración. Este proceso se llama espermatogénesis (Malmgren, 1996). El término de espermatogénesis es usado para describir el proceso en donde las células germinales del testículo se transforman en espermatozoides maduros; este proceso dura en los mamíferos de 30 – 70 días, aproximadamente. Se divide en

tres etapas, espermacitogénesis, meiosis, espermiogénesis. Con la espermacitogénesis se logran dos funciones principales: la primera división mitótica y segunda: espermatogonias tipo A, que son transformadas en espermatogonias tipo B, que son divididas otra vez por mitosis, para producir de esta manera un espermatocito primario, éste por división meiótica da origen al espermatocito secundario y una segunda división meiótica forma espermátidas. La espermiogénesis, comprende una serie de cambios morfológicos en la que las espermátidas inmaduras culminan en la generación de espermatozoides claramente diferenciados. Siendo como espermatozoides en la superficie luminal de los túbulos seminíferos, mediada por las células de Sertoli. Las características principales de la espermiogénesis, la formación del acrosoma a partir del aparato de Golgi, la condensación y elongación del núcleo, la formación del flagelo y su implantación al núcleo y el desecho de una cantidad excesiva de citoplasma. Esta diferenciación puede estar dada en 7 pasos (Fig. 1) (García–Gil *et al.*, 2002).

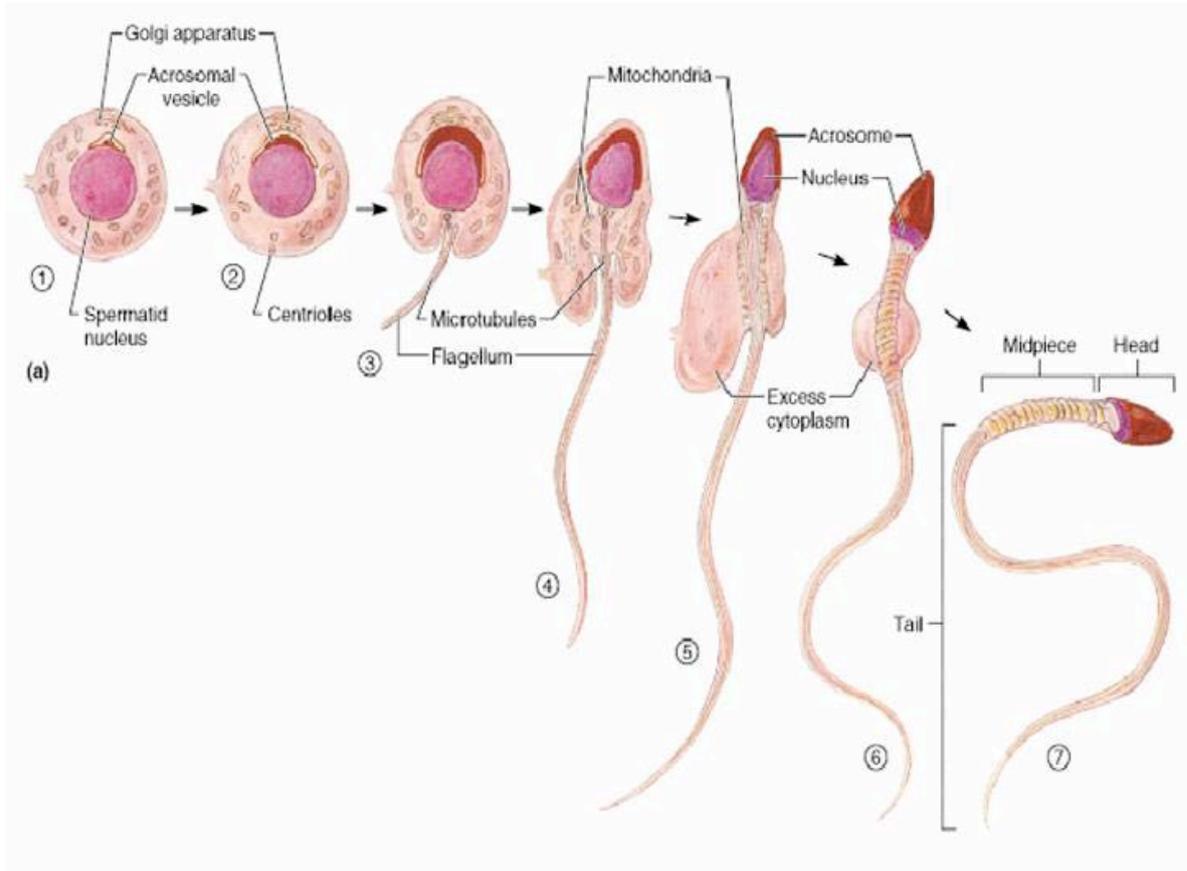


Fig. 1. Diferenciación del espermatozoide (García-Gil *et al.*, 2002).

El resultado de esta diferenciación da un espermatozoide totalmente diferenciado el cual consta de 3 regiones principales:(a) Cabeza: Membrana Celular. Contiene receptores que reconocen al ovocito, es de naturaleza lipoprotéica. Acrosoma. Contiene un lisosoma especializado con enzimas digestivas para la penetración al ovocito. Núcleo haploide. El cual se fundirá con el haploide del ovocito. Centríolos: organiza el axónema (los microtúbulos) del flagelo. (b) Mitocondria proporciona la energía (ATP) para la motilidad de esperma.

(c) El flagelo: látigo o cola, cuya función es la motilidad del esperma (García-Gil *et al.*, 2002).

2.3.2. Evaluación seminal

La evaluación de semen es de importancia fundamental, los métodos que se utilizan para la medición básica en el semen son:

a) Evaluación macroscópica:

Volumen: según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada semental, el volumen oscila entre 50 y 125 mL aproximadamente de fracción rica (Martín-Rillo *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2002; Rozeboom, 2003).

b) Evaluación microscópica:

Motilidad: es la valoración del movimiento de los espermatozoides, deberá realizarse inmediatamente después de la colecta. Se valoran dos parámetros, (1) el porcentaje estimado de espermatozoides que muestran algún tipo de movimiento progresivo; (2) el tipo de motilidad. La observación se hace a 40x para determinar el tipo de motilidad, y se dan valores de 0 a 5 (Martín-Rillo *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2002; Rozeboom, 2003).

Concentración espermática: consiste en la determinación de espermatozoides por unidad de volumen (Martín-Rillo *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2002; Rozeboom, 2003).

Morfología del espermatozoide: las malformaciones espermáticas de acuerdo a su origen se dividen en dos grupos, primarias y secundarias. Las

anormalidades primarias ocurren a nivel del testículo durante el proceso de la espermatogénesis. Las secundarias se presentan durante el proceso de maduración a nivel de epidídimo. A continuación se describen algunas anormalidades, sus posibles causas y porcentajes máximos permitidos.

Anormalidades en tamaño y forma de la cabeza: son el resultado de una alteración en el proceso de condensación de la cromatina y/o desarrollo del acrosoma; el porcentaje máximo permitido es 7%. Anormalidades a nivel acrosoma: se atribuyen a alteraciones en los estadios finales de la remodelación del núcleo y del acrosoma durante el proceso de espermatogénesis. La presencia de acrosomas vacuolados se asocia a un estrés térmico y a alteraciones en la maduración a nivel de epidídimo; el porcentaje máximo permitido es de 20 a 40%. Colas dobladas: se presentan por choque térmico, osmótico y/o de pH durante el manejo del semen, contacto con sustancias espermicidas, machos estresados por calor o con procesos febriles; el porcentaje máximo permitido es 20%. Gotas citoplasmáticas: macho sexualmente inmaduro, sobre utilizado, estrés térmico, traumatismos a nivel de epidídimo; el porcentaje máximo permitido de gota citoplasmática proximal es 10% y distal 15%. Colas enrolladas: respuesta a condiciones externas del ambiente como variaciones drásticas de temperatura, de pH, de presión osmótica, presencia de compuestos tóxicos rayos ultravioleta y contaminación bacteriana; el porcentaje máximo permitido es 7% (Fig. 2). Alteraciones a nivel del cuerpo medio del espermatozoide: el porcentaje máximo permitido es 5% (Martín-Rillo *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2002; Rozeboom, 2003).

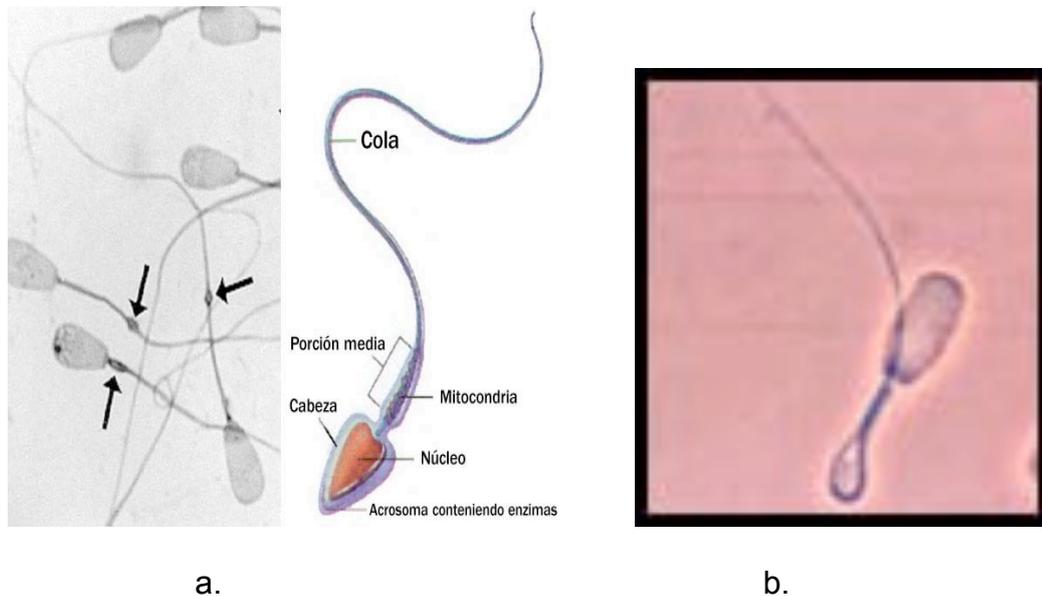


Fig. 2. Ejemplo de alteraciones morfológicas; a: Las flechas señalan gotas citoplasmáticas en diversos niveles de la cola que indican diferentes etapas de maduración; b: Cola en látigo (Agarwal, 2003) .

Viabilidad de las células espermáticas: considerado como espermatozoides vivos, para contarlos se pueden usar diferentes medios de coloración, colorantes como el Tripán Azul y Eosina-Nigrosina (Martín-Rillo *et al.*, 1996; Trujillo *et al.*, 2002; Rozeboom, 2003).

La determinación de la calidad seminal es un elemento fundamental de la valoración de un reproductor para detectar y controlar problemas de infertilidad y productividad (Solís, 2002a). Cada uno de los aspectos antes mencionados impactará directamente en el grado de calidad, control y consistencia de las dosis seminales empleadas en la inseminación artificial (Rozeboom, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

El virus de la enfermedad de ojo azul está reportado como etiología de la falla reproductiva del verraco, entre el 29 al 73 % de los animales infectados, los cuales pueden cursar por un proceso sintomático o asintomático, con alteraciones en la calidad seminal, infertilidad, llegando a estados de esterilidad. Cuando se adquiere una enfermedad viral se desencadena la respuesta inmune y una consecuente elevación en la concentración de leucocitos, sin embargo no se tienen reportes de que en el semen dicha concentración ha sido evaluada a la luz de esta enfermedad. No se le ha dado la importancia debida a la concentración de leucocitos en el eyaculado del verraco, lo que puede ser un buen indicador para establecer una evaluación adecuada de la calidad espermática. Por ello es necesario determinar en forma oportuna y precisa el efecto que tiene el virus de la EOA sobre la calidad espermática asociada a la respuesta inmune, registrar estos cambios y contribuir a la información que se conoce de ésta enfermedad, ya que está siendo un impedimento para posibles procesos de exportación de carne a países libres de esta enfermedad.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el efecto del virus de la enfermedad de ojo azul, sobre la producción de leucocitos en eyaculados de verracos y su relación con la calidad y viabilidad espermática, bajo condiciones de inoculación e infección controlada.

4.2. Objetivos específicos

Analizar el efecto de la inoculación del virus de la enfermedad de ojo azul, bajo condiciones controladas, en la calidad básica del eyaculado de verraco.

Determinar la presencia y concentración de células blancas (leucospermia) en semen de verracos diagnosticados como positivos a la enfermedad de ojo azul.

5. HIPÓTESIS

Si el virus de la enfermedad de ojo azul causa leucospermia en verracos, producirá una disminución en la calidad y viabilidad de los espermatozoides.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Periodo Experimental

El presente trabajo se desarrolló en dos etapas; la primera desarrollada en condiciones de campo (EC), previa a la inoculación con el virus de la enfermedad de ojo azul y la segunda en condiciones controladas de experimentación previo y posterior a la inoculación (ECC).

La etapa de campo (EC) se realizó en una granja porcina comercial de ciclo completo, libre de la infección de la EOA, localizada en Cuautla, Morelos. Durante esta etapa, los cerdos se mantuvieron sin infección con el virus de la enfermedad de ojo azul y siguieron alojados en la granja.

Los 12 verracos híbridos elegidos fueron línea materna York-Landrace, tenían un peso de 100 kg y una edad de 6 meses, fueron alojados en corrales de 4 X 6m. donde se colectaron las muestras de sangre y heces, para verificar su estado sanitario. Los verracos se mantuvieron en adaptación hasta que llegaron a los 130 kg de peso vivo.

Los verracos fueron trasladados a corraletas individuales de 0.60 X 1.20 m, y entrenados en el potro de monta durante un periodo de 15 días. Se trabajaron durante 10 semanas, obteniendo sus eyaculados para su evaluación básica y búsqueda de leucocitos.

Una vez que la EC finalizó, los verracos se trasladaron a las instalaciones de aislamiento y desafío del Departamento de Producción-Cerdos (NAD-DPA-C),

de la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde se desarrolló la etapa ECC.

La ECC, tuvo dos fases (F), las cuales correspondieron a la de Preinfección (FPI) y una de Posinfección (FPOI).

Para la ECC, se utilizaron 9 verracos, ya que con los 3 restantes no fue posible obtener muestras seminales, debido a su apatía, no mostraron libido y no usaron el potro de monta, así los 9 fueron colocados en jaulas individuales en la nave de aislamiento y desafío, se mantuvieron por 10 días en observación, se muestrearon con el mismo protocolo sanitario que se utilizó en la EC. Durante este periodo se obtuvo semen de los verracos, para determinar si en ello existían cambios sustantivos en la calidad del eyaculado que mostraron en la granja durante la EC.

Teniendo en consideración que no existieron cambios en las variables seminales, se inició el trabajo de eyaculación de los verracos, correspondiente a la FPI, a los 12 meses de edad, con una duración de diez semanas, tiempo durante el cual se eyacularon a los verracos, utilizando el mismo ritmo de trabajo que se tuvo en la EC y la misma metodología para la extracción y de evaluación seminal.

Se inició la FPOI con 9 verracos, teniendo éstos 14.5 meses de edad, y la fase tuvo una duración de 20 semanas. Los verracos recibieron la inoculación oronasal con la cepa PAC-3 del RVP, y fueron observados diariamente para registrar cambios en su estado físico general y manifestaciones de signos clínicos: Pirexia, anorexia, apatía, pérdida de libido y crecimiento testicular, además se

evaluó la temperatura rectal y el consumo de alimento. Esta revisión se realizó cada 24 horas.

Durante este periodo se realizó la evaluación seminal según el protocolo de la EC y FPI.

Posteriormente los verracos fueron separados al azar, para sacrificarlos.

6.2. Evaluación sanitaria.

Durante el inicio de la EC y la ECC, se obtuvieron muestras de sangre y de heces de los verracos, para verificar el estado sanitario y la ausencia de infecciones por virus que afectan el tracto reproductivo de los machos y en especial del virus de la EOA. Asimismo, se verificó la ausencia de parásitos en los animales.

Los análisis fueron realizados en el *Laboratorio de Diagnostico Clínico de La Policlínica Veterinaria y de Asesoría Zootécnica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (POLIVET-AZ-UAM-X)* localizada en el Predio Académico de las Ánimas, en Tulyehualco, Delegación Xochimilco, D. F.

La muestra sanguínea se obtuvo de la vena yugular, de forma rápida, fácil y segura, lo que favoreció la conservación de las características físicas y químicas de la sangre. Para la punción se emplearon agujas de 20 G x 32 mm (0.90 mm x 1") con base y tubos Vacutainer sin anticoagulante. Se obtuvieron 5 mL de sangre por cada animal (Carroll *et al.*, 1999; NOM-007-ZOO-1994) y se identificaron adecuadamente; fueron colocadas en contenedores térmicos con bolsas refrigerantes a una temperatura de 4°C, hasta su traslado al laboratorio de

diagnóstico clínico de la POLIVET-AZ, donde se separó el suero de cada una de ellas por medio de centrifugación a 1500 g y a una temperatura de 20°C durante 5 min. El suero se colocó en viales rotulados de 2 mL, sometiéndose a congelación hasta el día de su análisis serológico, para verificar que no existían anticuerpos contra virus de la EOA, del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS), enfermedad de Aujeszky (NOM 037-Z00-1995) y Fiebre Porcina Clásica (NOM-007-Z00-1995).

También fueron tomadas muestras de heces directamente del ano para obtenerla libre de contaminación (Kraft, 1998). Las muestras fueron depositadas en bolsas de polietileno, donde después de ser etiquetadas con fecha, lugar de toma y número del animal, se transportaron en termo a temperatura de refrigeración (4°C) al laboratorio de POLIVET-AZ para su análisis coproparasitoscópico (Olivares, 2001). Con base a los resultados, los verracos fueron desparasitados y mantenidos en observación.

6.3. Sistema de Inoculación de los verracos.

Para la inoculación de los verracos se utilizó una cepa de *Rubulavirus porcino* PAC-3 Jalisco 1992 (Ramírez-Mendoza *et al.*, 1997), obtenida en el laboratorio de Microbiología de la FMVZ de la UNAM. El volumen de inóculo que se utilizó fue de 5 mL de virus en una dosis infectante en cultivo celular al 50% (DICC₅₀) de 1×10^5 por microlitro (Burlenson *et al.*, 1992), la cual fue aplicada a los sementales vía oronasal.

6.4. Evaluación seminal básica

La extracción de eyaculados, se realizó durante la EC y la ECC. En ambas etapas se utilizó la misma técnica de extracción, la cual ha sido reportada por Hancock y Hovell (Rooke *et al.*, 2001), y se aplicó un ritmo de colección semanal.

EL eyaculado no se fraccionó y el semen de los verracos fue analizado utilizando la técnica reportada por Martín-Rillo, 1982; Espinosa *et al.*, 2001; Solís *et al.*, 2002b; Gadea *et al.*, 2004. Las variables que fueron evaluadas fueron: volumen (mL); motilidad progresiva (%); concentración espermática con cámara de Newbawer (spz/mL); espermatozoides vivos y anormales (%). El tipo de anomalías evaluadas fueron: 1) Cola en látigo; 2) Gota citoplasmática Proximal y Distal (Gadea *et al.*, 2004; González-Urdiales *et al.*, 2006).

En el caso de la búsqueda de leucocitos en el eyaculado, se utilizó la técnica reportada por Henry (2001), utilizando un hematocitómetro y una pipeta de Thoma para el conteo de glóbulos blancos. Se realizó una dilución 1:10 del semen, en líquido de Turk (ácido acético glacial 2 mL, solución acuosa al 1% de violeta de genciana, 1 mL, y agua destilada 100 mL.), se colocó una gota del semen diluido en cada una de las mesetas de la cámara de Newbawer, se realizó la observación en un microscopio óptico a 40X, además de realizar un frotis con el semen fresco y perfectamente mezclado, se dejó secar y se tiñó con solución de Wright.

Para el análisis estadístico los datos obtenidos de volumen total, concentración, porcentaje de vivos, de motilidad y leucocitos se emplearon modelos lineales mixtos para mediciones repetidas (Littel *et al.*, 1998), y se

analizaron con el programa estadístico de SAS (Versión 9.1, 2004. SAS Institute Inc., Car y NC, USA), la concentración fue transformada utilizando el logaritmo base 10, y a la cantidad de leucocitos se le realizó una transformación de logaritmo + 1, para normalizar su distribución.

Las variables dependientes fueron volumen, concentración, espermatozoides vivos, motilidad progresiva, leucocitos y anormalidades y los efectos incluidos fijos y aleatorios en el modelo fueron días de inoculación y animal respectivamente.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se observa la evaluación de la concentración espermática. Los verracos producían en promedio $829.1 \text{ spz} \times 10^6 / \text{mL}$, siendo estos valores promedio mayores a los reportados por Jasco (1992) y Kolenbrander *et al.* (1993), (353 a $615.4 \times 10^6 \text{ spz/mL}$) para verracos entre 12 y 24 meses de edad. Sin embargo, al inocularse con el virus la concentración disminuyó desde la primera semana, ocasionando un decremento del 66% ($371.3 \text{ spz} \times 10^6 / \text{mL}$) ($P < 0.05$) (Fig.3). La concentración espermática durante la FPOI, nunca mostró una recuperación total y se mantuvo baja durante las 12 semanas siguientes (246 a $483 \times 10^6 \text{ spz /mL}$).

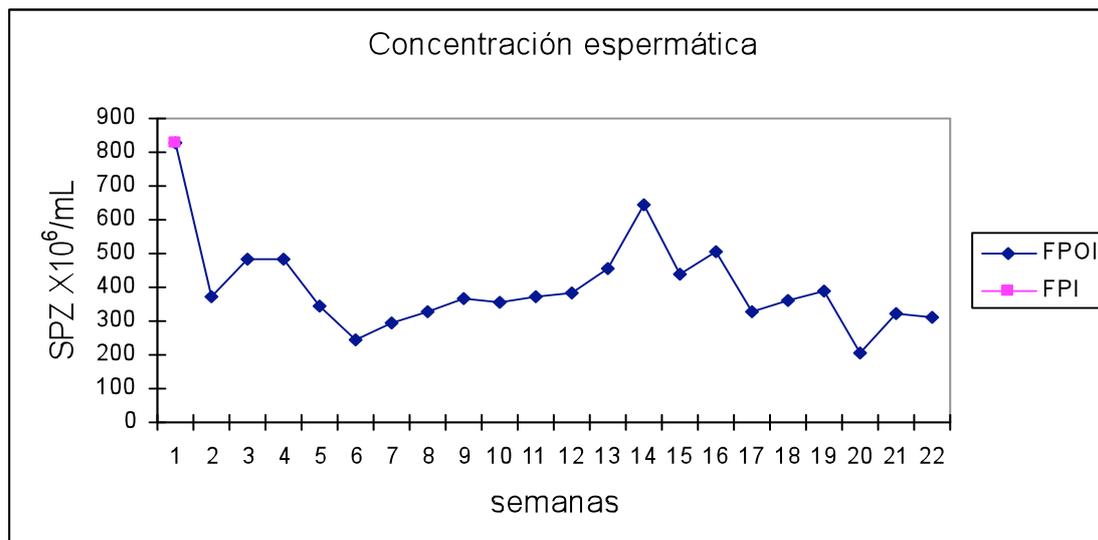


Fig.3. Concentración espermática de eyaculados de verracos, inoculados con virus de la enfermedad de ojo azul en la Fase Preinoculación (FPI) y Posinoculación (FPOI).

Ramírez (1998), por su parte observó alrededor del día 30 pos-infección, que los eyaculados de sementales infectados carecían de espermatozoides y lo relacionó con el incremento del tamaño de los testículos, con las lesiones en las células germinales, así como con la aparición de granulomas en la cabeza del epidídimo.

Estos granulomas ocasionan azoospermia obstructiva de los conductos epididimarios e impiden el libre tránsito de los espermatozoides, por lo que se ve reflejado en el valor de la concentración espermática contabilizada en el eyaculado. De tal manera que la disminución en la concentración espermática de los eyaculados se pueden asociar a la presencia de nódulos en la cabeza del epidídimo, encontrados a partir del día 15 posinfección y a la atrofia testicular que se presenta a partir del día 30 posinfección, es decir hay un daño degenerativo encontrado a nivel testicular (Cultero *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Estadística descriptiva de las determinaciones en semen de verracos en dos fases de producción: preinoculación con el virus de la enfermedad de ojo azul.

FASE	FPOI																		
	FPI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Semana																			
n	126	4	8	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	7	7	4	4	
Volumen mL	158 _{bc}	175.8 _c	150.1 _{bc}	107.3 _a	140.7 _{abc}	151.9 _{bd}	149.4 _{bc}	153 _{bc}	151.6 _{bc}	160 _{bc}	147.7 _{bc}	146.9 _{bc}	133.8 _{ab}	144 _{abc}	173.7 _c	154.8 _{bc}	160.6 _{bc}	149.8 _{bc}	
DE	45.5	35	40.5	44.7	39.3	47.1	43.4	77.5	51.8	36.1	42.2	47.1	48.1	55.4	56.3	56.5	57.3	90.0	
Concentración X 10 ⁶ spz/mL	829 _f	371.3 _{bcde}	482.9 _{de}	483.4 _{de}	344.3 _{abcde}	246.3 _{bcde}	293.3 _{abc}	327.2 _{abcde}	366.6 _{bcde}	357 _{bcde}	373.2 _{bcde}	380.9 _{bcde}	457.6 _{cde}	643 _e	440.8 _{bcde}	504.4 _{de}	325.2 _{bcde}	360.2 _{bcde}	
DE	241	186.8	203.8	171.9	210.8	165.6	164.3	182.2	172.3	159	185	248.5	247.4	247	281.9	281.9	129.6	122	
Motilidad progresiva %	85 _{ab}	86.1 _{bcd}	87.6 _{bcd}	88.4 _{cd}	83.3 _{abc}	83 _{abc}	85 _{abcd}	85 _{abcd}	85.5 _{abcd}	88.7 _d	80.1 _a	86 _{abcd}	85.2 _{abcd}	87.9 _{bcd}	86.1 _{bcd}	87.5 _{bcd}	86.4 _{bcd}	88.9 _d	
DE	3.8	7.5	4.1	5	5.7	5.5	7.9	9.8	5.5	10	6.6	3.7	4.9	5.1	3.9	5.6	4.7	4.7	
Vivos %	80 _{bc}	83 _{bcde}	71.2 _a	77.3 _{ab}	78.8 _{ab}	76 _{ab}	82.5 _{bcde}	83.1 _{bcde}	83.2 _{bcde}	80 _{bc}	81.4 _{bcd}	87.7 _{cdef}	87.8 _{cdef}	85 _{bcdef}	92.8 _f	83.7 _{bcdef}	83.8 _{bcdef}	89.5 _{de}	
DE	2.11	7.8	8.7	6.3	7.6	11	7.6	4.1	6.9	9.5	12.5	5.8	4.3	16.7	3.1	6.8	2.7	1.6	
Leucocitos X 10 ³ /mL	0 _a	7 _a	47.4 _b	69.7 _c	75.3 _c	88.3 _c	76.5 _c	103.2 _c	78.6 _c	60.5 _c	90.8 _c	41.2 _{bc}	31.6 _c	53 _{bc}	24.6 _c	26.1 _c	41.8 _c	23.2 _{bc}	
DE	0	0	13.3	50.7	52.5	101.	82.7	116.5	56.5	58.5	69.6	38.1	35	45.9	19.5	17.3	30.9	30	

a,b,c,d,e,f, medias mínimo cuadráticas, con la misma literal no mostraron diferencias significativas (P<0.05)

n = Número de eyaculados

DE = Desviación Estandar

FPI = Fase preinoculación

FPOI = Fase posinoculación

Con respecto a las anomalías, se observó que la presencia de éstas en la FPOI, fue mayor que en la FPI ($P < 0.05$) (Cuadro 2), lo cual indica alteraciones provocadas por el virus de la EOA. El porcentaje permitido de anomalías espermáticas en un eyaculado para su utilización en la inseminación artificial es de 15 a 20% (Huges *et al.*, 1980; Martín-Rillo, 1993; Conejo, 1991; Fragoso, 1993; Martín-Rillo *et al.*, 1996; Hafez, 1996; Ladds, 1996).

Cuadro 2. Formas anormales presentadas en eyaculados de verracos infectados con el virus de la enfermedad de ojo azul¹.

ANORMALIDAD	FASE	
	PREINFECCION (FPI) %	POSINFECCION (FPOI) %
Gota distal (GD)	3.0	3.8
Gota proximal (GP)	5.4	19.0
Cola látigo (CL)	10.0	19.0
Total	18.4	41.8

¹ Valores promedio por fase.

Los resultados del presente trabajo concuerdan con los de Ramírez (1998), Espinoza (2001), Solís (2002), quienes reportan que en los espermatozoides anormalmente conformados se observó un incremento considerable, en todos los animales.

La proporción de espermatozoides anormales es un buen indicador de la aptitud del verraco para reproducirse (König *et al.*, 1995). Las anomalías morfológicas primarias, como las que se dan en cabeza y cola, son directamente

causadas por afecciones en la espermatogénesis y en las alteraciones patológicas de los testículos, en especial de los tubos seminíferos (Hafez, 1996; Moberg, 1985; De Mirjyn, 1997).

Las anormalidades secundarias se deben a alteraciones en etapas del desarrollo, se presentan durante el proceso de la maduración a nivel de epidídimo (Ladds, 1996; De Mirjyn, 1997; Pinart, 1998). Además con frecuencia las anormalidades secundarias obedecen a eyaculaciones defectuosas, desequilibrios térmicos, enfermedades genitales (Herrick *et al.*, 1995).

La disfunción epididimaria se ha relacionado con la alteración de la calidad seminal, que incluye el aumento de defectos morfológicos y acinesia. Los defectos morfológicos de esperma se han relacionado también con la degeneración del epitelio epididimario. Los toros, carneros y perros con epididimitis intersticial microscópica con frecuencia presentan una disfunción en la calidad seminal, incluyendo un porcentaje alto de espermatozoides con defectos morfológicos (Pineda, 1991).

Así, el incremento en las anormalidades se explica por las lesiones degenerativas en epidídimo: vacuolización citoplásmica, pérdida parcial de estereocilios y pequeñas áreas de necrosis licuefactiva. En los espermatozoides de los verracos se identificaron las siguientes anormalidades: Gota Citoplasmática Proximal (GP), Gota Citoplasmática Distal (GD) y Cola Látigo (CL) (Cuadro 2). Puede considerarse que un eyaculado con un porcentaje alto de defectos en cola tiene una fertilidad reducida o menor tiempo de preservación. Las gotas citoplasmáticas 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 GP es indicativa de un espermatozoide incapaz de fertilizar (De Mirjyn 1997).

El efecto de la fiebre que se manifiesta después de la inoculación del virus, puede producir una alteración en la espermiogénesis, ya que se aumenta la temperatura local a nivel escrotal (Moberg, 1985), y esto provoca incapacidad del epidídimo de madurar adecuadamente a las células, debido a los cambios degenerativos encontrados a nivel de esta estructura. Sin embargo, lo anterior no concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que no existió pirexia en ninguno de los verracos inoculados.

En el Cuadro 1, se observa la evaluación de volumen realizada a los eyaculados sin fraccionar. No se observaron diferencias entre la producción de semen de los verracos durante la FPI y FPOI ($P > 0.05$) (Cuadro 1). A pesar de lo anterior, los valores observados permiten señalar que el virus de la enfermedad de ojo azul afectó a partir de la segunda semana el volumen de eyaculado, y esta pérdida se agudizó en la tercer semana, ya que disminuyó 32.1% de la producción (50.7mL) ($P < 0.05$). Sin embargo, a partir de la cuarta semana el volumen de eyaculado inició un aumento significativo, logrando llegar a una producción similar a la de la primer semana ($P < 0.05$) (Fig. 4).

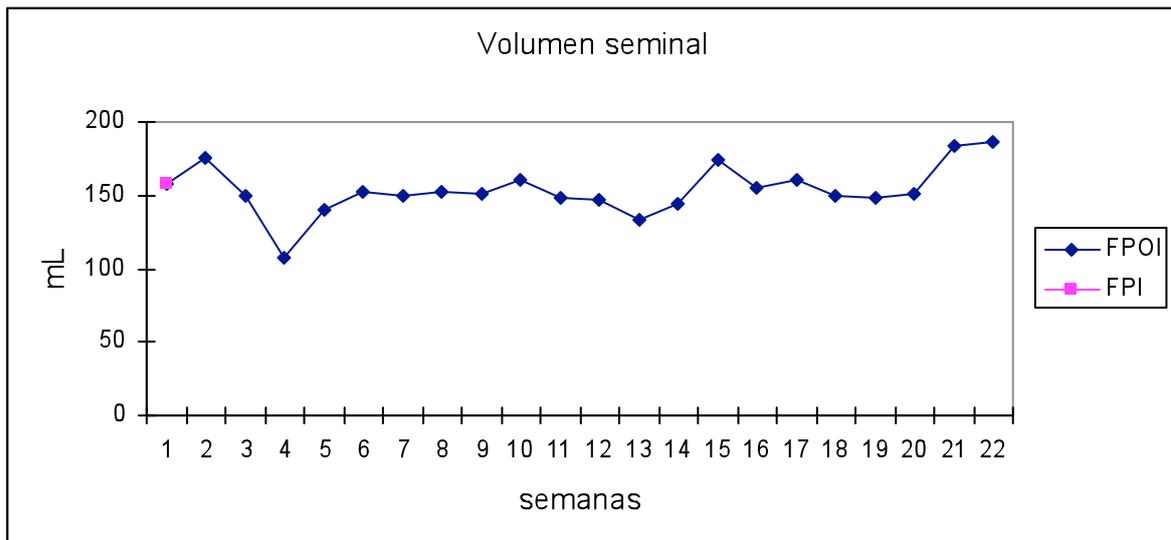


Fig. 4. Volumen de eyaculados de verracos inoculados con el virus de la enfermedad de ojo azul en la Fase preinoculación (FPI) y posinoculación (FPOI)

Estos resultados concuerdan con los observados por Stephano (1992), Ramírez (1998), Solís (2001a), y Espinoza (2001), quienes tampoco observaron un efecto del virus de la EOA, *Rubulavirus porcino*, sobre el volumen de eyaculado, debido a que las glándulas accesorias no pierden su actividad secretora después de la infección con dicho virus.

Por su parte, Ramírez (1998), señala que el virus causa efectos diversos en los verracos, y que existe un factor individual que ocasiona amplias diferencias entre los animales. Esto se puede observar al analizar las diferencias entre animales y dentro de animal mostradas en los eyaculados de los nueve verracos trabajados (Cuadro1). Lo que mostró que cada animal fue capaz de establecer una respuesta diferente en contra del agente infeccioso.

Swierstra (1970), Xu *et al.* (1998) y Trujillo *et al.* (2002), señalan que en verracos sanos, el volumen del eyaculado varía entre $181.3\text{mL} \pm [24.8\%]$ y $384.9\text{mL} \pm [24.8\%]$. Al compararlos con los valores obtenidos en la FPI, éstos se consideran bajos. Es importante tomar en cuenta que los verracos de este experimento eran jóvenes (9 meses de edad), por lo que el volumen que presentaron se muestra por debajo de lo reportado por los autores antes señalados, aunque fueron mejorando el volumen al aumentar la edad (Fig. 4).

Por su parte la motilidad progresiva de las células espermáticas durante la FPI se observó dentro del patrón normal de comportamiento que señalan Arias *et al.* (2004), Fraser *et al.* (2001), Hirai *et al.* (2001) y Holt *et al.* (1997). Los eyaculados utilizados para la elaboración de dosis seminales deben tener como mínimo 80% de espermatozoides con movimiento progresivo (Bonet *et al.*, 1998). Sin embargo existe un intervalo establecido que va de 70 a 90%, para la toma de decisión del uso del eyaculado (Huges *et al.*, 1980; Conejo, 1991; Fragoso, 1993; Martín-Rillo, 1993; Martín-Rillo *et al.*, 1996). Asimismo, se observó que durante la FPOI, la motilidad se mantuvo con valores por encima del 80 % (Cuadro 1, Fig. 5), contrario a lo que Ramírez (1998) señala, donde el virus de la EOA afectó negativamente el porcentaje de motilidad progresiva.

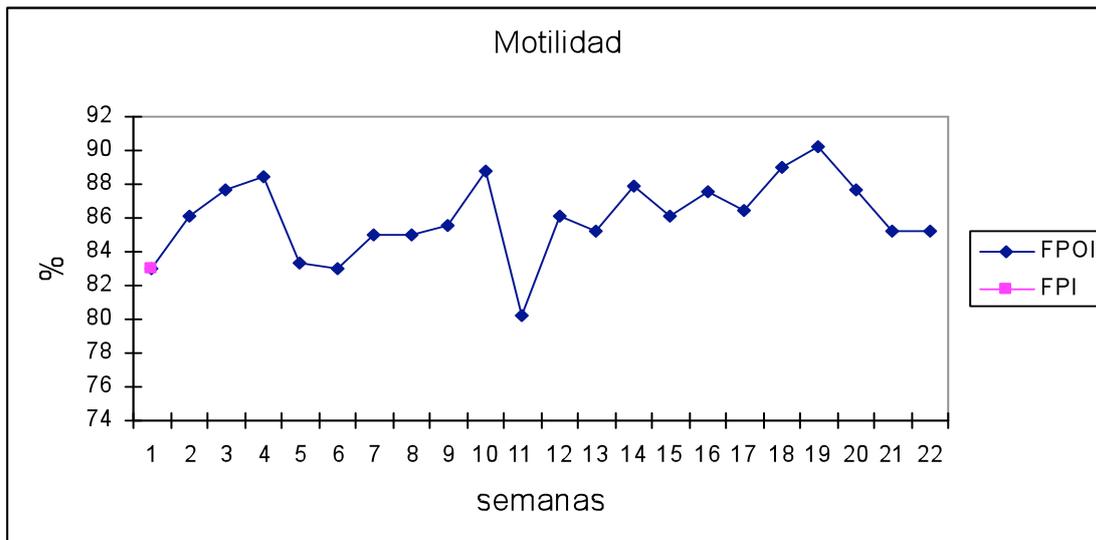


Fig. 5. Motilidad progresiva en eyaculados de verracos inoculados con virus de la enfermedad de ojo azul, en la Fase preinoculación (FPI) y posinoculación (FPOI), trabajados semanalmente

El porcentaje promedio de espermatozoides vivos (77.6%) (Cuadro 1), mostró valores normales y comparables a los reportado por Martín-Rillo (1982) (76.6%). A pesar de que en la segunda semana disminuyó un 8.5 %, y en las tres siguientes permaneció de forma similar (Fig. 6); Esto no evidencia pérdidas de células vivas por debajo de lo recomendado, ya que todos los valores de esta característica estuvieron por encima del valor de 80% de células vivas (Cuadro 1, Fig. 6).

Lo anterior no concuerda con los hallazgos de Ramírez (1998), quien observó una disminución considerable de espermatozoides vivos en todos los animales. Es probable que la inadecuada maduración de los espermatozoides debida a los cambios degenerativos que ocasiona el virus de la EOA en el epidídimo, degeneración vacuolar, infiltración de células mononucleares,

fibroplasia intersticial, degeneración de los túbulos seminíferos, pérdida parcial de los estereocilios, infiltración linfocítica, formación de células gigantes, fibrosis y necrosis licuefactiva (Ramírez *et al.*,1997, Ramírez, 1998), provoque que el epidídimo pierda la capacidad de proveer los cambios fisiológicos y fisicoquímicos que los espermatozoides necesitan para llegar a la maduración y que están relacionados con su sobrevivencia y su capacidad de fertilización (Ramírez, 1998).

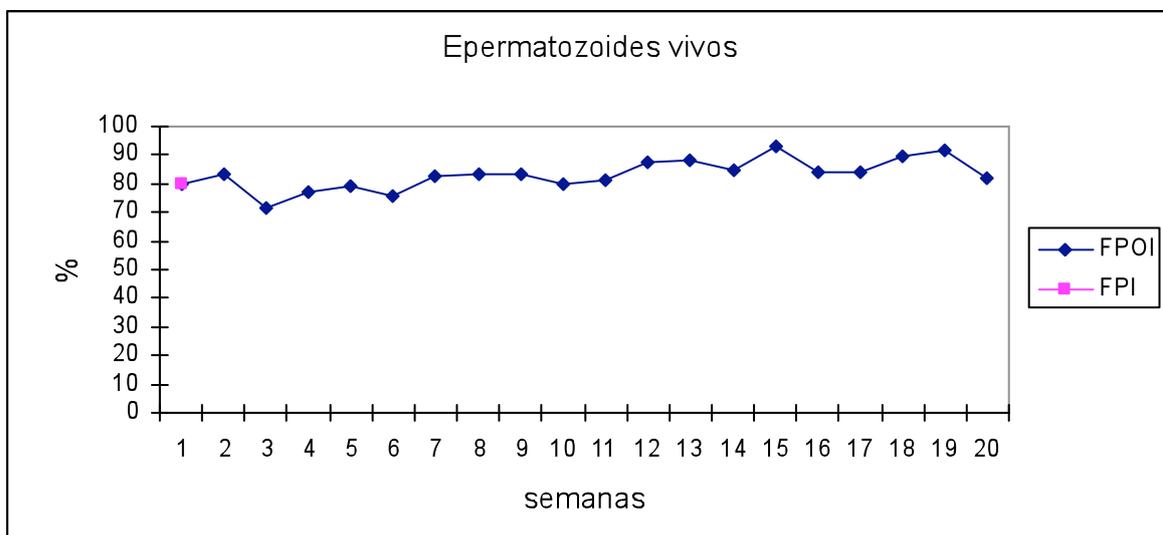


Fig. 6. Porcentaje de espermatozoides vivos en eyaculados de verracos inoculados con virus de la enfermedad de ojo azul, en la Fase preinoculación (FPI) y posinoculación (FPOI), trabajados semanalmente

Por otra parte, cuando se efectuó el análisis del semen de las muestras FPI, no se encontraron leucocitos, sin embargo una vez hecha la inoculación en la segunda semana de la FPOI, si se observan leucocitos, los que fueron incrementándose, debido a que al estar en contacto con el virus con el animal desencadena la respuesta inmune, y esto mostró una diferencia significativa

($P < 0.05$), con respecto a la FPI (Cuadro 1). Esta leucospermia tiene una tendencia a incrementarse y en la semana séptima se observó el valor promedio más alto (Fig. 5). Sin embargo hubo variación entre los animales, mostrando que cada individuo tuvo una capacidad de respuesta inmune diferente.

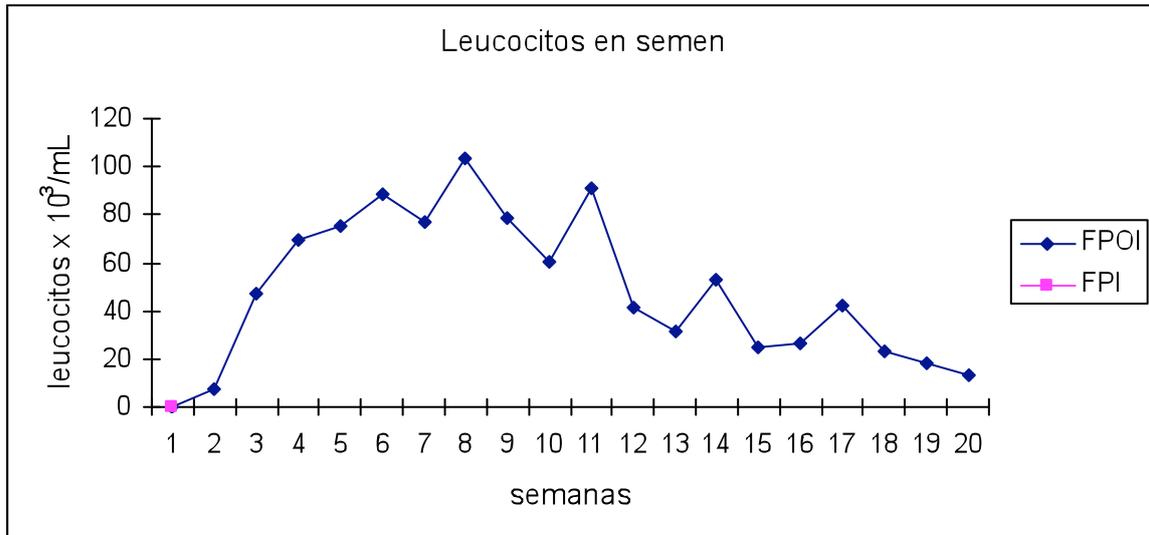


Fig. 5. Presencia de leucocitos en los eyaculados de verracos inoculados con virus de la enfermedad de ojo azul, en fase preinoculación (FPI) y posinoculación (FPOI), trabajados semanalmente.

Hasta la fecha, las descripciones relacionadas con la respuesta inmune celular al virus de la EOA, refieren observaciones clínicas que sugieren que la enfermedad es autolimitante, ya que después de algún tiempo desaparecen los signos clínicos y es posible detectar anticuerpos contra el virus en los animales que se conservaron en la granja (Stephano *et al.*, 1990). Sin embargo, no se han realizado estudios que permitan identificar la participación de la respuesta celular como determinante de la autolimitación de la infección.

Hirao *et al.* (1983) encontraron en un estudio de laboratorio que los leucocitos fagocitan a los espermatozoides y afectan la motilidad espermática.

Wolf *et al.* (1990) determinaron que la leucospermia está asociada con la pobre calidad seminal en humanos, hay disminución en la motilidad, tipo de motilidad, concentración espermática y volumen seminal. Posteriormente Gonzáles *et al.* (1992) encuentran resultados similares, además de la disminución en el porcentaje de espermatozoides viables, cuando además en los hombres hay hipofunción de las vesículas seminales.

En el trabajo de Ramírez (1998) identificó linfocitos en sangre, se realizó el análisis fenotípico donde se observó que los valores de la población CD4⁺CD8⁺ se incrementaron durante la primer semana de infección. Estos linfocitos T están asociados a actividad citotóxica y se observan frecuentemente en porcentajes elevados en infecciones virales.

Schlegel (1995) identificó las células redondas en semen, las cuales incluyen a los leucocitos, y el incremento de éstos está relacionado con las enfermedades genitales. Por su parte Dousset *et al.* (1997) estudiaron las citoquinas presentes en el semen humano, que reflejan los diferentes efectos sobre los espermatozoides, encontrado que la motilidad y número de espermatozoides está afectado negativamente, y determinan además un incremento en la producción de especies reactivas al oxígeno, lo cual lo relacionan con la habilidad de ovopenetración.

En los humanos las infecciones virales de la zona genital femenina, se reporta como un factor importante para la infertilidad masculina. Los procesos

infecciosos pueden conducir al deterioro de la espermatogénesis, daños en la función del espermatozoide y/o obstrucción de la zona seminal, además Keck *et al.* (1998) reportan que el efecto de la leucospermia sobre la fertilidad masculina es controversial, ya que algunos estudios han demostrado que individuos con concentraciones seminales de células blancas mayores a 10^6 /mL han reducido la calidad seminal y otros no.

Moilanen *et al.* (1998) reportan que los granulocitos tienen efectos perjudiciales sobre los espermatozoides con la producción de radicales libres y de citoquinas. Así también Ochsenforf (1999) reporta que en una infección, los leucocitos generan radicales libres y generan daño en las funciones del espermatozoide, como la motilidad y la capacidad de fertilización. Los radicales libres producidos durante las infecciones en epidídimo son especialmente dañinos para los espermatozoides.

Matthijs *et al.* (2000), observaron en un estudio *in vitro* que los espermatozoides son fagocitados por los leucocitos polimorfonucleares. Posteriormente Woelders *et al.* (2001), realizaron estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el mismo tema, encontrando resultados similares.

Baumber *et al.* (2002) en su estudio demostraron que los leucocitos en semen de equino afecta la motilidad espermática. Trabusli *et al.* (2002) encontraron diferentes subtipos de leucocitos en el semen de hombres enfermos, en su calidad seminal está disminuida su motilidad y el potencial de fertilización. Por su parte Matthijs *et al.* (2003) realizaron un estudio utilizando eyaculados de

verracos después de inseminación artificial en cerdas y observaron fagocitosis de espermatozoides por los leucocitos.

Waheed *et al.* (2004) estudiaron la relación entre los leucocitos y los parámetros de características seminales de sementales y encontraron que las altas concentraciones de leucocitos se asocian con menor motilidad espermática, menor número de espermias con morfología normal y viabilidad reducidas.

Leutscher *et al.* (2005), demostraron en su estudio que se incrementan los niveles de leucocitos y citoquinas en semen de individuos con infección helmíntica. Lackner *et al.* (2006), realizaron estudios de calidad seminal en hombres con infección clínica que presentaron leucospermia, y no hubo diferencias en la concentración espermática. En contraste Oliva *et al.* (2006), encontraron que cuando hay leucospermia se daña la motilidad, disminuye la concentración de espermias e incrementan las anormalidades morfológicas, lo que concuerda con este estudio como con los resultados de Solís *et al.* (2007), excepto que en ese trabajo que involucra al *Rubulavirus porcino*, la viabilidad espermática disminuye.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, permiten inferir que el efecto de la inoculación experimental de virus de “la enfermedad de ojo azul, sobre la calidad seminal es grave, debido a la drástica disminución en la concentración espermática y la presencia de formas anómalas en la morfología no así en el porcentaje de células vivas, es decir en la viabilidad, motilidad ni en el volumen de los eyaculados sin fraccionar. Existe un factor de resistencia individual a la infección que evita en los verracos un comportamiento homogéneo ante la infección, por lo que se necesita analizar cada eyaculado y a cada individuo permanentemente.

Asimismo, la presencia de leucocitos es un mecanismo indicativo de infección y de baja en la calidad seminal, radicando su relevancia en que su presencia se asocia a varias alteraciones seminales.

Estos resultados son los primeros reportes en evaluaciones seminales de verracos, por lo que será de fundamental importancia su determinación, y continuar con la tipificación de leucocitos en semen y la cuantificación de las citoquinas.

La información obtenida de la evaluación seminal, permite de forma práctica la recomendación del desecho de los sementales. En la enfermedad del “Ojo Azul”, estos datos se suman a los que han sido descritos en su mayoría en el Bajío, pero su relevancia radica en el hecho de las diferentes formas de respuesta inmune entre animales, daño reproductivo y los cuadros asintomáticos de la mayoría de ellos, implica una disminución del porcentaje de la fertilidad y por tanto de niveles de producción y ganancias económicas.

9. LITERATURA CITADA.

- Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility Sterility*. 79:829-843.
- Arias, T., Rueda, M., Mendoza, D., Bracho, F.D., Dieguez, F.J., Marates, G. 2004. Apuntes sobre la aptitud ante el maniquí y calidad espermática de cochinos L35 x CC21, L35 x Duroc y CC21. *Revista Computarizada de Producción Porcina*. II(2): 76.
- Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., Ball, B.A. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 57(3):1025-1033.
- Bonet, S., Briz, M., Fradera, A. 1993. Estudio comparativo entre la morfología espermática del eyaculado de verracos sometidos a extracciones de semen cada dos días y la morfología del espermatozoides procedente de las tres regiones epididimarias. *Anaporc*. 129:5-17.
- Bonet S., Pinart, E., Briz, M., Sancho, S., Escuder M. 1998. Aportación al conocimiento de la criptorquidia espontánea abdominal y unilateral en porcino: análisis microscópico del eyaculado. *Anaporc*. 178:91-112.
- Burlenson, F.G., Chambers, T.M., Wiedbrauk, D.L. 1992. *Virology: a laboratory manual*. Academic Press, Inc. pp 58-61.
- Carreón, N.R. 1986. Más sobre la enfermedad del ojo azul. *Síntesis Porcina*. 5:(12):269-271.

- Carroll, J.A., Daniel, J.A., Keisler, D.H., Matteri, R.L. 1999. Non-surgical catheterization of the jugular vein in young pigs. *Laboratory Animals*. 33:129 – 134.
- Colenbrander, E. y Kemp, B. 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 40:105-115.
- Conejo, N.J.J. 1991. Manual de Inseminación Artificial del Ganado Porcino, con semen diluido. Hidalgo, México: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp 125.
- Cultero, R.S., Ramírez, M.H., Carreón, N.R., Campuzano, G.J. 1995. Inoculación experimental del paramixovirus del ojo azul en ratas de laboratorio (cepa Wistar) vía intramuscular. *Vet Mex.* 26:231-236.
- De Mirjyn, A. 1997. Inseminación Artificial en granjas porcinas. I Curso internacional de reproducción porcina. México (DF): Academia de investigación en biología de la reproducción A.C. pp35-45.
- Dousset, B., Hussenet, F., Daudin, M., Bujan, L., Foliguet, B., Nabet, P. 1997. Seminal cytokine concentrations (IL-1b, IL-2, IL-6, sR IL-2, sR IL-6), semen parameters and blood hormonal status in male infertility. *Human Reproduction*. 12 (7):1476–1479.
- Espinosa, H.S. 2001. Evaluación de semen de verracos inoculados con el virus de la enfermedad de ojo azul. Tesis .UNAM
- Espinosa, H.S., Rosales, M.L., Solís, H.M., Ramírez, M.H., Hernández, J.P., 2001. Evaluación ultra estructural de espermatozoides de verracos inoculados experimentalmente con el *Rubulavirus porcino* . Asociación Mexicana de

Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos, XXXVI Congreso Nal. Qro., Julio 25-29.

Fragoso, V.M.A. 1993. Manual de Inseminación Artificial en Cerdos (Tesis Licenciatura) D.F. (México): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.

Fraser, L., Gorszczaruk, K., Strzezek, J. 2001. Relationship Between Motility and Membrane Integrity of Boar Spermatozoa in Media Varying in Osmolality. *Reprod Dom Anim.* 36:325-329.

Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction Domestic Animals.* 39:303-308.

Garcia-Gil, N., Pinart, E., Sancho, S.E., Badia, J., Bassols, E., Kádar, M., Briz, S. Bonet. 2002. The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. *Animal Reproduction Science.* 73:211 – 225.

Gonzales, G.F., Kortenbani, G., Mazzolli, A.B. 1992. Leukocytospermia and function of the seminal vesicles on seminal quality. *Fertility and Sterility.* 57(5):1058-1065.

Gonzalez-Urdiales, R., Tejerina, F., Domínguez, J.C., Alegre, B., Ferreras, A., Pelaez, J., Bernal, S., Cárdenas, S. 2006. Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. Manual de Técnicas de reproducción asistida en porcino. *Bioteología de la Reproducción Porcina.* Edit Univ. De Girona y Red Temática Nacional de Reproducción Porcina. España. pp19-38.

- Hafez, E.S.E. 1996. Reproducción e inseminación artificial en animales. 6ª ed. Interamericana McGraw-Hill. pp154.
- Henry, J. B. 2001. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. 10ª edición. Editorial Masson Salvat. pp. 582-603.
- Hernández, J., Reyes, L.J., Zenteno, R., Ramírez, H., Hernández, J.P., Zenteno, E. 1998. Immunity to porcine rubulavirus (La Piedad Michoacán virus) infection in pregnant gilts. *J.Comp. Pathology*. 130:1-6.
- Herrick, J.B., Self, H.L.1995. Evaluación de la fertilidad del toro y del verraco. Ed. Acriba. pp. 66-76.
- Hirai, M., Boersma, A., Hoeflich, A., Wolf, E., Ju" Rgnen Fo", Ll., Aumu", Ller., Braun, J. 2001.Objectively Measured Sperm Motility and Sperm Head Morphometry in Boars (*Sus scrofa*): Relation to Fertility and Seminal Plasma Growth Factors. *J Androl*. 22:104–110.
- Hirao, K., Yamagishi, M., Abe, K. 1983. Phagocytosis of spermatozoa by bovine leucocytes under laboratory condition. *Japanese Journal of Zootechnical Science*. 53(3):200-205.
- Holt, C., Holt, W., Moore, H.D., Huoh, C.B., Curnock, R.M. 1997. Objectively Measured Boar Sperm Motility Parameters Correlate With the Outcomes of On-Farm Inseminations: Results of Two Fertility Trials. *J Andrology*. 18(3):312-323.
- Hughes, P., Varley, M. 1980. Reproduction in the pig. London: Butterworth & Co (Publishers). pp 125.

- Jasco, E. 1992. Seminal characteristics of stallion and fertility. En current Therapy in equine Medicina. 3: 671-677.
- Keck, C., Gerber-Schäfer, C., Clad, A., Wilhem, C., Breckwoldt, M. 1998. Infections: impact on male fertility and treatment options. Human reproduction Update. 4(6):891 – 903.
- Kraft, H., Scillinger, D. 1998. Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos. Acriba. pp 137-138.
- Kolenbrander, B., Feitsma, H., Grooten, H.J. 1993. Optimizing semen production for artificial insemination in swine. Journal Reproduction Fertility. 48: 207-215.
- König, H., Séller, Henze, A., Conrard, F. 1979 Inseminación de la cerda. Ed. Acriba. pp 71.
- Lackner, J.E., Herwig, R., Schmidbauer, J., Schatzl, G., Kratzik, C., Marberg, M. 2006. Correlation of leukocytospermia with clinical infection and the positive effect of antiinflammatory treatment on semen quality. Fertility and Sterility. 86(3):601-605.
- Ladds, P.W. 1996. The male reproductive tract. Sims LD, Glastonbury JRW, editors. Pathology of the pig. A diagnostic guide. Agriculture Victoria. pp 407-422.
- Leutscher, P.D.C., Pedersen, M., Raharisolo, C., Jensen, J.S., Hoffmann, S., Lise, I., Ostrowski, S.R., Reimert, C.M., Mauciere, P., Ullum, H. 2005. Increased prevalence of leucocytes and elevated cytokine levels in semen from

- Schistosoma haematobium-infected individuals. Journal of Infectious Diseases. 191(10):1639-1647.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. J Anim Sci. 76(4):1216-1231.
- Lynch, M.J, Rápale, S.S., Mellor, L.D. Spare, P.D., Inwood, M.J. 1997. Métodos de Laboratorio. Ed Interamericana. pp. 722.
- Magistrini, M., Guitton, E., Levern, Y., Nicolle, J.C., Vidament, M., Kerboeuf, D., Palmer, E. 1997. New staining methods for sperm evaluation estimated by microscopy and flow cytometry. Theriogenology. 48:1229-1235.
- Malmgren, L., Rodríguez-Martínez, H., Einarsson, S. 1996. Attainment of spermatogenesis in Swedish cross-breed boars. J. Vet. Med. A. 43:169-179.
- Martín-Rillo, S. 1982. Reproducción e inseminación artificial en animales. Editorial Aedos. Barcelona España. pp 77-78.
- Martin-Rillo, S. 1993. Manual de Inseminación Artificial. Kubus, S.A. Madrid España: MAR-CAR. pp 91-113.
- Martín-Rillo, S., Martínez, E., García Artiga, C., De Alba, C. 1996. Boar semen evaluation in practice. *Reprod. Dom. Anim.* 31:519-526.
- Matthijs, A., Harkema, W., Engel, B., Woelders, H. 2000. In vitro phagocytosis of boar spermatozoa by neutrophils from peripheral blood of sows. Journal of Reproduction and Fertility. 120:265-273.
- Matthijs, A., Engel, B., Woelders, H. 2003. Neutrophil recruitment and phagocytosis of boar spermatozoa after artificial insemination of sows, and

the effects of inseminate volume, sperm dose and specific additives in the extender. *Reproduction*. 125:357-367.

Moberg, G.P. 1985. Influence of stress on reproduction: Measure of well-being. Moberg GP, editor. *Animal Stress: American Physiological Society*. pp 245-267.

Moilanen, J. M., Carpén, O., Hovatta, O. 1998. Flow cytometric light scattering, reactive oxygen species production and leukocyte contamination of semen preparation in prediction of fertilization rate *in vitro*. *Human Reproduction*. 13(9):2568-2574.

Norma Oficial Mexicana NOM-027-ZOO-1995. 1995. Proceso zoonosanitario del semen de animales domésticos. México. Diario Oficial de la Federación.

Oliva, A., Multigner, L. 2006. Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertility and Sterility*. 85:240-3.

Olivares Orozco, J.L. 2001. Técnicas helmintológicas veterinarias, Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco, División de Ciencias Biológicas y de la salud., Manual 8, México. pp28.

Ochsendorf, F.R. 1999. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 5(5):399-420.

Pérez, F., Stephano, A., Gay, M. 1988. Estudio histológico en lechones inoculados experimentalmente con el paramixovirus del Ojo Azul. XXIII

Reunión de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Cerdos. León, Gto. México. pp81-83.

Pinart, E., Camps, R., Briz, M.D., Bonet, S., Egozcue, J. 1998. Unilateral spontaneous abdominal cryptorchidism: structural and ultrastructural study of sperm morphology. *Anim Reprod Sci.* 49: 247-268.

Pineda, H.L. 1991. Reproducción del macho. In: McDonald LE. *Endocrinología veterinaria y reproducción*. Cuarta Edición. Editorial Interamericana McGraw-Hill. pp253-293.

Ramírez, M.H. 1998. Fisiopatología del *paramixovirus* del ojo azul a nivel testicular. Tesis de doctorado. México DF. UNAM.

Ramírez, M.H., Hernández, J.P., Reyes, L.J., Zenteno, E., Moreno, L.J., Kennedy, S., 1997. Lesions in the productive tract of boars experimentally infected with *porcine rubulavirus*. *J. Comp. Pathology.* 117:237-252.

Ramírez, M.H., Martínez, G.R., Trinidad, V.A., Monroy, B.J. 1999. Inoculación del virus de la enfermedad del ojo azul en verracos de la raza pelón mexicano. *Veterinaria México.* 30:1.

Reyes, J.L., García, M.O., Santos, L.G., Vallejo, V., Ramírez, M.H., Hernández, J. 2004. Detection of viremia in the porcine rubulavirus experimental infection. *Arch. Med. Vet.,* 36(1):39-47.

Rooke, J.A., Shao, C-C., Speake, B.K. 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction.* 121:315 –322.

- Rozeboom, K.J. 2003. Quality assurance of semen. Allen D. Leman Swine Conference. pp171-179.
- Santos, L.G., Hernández, J., Borraz, A.M., Ramírez, M.H., Vallejo, V., Reyes, L.J. 2004. Proteins of *porcine rubulavirus*: structure, function and pathological implications. Arch. Med. Vet. 36(2):119-136.
- Schlegel, B. 1995. Identification, production and identification of round cells in dog ejaculates. Tierärztliche Hochschule Hannover., 134pp.
- Solís, M., Espinosa, H.S., Mercado, G.C., Ramírez, H., Zenteno, E., Hernández, J. 2001a. Evaluación de semen de cerdos infectados experimentalmente con el *Rubulavirus porcino*. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos, XXXVI Congreso Nal. Qro., Julio 25 – 29.
- Solís, M., Espinosa, H.S., Mercado, G.C., Ramírez, H., Zenteno, E., Hernández, J., 2001b. Semen vía de eliminación del *Rubulavirus porcino*. Aislamiento del antígeno. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en cerdos, XXXVI Congreso Nal. Qro., Julio 25-29.
- Solís, M., Espinosa, H.S., Mercado, G.C., Hernández, L.J., Ramírez, M.H., 2002a. Isolation of *porcine Rubulavirus* in semen alter experimentally induced infection in boars. Memorias IPVS.
- Solís, M., Espinosa, H.S., Mercado, G.C., Hernández, L.J., Ramírez, M.H., 2002b. Viability of semen simples diluted experimentally induced infection in boars with *porcine Rubulavirus*. Memorias IPVS.

- Solís, M., Ramirez-Mendoza, H., Mercado, C., Espinoza, S., Vallejo, V., Reyes-Leyva, J., Hernández, J. 2007. Semen alterations in *porcine Rubulavirus*-infected boars are related to viral excretion and have implications for artificial insemination. Res. Vet. Sci. doi 10.1016/j.rvsc.2007.01.018.
- Stephano, H.A.1985a. Brotes de encefalitis en cerdos en engorda. Síntesis Porcina., 4(2):9-12.
- Stephano, H.A.1985b. El Síndrome del ojo azul en cerdos. Síntesis Porcina. 4(5):42-49.
- Stephano, A., Hernández, D., Pérez, C. González, C.T., Ramírez, M.H., Cervantes, A., 1990. Boar infertility and testicular atrophy associated with blue eye *paramyxovirus* infection. Viral Diseases. 1:211.
- Stephano, H.A., Gay, G.M.1985. El síndrome del Ojo Azul en cerdos. Avances en las enfermedades del cerdo. AMVEC. pp299-311.
- Stephano, H.A., 1986a. Diagnóstico diferencial entre Aujeszky y síndrome de ojo azul. Síntesis Porcina. 5(12):260-263.
- Stephano, H.A. 1986b. Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea. Síntesis Porcina. 5(12):251-259.
- Stephano, H.A. 1986c. Historia del síndrome del ojo azul en cerdos, asociado a un *paramyxovirus* (Encefalitis, falla reproductiva y opacidad de la córnea). Síntesis Porcina. 5(12):244-249.
- Stephano, H.A., 1986d. Síndrome de ojo azul y la reproductividad de una granja. Síntesis Porcina. 5(12):267-268.

- Stephano, H.A., Gay, G.M. 1986. El síndrome de ojo azul. Una nueva enfermedad en cerdos asociados a un *paramixovirus*. *Veterinaria México*. 17:120-122.
- Stephano, H.A., Gay, M.G., Ramírez, T.C., 1988. Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs, associated with a paramyxovirus infection. *Veterinary Record*. 122:6-10.
- Stephano, H.A., Ramírez T.C.A., Gay, G.M., Maqueda, J.J. 1981. Estudio de un brote de encefalitis y opacidad de la córnea en lechones. *Memorias del XVII Congreso de A. M. V. E. C. Ixtapa, Zihuatanejo, Gro. México*.
- Swierstra E. 1970. The Effect of Low Ambient Temperatures on Sperm Production, Epididymal Sperm Reserves, and Semen Characteristics of Boars. *Biology Reproduction*. 2:23-28.
- Taylor, D.J., 1995. Pig diseases. Edit. Book Production Consultants PLC. Gran Bretaña. pp 52.
- Trabusli, E.J., Shupp-Byrne, D., Sedor, J., Hirsbh Irvin, H. 2002. Leokocyte subtypes in electroejaculates of spinal cord injured men. *Arch Phys Med Rehabil*. 83:31-33.
- Trujillo, O.M., Martínez, G.R., Herradora, L.M. 2002. La piara reproductora. México: Mundi-Prensa. pp 2.
- Waheed, M.M., Khalifa, T.A.A., Abdel-Hafiz, M. 2004. Leucocyte content of stallion ejaculates and its relationship to seminal attributes and fertility. *Veterinary Medical Journal Giza*. 52(3):325-334.

- Woelders, H., Matthijs, A. 2001 Phagocytosis of boar spermatozoa in vitro and in vivo. Cambridge: Society for Reproduction and Fertility. pp113-127.
- Wolff, H., Politich, J.A., Martínez, A., Harmovici, F., Hillui, A., Anderson, D.J. 1990. Leukocytospermia is associated with poor semen quality. *Fertility and Sterility*. 53(3):528-536.
- World Health Organization. 1992. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge.
- Xu X., Pommier S., Hutchings B., Sotto W., Forcroft R., 1998. In vitro maturation and fertilization techniques for assessment of semen quality and fertility. *J. Animal Sci.* 76:3079-3089.

10. ANEXOS

Técnicas de laboratorio

Coproparasitoscópico con solución saturada de glucosa

La muestra de heces se colocó en un recipiente de plástico, se le añadió solución saturada de glucosa, se homogeneizó con ayuda de una varilla de vidrio, se filtró para eliminar los restos de mayor tamaño. Se colocó la muestra en un tubo de ensaye de 13 X 100, se centrifugó a 1500g durante 10 minutos, una vez transcurrido el tiempo, se colocó en tubo en una gradilla; se tomó una gota de la porción superior con una pipeta Pasteur y se colocó en un portaobjetos, se le cubrió con un cubreobjetos; se observó en el microscopio a un aumento de 10x y de 40x (Olivares, 2001).

Evaluación seminal básica:

Evaluación macroscópica:

Volumen. El volumen del eyaculado se cuantificó en mililitros (ml), utilizando para este caso, probetas graduadas de vidrio, limpias y estériles (Fragoso, 1993; Solís, 2002).

Evaluación microscópica:

Motilidad. El movimiento del espermatozoide se evaluó por el método descrito por Fragoso (1993) y Solís (2002). Para ésta se evalúan dos características: a) porcentaje de movimiento masal, se determinó colocando una gota del eyaculado inmediatamente después de la colecta en un portaobjetos atemperado a 37°C y sobre la gota se colocó un cubreobjetos, se observó a través de un microscopio con un aumento de 10x, para determinar el movimiento general del eyaculado y se

hizo la anotación correspondiente en porcentaje este es de 0 a 100 sobre el juicio del evaluador. Al mismo tiempo se observó a 40x el avance progresivo del esperma, según el tipo de movimiento se da clasificación de 0 a 5.

Valor 0: espermatozoides sin movimiento, pueden estar dañados o muertos.

Valor 1: sin movimiento progresivo girando sobre si mismos.

Valor 2: con movimiento anormal o eventualmente progresivo.

Valor 3: con movimiento progresivo lento y sinuoso.

Valor 4: con movimiento progresivo rápido.

Valor 5: con movimientos progresivos muy rápidos.

Concentración. La concentración expresa el número de células espermáticas por unidad de volumen, utilizando lo descrito por Solís (2002); para lo que se utilizó una cámara de Neubauer y una pipeta de Thoma para glóbulos rojos. Con la pipeta se absorbió del eyaculado recién obtenido exactamente hasta la marca 0.5, y acto seguido se absorbió solución de suero fisiológico formolado (SFF: 9 g de cloruro de sodio, 3 ml de formaldehído al 40%, agua destilada csp 1,000 ml) hasta la marca 101 (realizando así una dilución de 1:200); se mezcló uniformemente, después se tiraron las tres primeras gotas del contenido de la pipeta y se depositó una gota de este semen diluido en cada una de las mesetas que contiene la llamada cámara de Neubauer. La lectura se realizó utilizando un microscopio con objetivo 40x para después dar inició al conteo de los espermatozoides localizados en las dos mesetas de la cámara, se cuentan los cuatro cuadros secundarios de

las esquinas y el del centro. Posteriormente se obtuvo el promedio del número de espermatozoides tras multiplicar el promedio de los espermatozoides contados, en las dos partes de la cámara por $\times 10^6$ para finalmente obtener el número de espermatozoides por cada mL de semen colectado.

Espermatozoides vivos. Para calcular el número de espermatozoides vivos de cada uno de los eyaculados de los animales en experimentación, se realizó por el método descrito por Solís (2002). Por medio de un frotis teñido con Eosina-Nigrosina con el fin de observar y distinguir las células vivas (no teñidas) de las muertas (teñidas). El procedimiento consistió en tomar una muestra del semen con una pipeta Pasteur, y colocarla sobre la esquina de un portaobjetos limpio, seco y previamente templado en el que se depositó una gota del colorante y una 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 a 100X para determinar un total de por lo menos 200 células.

Morfología espermática. Con el objeto de identificar a los espermatozoides anormalmente conformados, se utilizó el método descrito por Rooke *et al.* (2001). El cual consiste en teñir con Eosina-nigrosina la célula espermática. Sobre un portaobjetos previamente templado se depositó una gota de semen y una de colorante de Eosina-Nigrosina, se mezclaron ambas gotas y se realizó un frotis. El frotis se secó a temperatura ambiente y una vez desecado se realizó un examen microscópico. Se examinó un total de 200 células espermáticas para calcular el

porcentaje de anomalías con respecto al total de los espermatozoides contados. Las alteraciones estructurales y morfológicas están basadas en las siguientes anomalías 1); Cola: doblada, enrollada o con gota citoplasmática. 2); Gota citoplasmática (proximal o distal).

Método del hematocitómetro para cuenta de leucocitos

El hematocitómetro es un grueso portaobjetos de cristal en cuyo tercio medio están fijadas tres plataformas paralelas que se extienden a lo largo de su superficie. La plataforma central está subdividida por una ranura transversal en dos mitades, cada una más ancha que las dos plataformas laterales y separadas de ellas y entre sí por fosas. Las plataformas centrales están exactamente 0.1mm más bajas que las dos plataformas laterales, y tienen una regla de Neubauer, que tiene 3 x 3mm (9mm²) y está subdividida en nueve cuadrados secundarios de 1 x 1mm (1mm²). Los cuatro cuadrados de las esquinas se utilizan para el recuento de leucocitos y están subdivididos en 16 cuadrados terciarios. El cuadrado central milimetrado está dividido en 25 cuadrados terciarios, cada uno de los cuales mide 0.2 x 0.2mm. Y se divide de nuevo en 16 cuadrados más pequeños. Un grueso cubreobjetos, que forma un plano perfecto acompaña la cámara de recuento. Cuando está situado sobre la plataforma de la cámara de recuento, hay un espacio exacto de 0.1mm de espesor entre aquél y la plataforma rayada; por consiguiente, cada milímetro cuadrado del rayado forma la base de un espacio que mide 0.1mm³. El líquido disolvente más satisfactorio es el líquido de Turk: ácido acético glacial, 2 mL, solución acuosa al 1% de violeta de genciana, 1 mL, y

agua destilada, 100 mL. El líquido debe refrigerarse y filtrarse con frecuencia. Para la cuantificación de leucocitos en el semen sin fraccionar, la técnica fue: la muestra de semen correctamente mezclada se diluyó 1:10 en el líquido de Turk, utilizando la pipeta de Thoma, ésta conteniendo la mezcla se hizo girar en un mezclador mecánico durante unos 5 minutos, se desecharon las tres primeras gotas y con la siguiente se llenó la cámara, con el cubreobjetos colocado en la cámara de recuento, el extremo de la pipeta que contiene la mezcla fue llevado hasta la ranura en el borde del cubreobjetos. El líquido se deslizó bajo el cubreobjetos por atracción capilar y penetró en la cámara de una forma controlada. Hay que tener cuidado que el líquido llene exactamente el espacio situado debajo del cubreobjetos sin que rebose o se formen burbujas. Las células deben asentarse en la cámara durante varios minutos, examinando con el objetivo de bajo aumento el área rotulada para ver si están distribuidos regularmente. Se realizó el recuento. Se cierra parcialmente el diafragma del condensador del microscopio para hacer que los leucocitos resalten con nitidez utilizando las lentes de bajo aumento (10x). Se contaron los leucocitos en cada uno de los cuadrados grandes de las esquinas (1mm^3). Se contaron los 8 cuadrados grandes de los dos lados de la cámara. Cada cuadrado grande incluye un volumen de $1/10\text{ mm}^3$ y las diluciones fueron de 1:10. Por consiguiente, en el volumen de la cámara situado sobre un cuadrado grande se contó el número de leucocitos en $1/10 \times 1/10 = 1/100\text{ mm}^3$. Esto significa que el recuento de leucocitos es el promedio del número de células en cada uno de los cuadrados grandes (N) multiplicado por 200. Una fórmula general es:

$$\text{Recuento de leucocitos (células /mm}^3\text{)} = \frac{\text{cc} \times d \times 10}{\text{cgc}}$$

En donde cc es el número total de células contadas, d es el factor de dilución, 10 es el factor que transforma la superficie de los milímetros cuadrados ($1/10\text{mm}^3$) a volumen en mm^3 y cgc es el número de cuadrados grandes contados (Henry, 2001).

Tinción de Wright.

Se trata de una solución de eosina y una mezcla compleja de tiacinas, que incluyen el azul de metileno (normalmente del 50 al 75%), azur B (10 a 25%). La solución tampón (pH 6.4) contiene fosfato potásico primario (monobásico) (KH_2PO_4), anhidro 6.63 g, fosfato sódico secundario (dibásico) (Na_2HPO_4), anhidro 2.56g y agua destilada para hacer un litro. Puede prepararse una solución más alcalina (pH 6.7) con 5.13 g de sal potásica y 4.12 g de sal sódica. Para observar los leucocitos en semen el método fue: se mezcló perfectamente la muestra de semen sin diluir, en un portaobjetos se realizó un frotis, una vez secado al aire, se puso sobre un puente de tinción, la extensión se cubrió con el colorante de Wright sin diluir, se dejó actuar un minuto; el alcohol metílico fijó el frotis. Se añadió con cuidado una cantidad igual de solución tampón y se mezcló soplando suavemente, hasta que apareció una escarcha metálica, se dejó actuar desde cinco minutos en adelante, sin mover el portaobjetos, se lavó con agua destilada, se dejó secar y se observó al microscopio con el aumento 100X utilizando aceite de inmersión (Lynch, 1977).

Recuento diferencial de leucocitos

Consiste en reconocer y valorar las proporciones relativas (por 100) de las distintas variedades de glóbulos blancos que se observan en los frotis teñidos. El frotis debe observarse con el objetivo de inmersión con aceite (x 100). Hay dos maneras de llevar a cabo el recuento diferencial: 1. se recorre el frotis en toda su longitud y se cuentan todas las células, puede hacerse el recorrido de regreso. 2. Método del recuento en almena: se empieza en un borde del frotis, se cuentan todas las células hacia dentro hasta un tercio de la anchura del frotis, luego sobre una línea paralela al borde, luego hacia afuera hasta llegar al borde, a lo largo de éste durante una distancia igual, y otra vez hacia dentro (Lynch, 1977).