



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES  
MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

## EFECTO DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (GSH) SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA DE VERRACO BAJO CONDICIONES DE TRÓPICO SUBHÚMEDO

TESIS

Que para obtener el grado profesional de Maestro en Producción Agropecuaria  
opción Terminal Área Pecuaria

Presenta

**MVZ. NANCY PATRICIA ABREGO SALGADO**

**ASESOR: DR. JOSÉ HERRERA CAMACHO**

**COASESOR: DR. EFRÉN ESTRADA PAQUI**

**COMITÉ TUTORIAL:**

DR. AURELIANO JUÁREZ CARATACHEA

MC. RUY ORTIZ RODRÍGUEZ

MC. NAYDA LUZ BRAVO HERNÁNDEZ

MORELIA, MICH. JULIO 2019

## ÍNDICE

### RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN.....	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
2.1. GENERALIDADES REPRODUCTIVAS DEL VERRACO.....	11
2.1.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor.....	11
2.1.2. Endocrinología reproductiva del verraco.....	14
2.1.3. Espermatogénesis.....	17
2.1.4. El eyaculado y su composición.....	19
2.2. EL ESPERMATOZOIDE PORCINO.....	21
2.2.1. Estructura y fisiología del espermatozoide.....	21
2.2.2. Composición y función de la membrana plasmática.....	24
2.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN PORCINO.....	26
2.4. ANALÍTICA SEMINAL.....	27
2.4.1. Características macroscópicas.....	27
2.4.1.1. Temperatura.....	27
2.4.1.2. Volumen.....	27
2.4.1.3. Color – olor.....	28
2.4.1.4. pH.....	28
2.4.2. Características microscópicas.....	28
2.4.2.1. Concentración espermática.....	29
2.4.2.2. Movilidad espermática.....	30
2.4.2.3. Integridad de la membrana plasmática (viabilidad espermática).....	31
2.4.2.4. Tolerancia osmótica del espermatozoide (funcionalidad de membranas).....	32
2.5. CONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO.....	33
2.5.1. Semen diluido conservado a 15-17 °C.....	34
2.6. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DEL EYACULADO.....	35
2.6.1. Raza o línea genética.....	36
2.6.2. Edad y frecuencia de colección del verraco.....	36
2.6.3. Efecto nutricional.....	37
2.6.4. Efecto del medio ambiente.....	39
2.7. EFECTOS DE LA DILUCIÓN Y CONSERVACIÓN A 15 - 17 °C SOBRE EL ESPERMATOZOIDE.....	41
2.8. ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA CONSERVACIÓN DE SEMEN A 15 – 17 °C...	43
2.9. ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA CONSERVACIÓN DE SEMEN.....	48
III. OBJETIVOS.....	51
3.1. General.....	51
3.2. Específico.....	51
IV. HIPÓTESIS.....	52
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
5.1. Ubicación del área de estudio.....	53
5.2. Animales experimentales.....	53
5.3. Obtención del eyaculado.....	53
5.4. Analítica seminal.....	53
5.4.1. Análisis macroscópico.....	53

5.4.2. Análisis microscópico.....	54
5.5. Procedimiento experimental.....	55
5.5.1. Dilución de eyaculados y adición de GSH.....	55
5.6. Grupos experimentales.....	55
5.7. Variables de estudio.....	57
5.7.1. Integridad de la membrana plasmática (viabilidad).....	57
5.7.2. Ensayo dual de resistencia osmótica (HOST) / integridad acrosomal (Azul de comassie).....	58
5.7.3. Movilidad total.....	59
5.8. Análisis estadístico.....	59
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	60
VII. CONCLUSIONES.....	67
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aparato reproductor del verraco (Galina y Valencia, 2009).....	12
Figura 2. Endocrinología para producción de espermatozoides del verraco (Modificado de Senger, 2003).....	16
Figura 3. Espermatogénesis del verraco (Wagner y Claus, 2009).....	18
Figura 4. Divisiones y estructura del espermatozoide de verraco (Modificado de Estrada, 2014).....	23
Figura 5. Estructura de la membrana plasmática del espermatozoide porcino.....	25
Figura 6. Factores que influyen sobre la producción de espermatozoides.....	36
Figura 7. Cambios fisiológicos y endocrinológicos durante el estrés calórico.....	40
Figura 8. Inicio de la peroxidación lipídica en relación a la sustracción de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (Hidalgo, 2013).....	44
Figura 9. Representación esquemática de la peroxidación lipídica.....	45
Figura 10. Daño por ROS en la membrana plasmática del espermatozoide.....	46
Figura 11. Daños al espermatozoide causados por ROS (modificado de Yeste, 2017).....	47
Figura 12. A: glutatión reducido; B: alícuotas de eyaculado; C: cámara de conservación.....	55
Figura 13. Procedimiento experimental para la evaluación del GSH sobre la calidad espermática de semen de verraco en el trópico de Guerrero.....	56
Figura 14. Sonda de inmunofluorescencia SYBR14/PI.....	57
Figura 15. A: espermatozoides con membrana funcional e integridad acrosomal; B: espermatozoide con membrana no funcional y acrosoma dañado.....	58
Figura 16. Integridad de membrana plasmática de tratamientos a 96 horas de conservación a 17 °C, A: Control; B: 1 mM GSH; C: 2 mM GSH (sondas de inmunofluorescencia SYBR14/PI).....	64

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Valores de referencia en la analítica seminal del verraco antes de la dilución (n=40).....	55
Cuadro 2. Efecto del uso de GSH sobre la calidad de semen de verraco diluido conservado a 17 °C en el trópico de Guerrero, México (n= 40).....	60
Cuadro 3. Movilidad total de eyaculados de verraco diluidos conservados a 17 °C adicionados con GSH (% , n= 40).....	62
Cuadro 4. Integridad de membrana plasmática del espermatozoide de verraco suplementado con GSH conservado a 17 °C (% , n= 40).....	63
Cuadro 5. Tolerancia osmótica e integridad acrosomal de espermatozoides conservados a 17 °C adicionados con GSH (% , n= 40).....	65

## RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del Glutati3n reducido (GSH) sobre la calidad esperm3tica de verracos bajo condiciones de tr3pico subh3medo. Se utilizaron 40 eyaculados provenientes de 4 verracos (10 r3plicas por verraco) de l3neas comerciales Yorkshire/Landrace y Pietrain/Duroc entre 24 y 28 meses de edad, se colectaron a intervalos de 7 d3as por la t3cnica de mano enguantada. El eyaculado fue diluido 1:10 con  $2000 \times 10^6$  (espermatozoides viables), se utiliz3 L - Glutati3n Reducido (GSH, Sigma-Aldrich®) adicionado al diluyente media duraci3n (MIII®). Se formaron 3 grupos, grupo control sin GSH y dos tratamientos con concentraciones de GSH: 1 mM y 2 mM, se evalu3 las variables seminales de movilidad total en microscopio 3ptico, Integridad de la membrana plasm3tica mediante la sonda de inmunofluorescencia (SYBR-14/PI), Ensayo dual de resistencia osm3tica (HOST, soluci3n hiposm3tica) / integridad acrosomal (Azul de coomassie 0.22 %). Las mediciones se realizaron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas en el semen conservado a 17°C. Se utiliz3 un dise3o factorial 3 x 4 x 5 (3 concentraciones de GSH: 0, 1 y 2 mM; 4 variables: Movilidad total, integridad de membrana plasm3tica, integridad acrosomal y tolerancia osm3tica; 5 mediciones de conservaci3n: 0, 24, 48, 72 y 96 horas); los datos obtenidos se analizaron a trav3s de mediciones repetidas de modelo de efectos fijos y las diferencias entre tratamientos se obtuvieron a trav3s de medias de m3nimos cuadrados y significancia de  $P < 0.05$ . Los resultados indican que la adici3n de GSH mejor3 ( $P < 0.05$ ). La integridad de membrana plasm3tica del espermatozoide de verraco suplementado con GSH 2 mM fue 88.0% y con GSH 1 mM de 87.3%, no observando diferencia entre concentraciones de GSH, pero si con el grupo control con 85.2% ( $P < 0.05$ ). En la movilidad total, la adici3n de GSH a 2 mM fue 58.9% y para GSH 1 mM de 56.9%, mostrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo control de 52.0%. Durante el periodo de conservaci3n a partir de las 72 y hasta 96 horas de conservaci3n la movilidad total manifest3 una disminuci3n del 14% para el grupo control, mientras tanto, los tratamientos con 1 y 2 mM de GSH tuvieron solo decremento del 11 y 6%, respectivamente. La integridad de membrana plasm3tica fue el tratamiento con 2 mM de GSH logr3 mantener significativamente ( $P < 0.05$ ) en

87.52% al espermatozoide viable, seguido del tratamiento con 1 mM (85.40%), por último, el control con 80.65%. Las variables tolerancia osmótica e integridad acrosomal no mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en entre tratamientos de GSH y el grupo control en ningún periodo de tiempo de conservación. En conclusión, la suplementación con 2 mM de GSH al medio de dilución tiene efecto de mejora en la conservación a partir de las 72 hasta 96 horas a 17 °C, en espermatozoides de verracos en condiciones de tóxico subhúmedo, lo cual es importante para el uso de dosis seminal en programas de IA.

**Palabras clave:** GSH, semen conservado, verraco

## ABSTRACT

The objective of the present investigation was evaluate the effect of reduced glutathione (GSH) on sperm quality of boars under tropic conditions. 40 ejaculates from 4 boars (10 replicates per boar) of commercial lines Yorkshire / Landrace and Pietrain / Duroc between 24 and 28 months of age, were collected at 7 day intervals by the gloved hand technique. The ejaculate was diluted 1:10 with  $2000 \times 10^6$  (viable sperm), L - Reduced Glutathione (GSH, Sigma - Aldrich ®) added to the diluent half conservation (MIII ®). Three groups were formed, control group without GSH and two treatments with GSH concentrations: 1 mM and 2 mM, evaluating the seminal variables: total mobility in optical microscope, Integrity of the plasma membrane by means of the immunofluorescence probe (SYBR-14 / PI), Dual osmotic resistance test (HOST, hypoosmotic solution) / acrosomal integrity (Coomassie blue 0.22%). The measurements were made at 0, 24, 48, 72 and 96 hours in the semen conserved at 17°C. experimental design factorial was used 3 x 4 x 5 (3 GSH concentrations: 0, 1 and 2 mM: 4 variables: Total mobility, plasma membrane integrity, acrosomal integrity and osmotic tolerance and 5 conservation measurements: 0, 24, 48, 72, 96 hours); the data obtained were analyzed through repeated measurements of the fixed-effect model and the differences between treatments were obtained through means of least squares and significance of  $P < 0.05$ . The plasma membrane integrity of boar sperm supplemented with 2 mM GSH was 88.0% and with 1 mM GSH of 87.3%, not observing difference between GSH concentrations, but with the control group with 85.2% ( $P < 0.05$ ). In total mobility, the addition of GSH at 2 mM was 58.9% and for 1 mM GSH of 56.9%, showing significant differences ( $P < 0.05$ ) with respect to the control group of 52.0%. During the conservation period from 72 and to 96 hours of storage, total mobility showed a 14% decrease for the control group, while the treatments with 1 and 2 mM of GSH was observed only a decrease of 11 and 6% respectively. Plasma membrane integrity was the treatment with 2 mM of GSH which achievement maintain significantly ( $P < 0.05$ ) in 87.52% viable sperm, followed by treatment with 1 mM (85.40%), finally, control with 80.65%. The variables osmotic tolerance and acrosomal integrity not show significant differences ( $P > 0.05$ ) in between GSH treatments and the control group any period of time of conservation.



In conclusion, supplementation with 2 mM of GSH to the dilution medium has an effect of improvement in the conservation from 72 to 96 hours at 17°C in spermatozoa of boars in topical conditions, which is important for the use of seminal dose in AI programs.

**Keywords:** GSH, conserved semen, boar

## I. INTRODUCCIÓN

La actividad porcina en México posee una gran demanda de carne y la autosuficiencia es de un 60%; actualmente el consumo per cápita es de 18 kg y crece a un ritmo superior del 4%, por lo que cada año tiene se importa más carne de cerdo; el 86% de las importaciones provienen de Estados Unidos (SIAP, 2018). Por otra parte, hay un aumento importante de granjas que destinan su producción a la exportación, en el 2018 las exportaciones superaron las 170 mil toneladas y el 90% de este volumen se destinó a Japón (Confederación de Porcicultores Mexicanos, 2018), por lo tanto, una de las grandes oportunidades es mejorar la productividad de esta especie. En los últimos años se tiene registro que la mayoría de las granjas están por debajo de los 25 lechones destetados por cerda al año (INEGI, 2019).

La producción porcina es principalmente intensiva y se basa en puntos básicos como: manejo, alimentación, genética, sanidad y reproducción; en cuanto a este último punto, más del 90% de las hembras reproductoras son inseminadas con semen fresco conservado a 17 °C y solo alrededor del 2% con semen criopreservado. En la reproducción porcina el verraco posee un papel destacado, ya que, es el responsable no solo del mejoramiento genético, si no en gran medida de la fertilidad de la piara (Villa *et al.*, 2008). La utilización de la inseminación artificial (IA) con semen conservado a 17 °C se ha extendido gracias al desarrollo de diluyentes que permiten la conservación del semen con excelentes resultados, pero su principal limitación radica en la vida útil del semen que varía entre 2-4 días (Gadea, 2001). Conjuntamente, con la calidad espermática se convierte en un punto de gran importancia, debido a que, sirve como criterio de valoración de la posible respuesta en cuanto a la capacidad fecundante, puesto que verracos que presentan en un examen seminal rutinario una calidad pobre, posteriormente tienen una fertilidad reducida (Trujillo *et al.*, 2017). Sin embargo, esto no es una regla que se cumpla en la totalidad de los casos, pues se ha probado que eyaculados que presentaron una buena calidad espermática no alcanzaron niveles normales en cuanto a fertilidad durante la conservación a 17 °C. Repercutiendo a corto plazo en

problemas de infertilidad, disminución en la tasa de partos y tamaño de camada afectando la estabilidad económica de las unidades de producción, las cuales dependen de la producción de lechones (Rodríguez *et al.*, 2012).

Los procesos de refrigeración producen alteraciones de carácter físico y químico sobre las membranas de los espermatozoides, teniendo como consecuencia la reducción de la viabilidad y movilidad celular, y, por lo tanto, de su capacidad fecundante (Waberski *et al.*, 2011; Obando *et al.*, 2012). Las alteraciones producidas por el descenso de temperatura están asociadas con el llamado estrés oxidativo, que se genera por la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Todas las células vivas producen bajo condiciones aeróbicas ROS, las cuales se originan principalmente de funciones metabólicas normales de la misma célula (Mata-Campuzano *et al.*, 2012). Los ROS son radicales libres que se forman cuando se rompe un enlace covalente entre moléculas y un electrón queda con cada átomo recién formado (Buonocore *et al.*, 2010).

Las células espermáticas presentan en su estructura ácidos grasos poliinsaturados, especialmente la especie porcina contiene un gran número de ellos, y debido a que los lípidos de los espermatozoides son el sustrato principal de los ROS, son los espermatozoides de esta especie especialmente sensibles a la peroxidación lipídica u oxidación; que durante la conservación la vida útil del semen está condicionada por la producción de ROS, debido a su vez al inevitable proceso del metabolismo de los espermatozoides (Aitken y De Luliis, 2010; Yeste, 2017). Bajo este contexto, se hace necesaria la utilización de compuestos antioxidantes, con la intención de mejorar la calidad espermática durante la conservación, y por tanto mejorar la capacidad fecundante de los espermatozoides. Los antioxidantes son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones; su función es donar electrones para evitar una reacción en cadena de óxido-reducción de moléculas vitales como lípidos, proteínas y ADN (Membrillo *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2006).

El glutatión reducido (GSH) es un antioxidante que ha demostrado tener efectos positivos como aditivo en el diluyente de conservación a 17 °C, así como, en los medios de criopreservación (Estrada, 2014). Actúa como un mecanismo de defensa contra la peroxidación lipídica causado por ROS y juega un papel importante en el mantenimiento de la calidad espermática (Bucak *et al.*, 2010). Córdova (2010) demostró que el GSH adicionado al diluyente de conservación a 17 °C, mantuvo de mejor manera las características espermáticas durante cinco días de almacenamiento, en cuanto a movilidad total, integridad de membrana y acrosoma íntegro.

## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

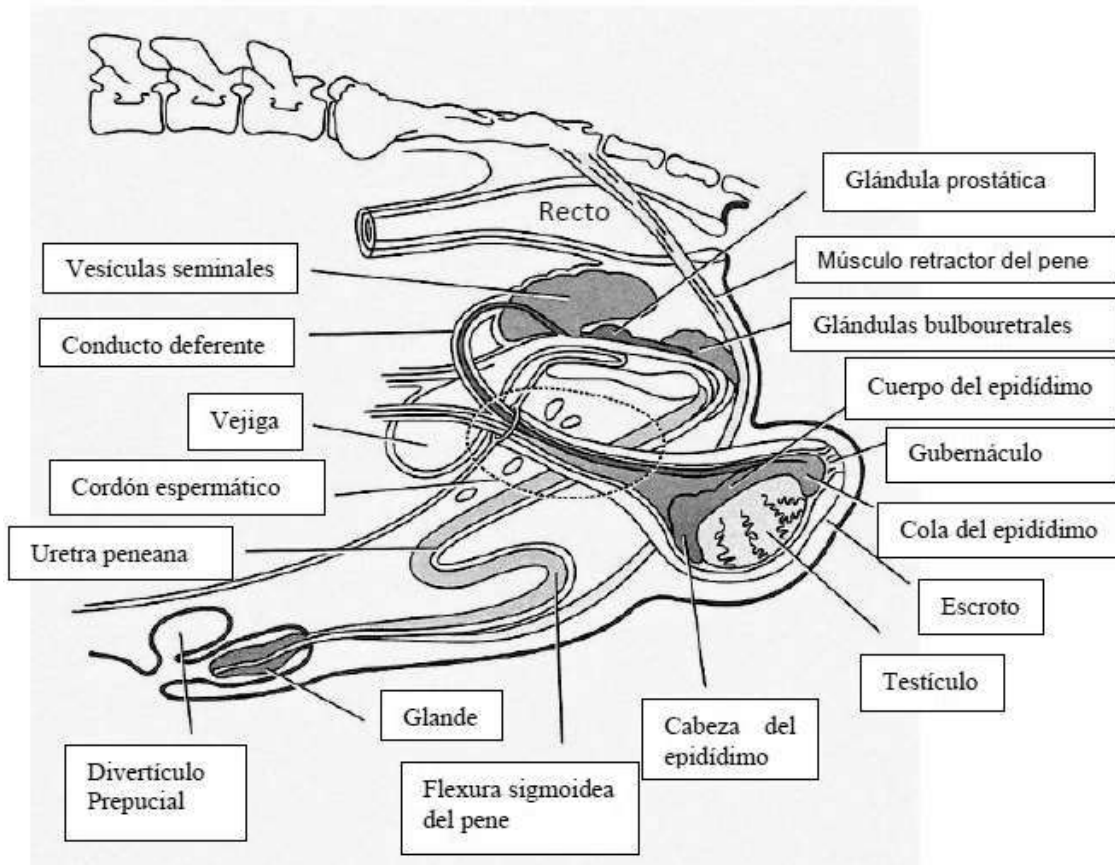
### **2.1. GENERALIDADES REPRODUCTIVAS DEL VERRACO**

#### **2.1.1. Anatomía y fisiología del aparato reproductor**

El aparato reproductor del verraco tiene las funciones de formación, maduración, transporte y transmisión de las células germinales masculinas, los espermatozoides, que son depositados en el tracto reproductor de la hembra (König y Liebich, 2005). Anatómicamente consta de testículos, epidídimos, conductos deferentes, glándulas accesorias, uretra y pene (figura 1) (Estrada, 2014).

Los testículos son los órganos primarios de reproducción en el macho y desempeñan dos funciones: gametogénesis y esteroidogénesis, ambas reguladas por gonadotropinas; son órganos pares de forma ovalada que se ubican en la región perianal y están colocados de tal forma que el eje mayor se encuentra dirigido hacia arriba y atrás (Bonet *et al.*, 2012). En el verraco adulto miden 13 cm de largo, 7cm de diámetro y pesan alrededor de 360 gramos; considerando que entre mayor tamaño testicular la calidad del semen eyaculado será mejor (Hafez, 2002; Galina y Valencia, 2009). El testículo está envuelto por una cápsula de tejido conectivo llamada túnica albugínea cuya función es mantener el parénquima testicular bajo presión, a través de ella transitan los vasos sanguíneos, además de poseer proyecciones hacia el interior del testículo llamados septos testiculares, estos dividen al parénquima en lobulillos, de esta manera dan origen a los túbulos seminíferos, que tiene en su interior tejido intersticial y los conductos aferentes; en conjunto, su función primordial es producir espermatozoides a partir de las espermatogonias (espermatogénesis) (Estrada, 2014; Trujillo *et al.*, 2017). Como última envoltura, los testículos se encuentran protegidos por el escroto, siendo este, una evaginación de la pared abdominal, que se encuentra en contacto con el ambiente exterior (Dyce *et al.*, 2010; Estrada, 2014). El escroto se encuentra firmemente unido a la túnica dartos, la cual, está atravesada por una serie de fibras musculares que ayudan a retraer el escroto haciéndolo más rugoso junto con la vena del plexo pampiniforme y el músculo cremáster, ayudando a la termorregulación en los testículos y a la espermatogénesis que requiere una

temperatura menor que la del cuerpo (Galina y Valencia, 2009). La temperatura rectal respecto de la temperatura escrotal no varía más de los 3 °C (Hafez, 2002).



**Figura 1.** Aparato reproductor del verraco (Galina y Valencia, 2009).

Adyacente a cada testículo se encuentra el epidídimo conformado de tres partes: cabeza (*Caput epididymidis*) donde se realiza la maduración espermática, cuerpo (*Corpus epididymidis*) transporta los espermatozoides hasta la última porción del epidídimo y cola (*Cauda epididymidis*) donde los espermatozoides son almacenados hasta su expulsión, (Hafez, 2002; Galina y Valencia, 2009; Bonet *et al.*, 2012). El epidídimo mide 18 cm de largo y puede pesar alrededor de 85 gramos (König y Liebich, 2005).

Continuamente, se localiza el conducto deferente, este conducto consta de tres estratos membranosos: externa o fibrosa, media e interna o mucosa, esta última se compone de pliegues longitudinales, (Galina y Valencia, 2009; Bonet *et al.*, 2012).

La función principal de este conducto es transportar a los espermatozoides hacia la uretra. Por lo tanto, penetra la cavidad abdominal, cruza de manera ventral al uréter y se ensancha para formar la ampolla del conducto deferente, porción que contiene a las glándulas de la ampolla, cuya secreción se mezcla con el líquido seminal (Hafez, 2002).

Dentro de las glándulas accesorias se encuentran las ámpulas deferentes, la próstata, vesículas seminales y las glándulas bulbouretrales; en conjunto aportan plasma seminal, el cual está compuesto de nutrientes que mantienen la viabilidad de los espermatozoides. Están ubicadas en la porción pélvica de la uretra, dentro de la cavidad abdominal (Estrada, 2014; Trujillo *et al.*, 2017).

Las vesículas seminales, son glándulas pares, lobulares, de forma triangular, y voluminosas; se unen con el conducto deferente (Galina y Valencia, 2009). Tiene una longitud de 13 cm, anchura de 7 cm, grosor de 4 cm y pueden llegar a pesar hasta 210 gramos (König y Liebich, 2005). Funcionan depósito de secreciones que contribuyen a proporcionar material energético (fructuosa y monosacáridos) al espermatozoide y volumen, constituyen de un 10 a 30% del eyaculado total (Galina y Valencia, 2011). También, hay presencia de aminoácidos, ácido cítrico, inhibidores de la acrosina y un elevado contenido de ergotioneina e inositol (Córdova, 2010).

En cuanto a la próstata, consta de dos partes, el cuerpo que se encuentra extra uretral en la base de la vejiga y su porción diseminada se encuentra distribuida a todo lo largo de la uretra de bajo la capa muscular (Galina y Valencia, 2009; Trujillo *et al.*, 2017). Su secreción contiene principalmente ácido cítrico, también, ácido ascórbico, proteínas, lípidos y azúcares, constituyendo hasta el 60% del volumen total del eyaculado (Bernabé *et al.*, 2009; Galina y Valencia, 2011). Es responsable también de la secreción de zinc en forma de iones libres y unidos a proteínas, dando así, estabilidad a la membrana espermática y de la cromatina nuclear, se ha

relacionado con el consumo de oxígeno por los espermatozoides y su movimiento (Trujillo *et al.*, 2017)

Las glándulas bulbouretrales, que son un par de glándulas tubulares, desarrolladas de forma cilíndrica; están ubicadas a lo largo de la uretra en su porción pélvica, rodeadas por músculos estriados bulboglandulares, (Bernabé *et al.*, 2009), secretan una porción de consistencia gelatinosa (tapioca) y constituye parte del eyaculado, que, de manera natural funciona como tapón dentro del aparato reproductor de la cerda, evitando así, la pérdida de semen depositado posterior a la cópula (Trujillo *et al.*, 2017). Con respecto a la uretra, es un conducto cutáneo-musculoso que consta de tres porciones: pelviana, vulvar (raíz del pene) y la porción peneana (Galina y Valencia, 2011). Está cubierta por los cuerpos de pene y su función principal es conducir hasta el orificio uretral el eyaculado para lograr la expulsión, de la misma manera que la orina (Hafez, 2002).

Como última estructura que conforma el aparato reproductor del verraco, se ubica el pene, mide 45 a 50 cm, con un diámetro de 1.5 a 2 cm; el tejido eréctil es escaso por lo tanto se clasifica como fibroelástico (Galina y Valencia, 2011). Consta de dos cuerpos cavernosos y un cuerpo esponjoso que rodean a la uretra; los dos primeros se extienden hasta la punta del pene para formar el glande, el cual, tiene forma de tirabuzón, desembocando en la abertura del prepucio (Dyce *et al.*, 2010). El prepucio es considerado la parte más externa del pene y consta de cuatro sacos, que, normalmente contiene restos de orina y descamaciones epiteliales excretados junto con feromonas, dando así, el olor característico del verraco; al conjunto de secreciones se le denomina esmegma (Hafez, 2002; Dyce *et al.*, 2010).

### **2.1.2. Endocrinología reproductiva del verraco**

El sistema endocrino participa de manera esencial en la regulación de los procesos que permiten el crecimiento y desarrollo de los gametos masculinos. Básicamente, está integrado por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, cualquier modificación en

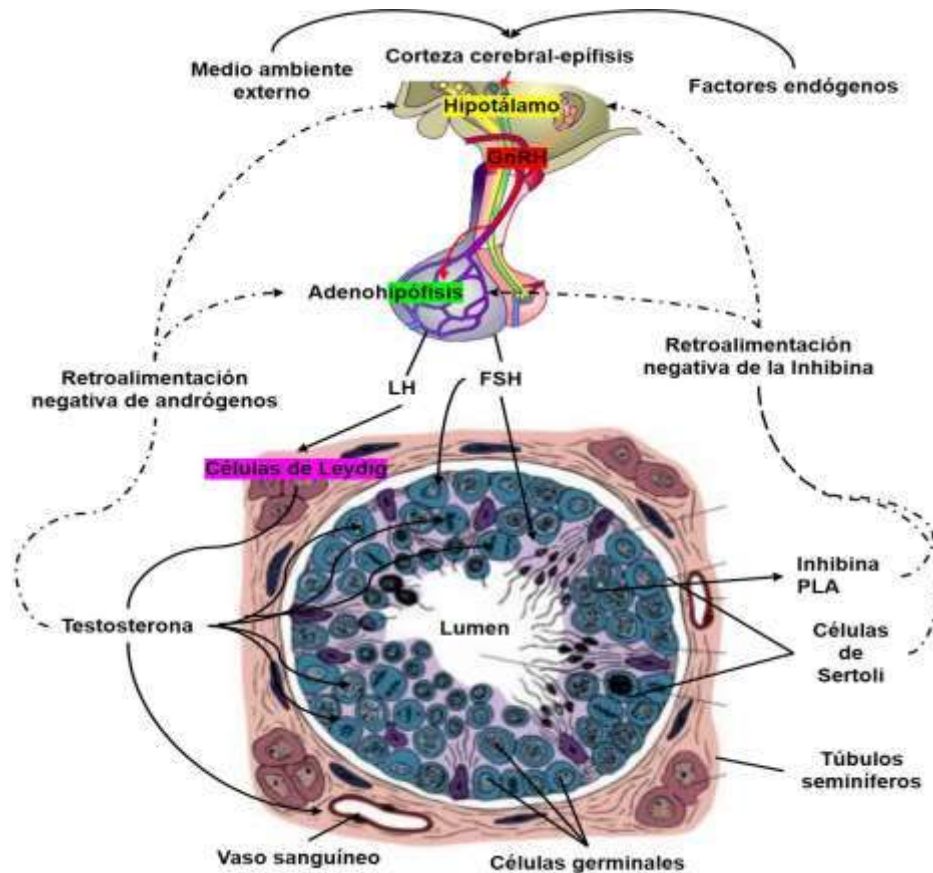


estos niveles de regulación, alterará la reproducción y conducirá a un problema de infertilidad (Trujillo *et al.*, 2017).

La regulación endocrina se inicia a los 125 días de edad como proceso continuo controlado, por la respuesta cerebral a diferentes estímulos externos como el fotoperiodo, la temperatura ambiental, el peso corporal y el medio ambiente social (Estrada, 2014). Las hormonas reproductivas de mayor importancia en el verraco son: Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), Hormona Luteinizante (LH), Hormona Folículo Estimulante (FSH) e Inhibina, además la Testosterona (T4) y Estrógenos, cada una tiene una función específica a nivel testicular y en el comportamiento sexual y su producción es un efecto de reacción en cadena, en distintos lugares dentro del organismo del verraco (figura 2) (Hafez, 2002; Trujillo *et al.*, 2017). Para llevar a cabo la espermatogénesis existen mecanismos hormonales de retroalimentación internos; así, el incremento en la sensibilidad del hipotálamo a niveles basales de testosterona provoca pulsos de liberación de mayor duración de GnRH provenientes del hipotálamo, para generar la liberación de LH y FSH estimulando el funcionamiento gonadal y dar inicio a la espermatogénesis (Senger, 2003; Caires *et al.*, 2008). La FSH induce cambios bioquímicos y morfológicos en las células de Sertoli, convirtiendo los andrógenos en estrógenos y está involucrada en la síntesis de la proteína transportadora de andrógenos (ABP), así como de la inhibina (Jones y DeCheremy, 2005). Mientras que, en las células de Leydig estimula el desarrollo de receptores de unión a la LH (Kuster y Althouse, 2007) La LH es estimulada a partir de la GnRH, la cual induce la producción de testosterona dentro de las células de Leydi (Zarco, 2008). La producción de testosterona promueve el funcionamiento de las células de Sertoli y del último estadio de la espermatogénesis, el desarrollo y funcionamiento de las glándulas accesorias, así como para la regulación del comportamiento sexual del verraco, es decir, el cortejo, la erección y la eyaculación (Germann y Stanfiel, 2005; Trujillo *et al.*, 2017).

Por su parte, la Inhibina es producida en las células de Sertoli y regulada por la FSH, que a su vez controla la producción de la misma FSH, a través de retroalimentación

negativa sobre la hipófisis (Senger, 2003; Adams, 2005). Las células de Leydig producen diversos andrógenos, predominando la testosterona (Oskam *et al.*, 2010). La unión de los andrógenos a la ABP intratesticular permite mantener las cantidades necesarias de andrógenos dentro del túbulo seminífero, siendo a su vez responsable de la síntesis, en las células de Sertoli, de la enzima aromatasa que convierte la testosterona en estradiol (E2) (Jones y DeChereny, 2005; Caires *et al.*, 2008). El E2 testicular va por vía sanguínea al hipotálamo, en donde tiene un efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación de GnRH (Galina y Valencia, 2011).

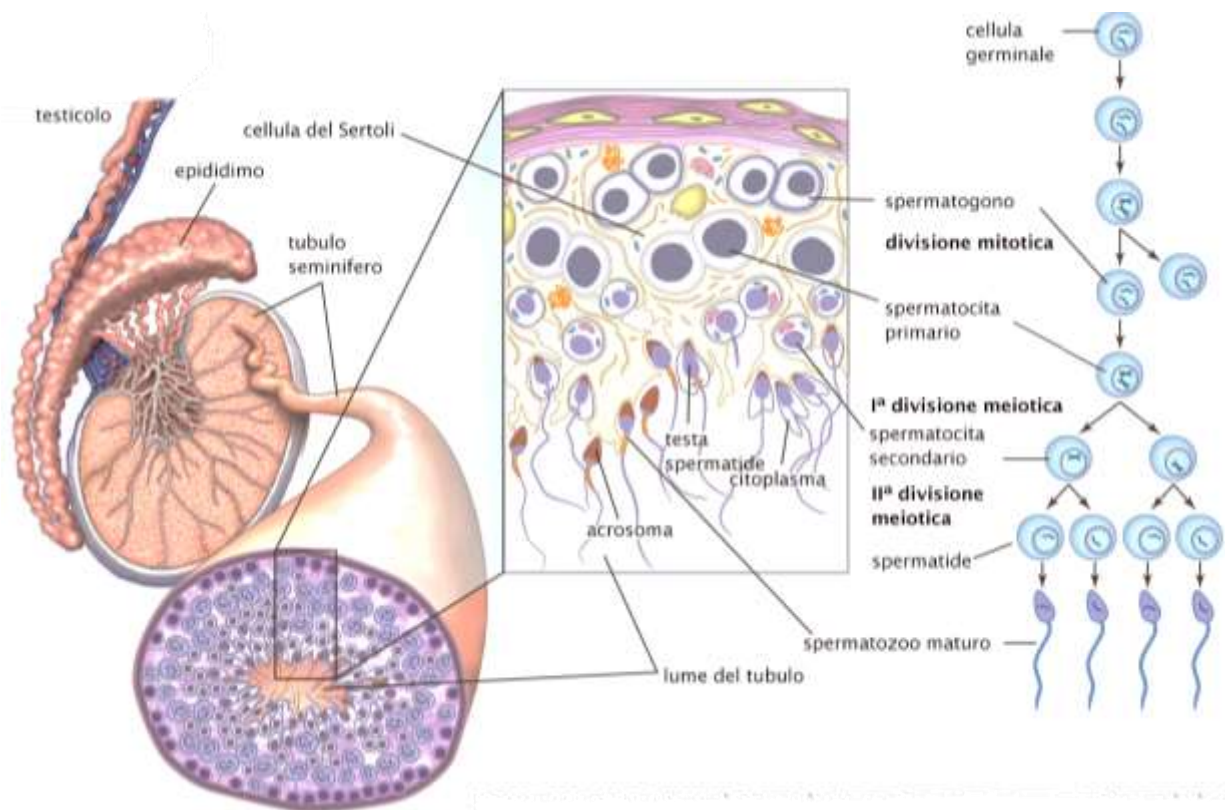


**Figura 2.** Endocrinología para producción de espermatozoides del verraco (Modificado de Senger, 2003).

### 2.1.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis se lleva a cabo en el epitelio de los tubos seminíferos, en el verraco tiene una duración de 35 a 37 días, se compone de cuatro fases: espermatoctogénesis (mitosis), meiosis, espermiogénesis y espermiación, dicho proceso está regulado por diferentes vías, endócrinas, parácrinas y autócrinas que modulan la actividad de las células somáticas y germinales, e involucran la expresión coordinada de genes específicos en cada fase del proceso (Senger, 2003; Avelar *et al.*, 2010; Briz y Fábrega, 2013).

Dentro de la primera fase de espermatoctogénesis hay proliferación por mitosis de un número fijo de células germinales, dando lugar a células diploides espermatogonias A1. En el compartimento basal, las células germinales se unen a las células de Sertoli, que les proporciona nutrición, protección con la berrera hematotesticular y aislamiento del sistema inmune (Johnson *et al.*, 2008). Las espermatogonias A1 llevan a cabo alrededor de 6 divisiones mitóticas para formar células subsiguientes: espermatogonias A1 hasta A4 y espermatocitos primarios. En total, una espermatogonia inicial A1 produce 64 espermatocitos primarios (Senger, 2003). Posteriormente, comienza la fase de meiosis donde ocurre la reducción del material genético y se divide en meiosis I y meiosis II, dando lugar a 256 espermatocitos secundarios haploides, esto ocurre por cada espermatogonia A1 (García-Gil *et al.*, 2002). A este nivel existe un proceso de apoptosis, como medida homeostática (Wagner y Claus, 2009). Seguido de esto, inicia la fase de espermiogénesis, etapa de diferenciación morfológico-funcional de los espermatocitos convirtiéndose en espermátidas; (figura 3). Durante este movimiento se lleva a cabo el desarrollo del acrosoma y la formación de los centríolos en el flagelo, así como la condensación de la cromatina nuclear (O'donnell *et al.*, 2011).



**Figura 3.** Espermatogénesis del verraco (Wagner y Claus, 2009).

Las espermátidas llegan a introducirse en el citoplasma de las células de Sertoli, donde adquieren glucógeno como sustrato de reserva energético a utilizar durante los diferentes cambios estructurales del espermatozoide (Hafez, 2002). El aparato de Golgi de la espermátida se transforma en el acrosoma y uno de sus centriolos constituye el axonema del flagelo; también, las histonas nucleares son reemplazadas en su mayor parte por protaminas, cambiando así la estructura nuclear (Abou-Haila y Tulsiani, 2000; Briz y Fábrega, 2013). Las mitocondrias migran hacia el flagelo para formar la vaina mitocondrial, y el contenido citoplasmático se reduce dejando como resto final la gota citoplasmática (Bonet *et al.*, 2000). Finalmente, ocurre la fase de espermiación, proceso en el cual los espermatozoides son liberados por las células de Sertoli, moviéndose hacia afuera de los túbulos seminíferos al epidídimo para su maduración, en donde alcanzan su potencial de fertilidad después de 12-15 días de tránsito (Martínez-Pastor *et al.*, 2011; O'donnell *et al.*, 2011). Se han distinguido entre 6 y 10 regiones en el epidídimo dependiendo de la composición del fluido epididimario y de las

modificaciones que el espermatozoide experimenta en cada región (Fábrega *et al.*, 2011).

Otro cambio importante es la modificación del metabolismo aeróbico a anaeróbico, optimizando el fenotipo energético de los espermatozoides para su vida post-eyaculación (Yeste, 2017); de la misma manera, adquieren la capacidad de adhesión en la superficie de la membrana plasmática de las espermoadhesinas, liberadas por las glándulas accesorias; de esta manera, evitan que el espermatozoide sufra una reacción acrosomal espontánea o inducida, hasta el momento en que interactúan con las células del epitelio del oviducto, formando así el reservorio espermático oviductal (García-Gil *et al.*, 2002; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2007; García *et al.*, 2010). La producción espermática sigue un esquema de ondas que recorren todas las secciones de un túbulo seminífero, en una secuencia consecutiva para completar el ciclo y proceder al siguiente nivel de desarrollo (Hafez, 2002). Se estima que la producción diaria es de unos  $16 \times 10^9$  espermatozoides y permite al verraco mantener la cantidad adecuada de reservas espermáticas durante la vida reproductiva del verraco (Senger, 2003).

#### **2.1.4. El eyaculado y su composición**

El proceso de eyaculación en el verraco dura entre 6 y 20 minutos, el volumen de eyaculado está entre 200 y 300 ml, alcanzando en casos excepcionales los 500 ml (Espinosa, 2002; Estrada, 2014); sin embargo, el volumen está sujeto a considerables variaciones como resultado de características individuales del verraco, raza, condiciones fisiológicas y el medio ambiente (Gadea *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2006). El eyaculado del verraco está formado por tres fracciones (Sancho, 2004; Peña *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2017):

- a) Fracción pre-espermática constituida fundamentalmente por secreciones producidas por la próstata, vesículas seminales y glándulas bulbouretrales, que, en conjunto recibe el nombre de plasma seminal, es de aspecto transparente y no contiene espermatozoides, su volumen oscila de 10 a 15 mL.

- b) Fracción espermática, considerada la fracción rica en espermatozoides, contiene una elevada concentración, su aspecto es lechoso, el volumen de esta fracción es de 70 a 100 mL.
- c) Fracción posespermática de color blanquecino casi transparente, su contenido es elevado en plasma seminal, corpúsculos gelatinosos “tapioca” que procede de las glándulas bulbouretrales y pocos espermatozoides, el volumen de esta fracción oscila de 150 a 200 mL.

El volumen constituido por los espermatozoides del eyaculado porcino representa del 10 al 30% y el plasma seminal del 70 al 90% (Trujillo *et al.*, 2002). El plasma seminal está formado por la contribución de las secreciones del testículo y epidídimo, representando del 2 al 5% del volumen, vesículas seminales del 15 al 20%, glándulas bulbouretrales del 10 al 15% y próstata del 45 al 60% (Casas *et al.*, 2009).

El contenido del plasma seminal está constituido por compuestos orgánicos e inorgánicos, principalmente carbohidratos, lípidos, aminoácidos y proteínas; (Caballero *et al.*, 2012). Dentro de los carbohidratos se encuentran la glucosa y en menor medida la fructuosa (Foxcroft *et al.*, 2008). Otros componentes de suma importancia son los iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{k}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ , fosfato inorgánico, inositol, ácido láctico, ácido cítrico, ácido glutámico, glicerofosocolina, glicerofosfatidilinositol, arginina, creatinina, ergotioneina, proteasas, acrosina, nucleasa, fosfatasa ácida y alcalina, superóxido dismutasa, prostaglandinas y hormonas como el estradiol (Foote, 2002; Medrano *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2017).

En cuanto a, las proteínas del plasma seminal influyen en la función y capacidad de fecundación de los espermatozoides al interactuar con el tracto reproductor de la cerda, durante el transporte espermático al sitio de fecundación (Moura *et al.*, 2006). En conjunto mantiene la osmolaridad adecuada y un pH neutro, además de proporcionar fuentes de energía para el metabolismo de los espermatozoides (Hafez, 2002). La proporción de estos componentes dependerá de diversos factores

como la raza, el intervalo entre eyaculaciones y la salud del verraco (Cardozo *et al.*, 2006).

## **2.2. EL ESPERMATOZOIDE PORCINO**

El espermatozoide es una célula eucariótica haploide (Aurich, 2005) y altamente especializada (Martín, 2013). Su actividad metabólica varía en las diferentes etapas de la vida del espermatozoide de acuerdo a señales del medio que los rodea, con el fin de lograr la fecundación (Roldan, 2012). El espermatozoide de verraco es una de las células más diferenciadas en cuanto a su morfología, composición de membranas (proporción de los distintos tipos de fosfolípidos o de ácidos grasos poliinsaturados), mecanismos de regulación del calcio intracelular y vías de señalización celular (Roldan, 2012; Martín, 2013).

### **2.2.1. Estructura y fisiología del espermatozoide**

El espermatozoide de verraco mide alrededor de 44  $\mu\text{m}$  de longitud y está dividido en tres secciones principales: cabeza (7  $\mu\text{m}$ ), cuello (0.7  $\mu\text{m}$ ) y cola (37  $\mu\text{m}$ ). Estas secciones están rodeadas por una estructura lipoproteínica en forma de bicapa continua llamada plasmalema o membrana plasmática (figura 4) (Trujillo *et al.*, 2002; Estrada, 2014).

La cabeza es plana bilateralmente y de forma ovalada conteniendo en su ápice una vesícula o acrosoma. Sus dos caras presentan características asimétricas, una aparentemente plana y la otra presenta una protuberancia apical en forma de semiluna, que se extiende por los márgenes de la cabeza a lo largo de 1.2  $\mu\text{m}$  (Quintero-Moreno *et al.*, 2009; Briz y Fábrega, 2013). Dentro de la cabeza se encuentran estructuras importantes como el núcleo y el acrosoma (Darszon *et al.*, 2006; Flores y Vilanova, 2015). La cabeza a su vez se subdivide en tres regiones basadas en las características de la membrana, por lo tanto, se denominan como región acrosomal (área cubierta por el acrosoma), región ecuatorial (área donde se inserta el acrosoma) y área post-acrosomal (zona que solo presenta membrana plasmática).

El núcleo es una estructura rígida formada por la teca perinuclear y contiene los filamentos de DNA que se estructuran en complejos nucleoproteínicos al ligarse a protaminas (P1) y a histonas, estas estructuras forman la cromatina condensada (Hermo *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2011). La longitud de núcleo es de 6.6  $\mu\text{m}$  y el grosor varía en las dos regiones de la cabeza que este abarca, 220nm en la región acrosomal y 320 nm en la región post-acrosomal (Bonet *et al.*, 2000).

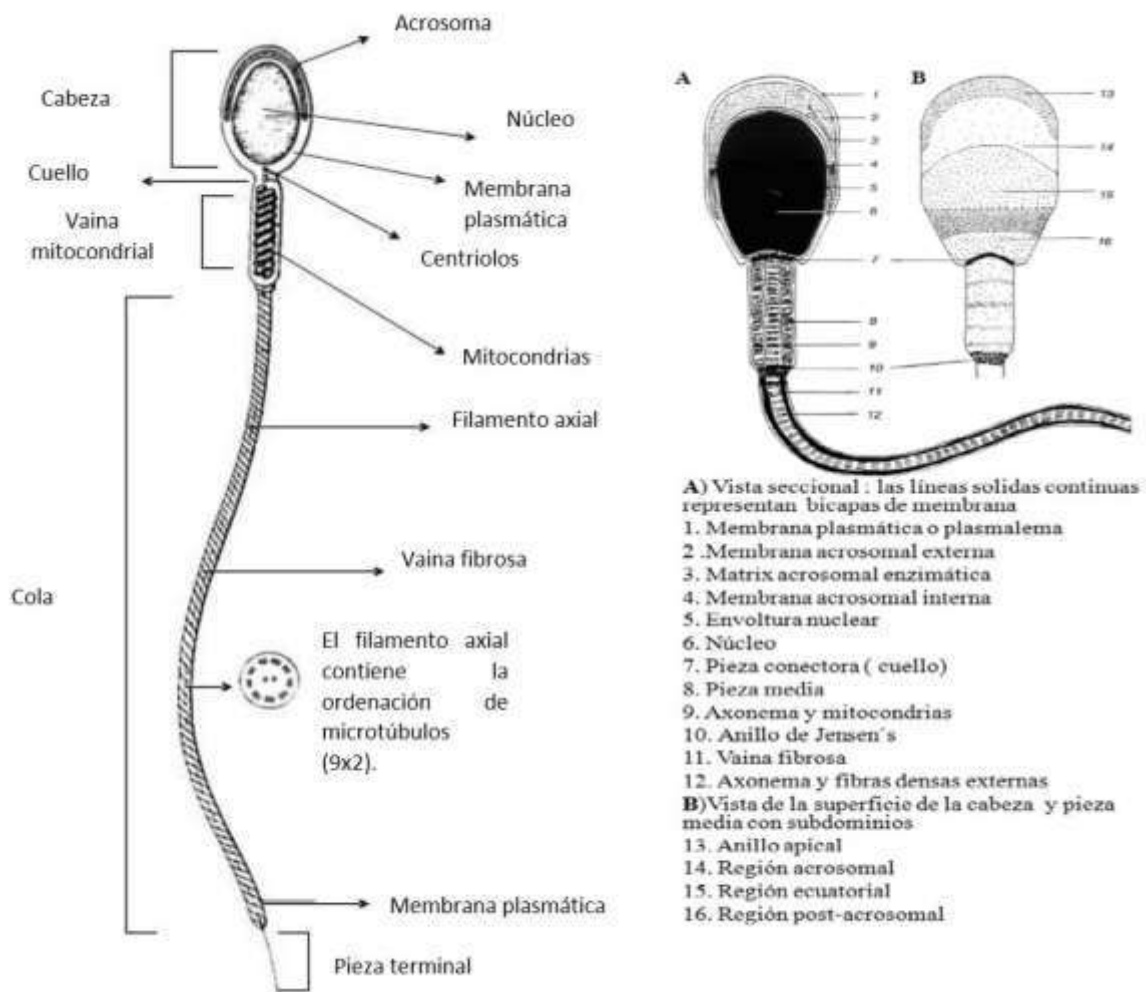
Por su parte, el acrosoma es una vesícula que cubre los dos primeros tercios de la cabeza, en su interior contiene variedad de enzimas proteolíticas principalmente hidrolasas y esterases (Bonet *et al.*, 2006). El contenido enzimático, principalmente la hialuronidasa (Darszon *et al.*, 2006; Hermo *et al.*, 2010). Aunque la superficie del acrosoma es una vesícula continua, está formado por dos membranas superpuestas: la membrana acrosomal externa que se encuentra en contacto con la membrana plasmática y la interna que está en contacto con la teca perinuclear (Pesch y Bergmann, 2006; Hermo *et al.*, 2010).

La pieza de conexión o cuello une la cabeza con la pieza intermedia y forma de trapecio, es un segmento de unión corto de 1  $\mu\text{m}$  que va desde la base del núcleo hasta la primera mitocondria de la pieza intermedia y contiene el centriolo a partir del cual se llevará primera división mitótica (Bonet *et al.*, 2000).

El flagelo o cola tiene forma filamentosa y cilíndrica compuesta de tres piezas: la pieza intermedia o mitocondrial, la pieza principal y la pieza terminal. La pieza intermedia o mitocondrial tiene 9  $\mu\text{m}$  en longitud y 0.7  $\mu\text{m}$  de diámetro, y presenta una estructura axonemática cubierta por la vaina mitocondrial, estructura formada por las mitocondrias helicoidalmente alrededor del axonema (Bonet *et al.*, 2000; Estrada, 2014). Esta pieza intermedia está conectada con la pieza principal a través del anillo de Jensen, un paquete de subunidades filamentosas que adhieren estas dos estructuras, evitando el desplazamiento de la vaina mitocondrial (Guan *et al.*, 2009). La pieza principal es el segmento más largo del flagelo con una longitud de



30  $\mu\text{m}$ , se extiende desde el final del anillo de Jensen hasta el segmento terminal y su función consiste en proporcionar movilidad al espermatozoide (Pesch y Bergmann, 2006). En su interior se encuentran estructuras citoesqueléticas formando la vaina fibrosa, esta se compone de dos columnas longitudinales, colocadas de manera contralateral conectadas con un arreglo estructural, facilitando así el bateo flagelar; también cuenta con proteínas citoesqueléticas que establecen enlaces disulfuro durante la maduración epididimal, haciendo que toda la estructura sea extremadamente estable (Hermo *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Divisiones y estructura del espermatozoide de verraco (Modificado de Estrada, 2014).

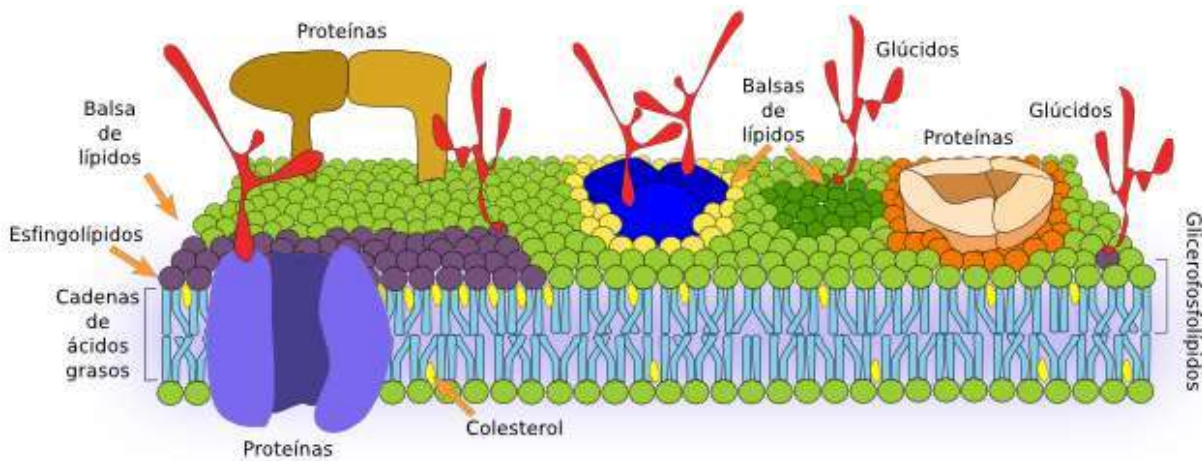
Por su parte, la membrana plasmática es una estructura que además de rodear a la cabeza espermática, también recubre a todo el flagelo; es muy dinámica y fluida; ya que sus lípidos y proteínas son capaces de moverse (difusión lateral) y presentar movimientos de flexión y rotación (Darszon *et al.*, 2006). Dentro de dichas modificaciones destacan alteraciones fisicoquímicas de los lípidos, dando lugar a cambios en el patrón de distribución de las proteínas, insertándose nuevas proteínas sintetizadas en el epidídimo y perdiendo o restituyéndose proteínas de origen testicular (Arenas *et al.*, 2010).

### **2.2.2. Composición y función de la membrana plasmática**

Bioquímicamente la membrana del espermatozoide está constituida por una bicapa lipídica y proteínas unidas por interacciones no covalentes, los lípidos están dispuestos en forma de una doble capa continua de 4 a 5 nm de grosor (figura 5) (Gadella y Harrison, 2000). Las proteínas que están incluidas en la bicapa lipídica con diversas funciones, como el transporte de las moléculas específicas hacia el interior y exterior de la célula; mismas que actúan como enzimas o catalizadores de las diversas reacciones y funcionan como receptores en la transducción de señales (Estrada, 2014). Además de lípidos y proteínas, la membrana también contiene carbohidratos, que en la mayoría de los casos son cadenas de azúcares simples o polisacáridos (Arenas *et al.*, 2010).

La membrana plasmática está dividida en regiones o dominios, que difieren entre ellos tanto en su estructura y composición, cada uno de los cuales tendrá una función determinada a lo largo de la vida del espermatozoide (Bonet *et al.*, 2006). En el caso de los lípidos, conforman la estructura principal de la membrana del 30 al 50% de la membrana, dentro de los cuales el 60 al 70% corresponden a fosfolípidos, que a su vez 50% son lípidos esteres. Aspecto que resulta importante para la fusión de los gametos, ya que, requiere la participación particular de un microambiente de lípidos (Gadella y Harrison, 2002).

Los fosfolípidos de la membrana plasmática se distribuyen en dos monocapas contrapuestas, con la parte hidrofóbica (ácidos grasos) en contacto forma la bicapa lipídica, esto otorga asimetría a esta estructura; la diferencia entre los fosfolípidos insaturados de la cara externa y la cara interna hidrofílica de la membrana plasmática favorece su polaridad y movimiento de translocación fosfolipídica entre ambas caras, gracias a la función de enzimas fosfolípido transferasas (Yeste, 2009; De Mercado, 2011; Hidalgo, 2013).



**Figura 5.** Estructura de la membrana plasmática del espermatozoide porcino.

De acuerdo a Watherhouse *et al.* (2006), los ácidos palmítico, esteárico, oleico, docosapentaenoico y docosahexaenoico (DHA) son los ácidos grasos de cadena larga más abundantes en la membrana plasmática del espermatozoide de verraco. Se ha determinado que los fosfolípidos presentes son en su mayoría fosfatidilcolina, esfingomiolina, fosfatidiletanolamina, y en menor cantidad, fosfatidilserina, difosfatidilglicerol, fosfatidilinositol. Considerando que la fosfatidilcolina se encuentra estable en las tres principales regiones del epidídimo (cabeza, cuerpo y cola) y las cantidades declinan significativamente hasta llegar a la región caudal (Gadella, 2008a; Arenas *et al.*, 2010).

El colesterol es uno de los lípidos neutros que más relevancia tiene en la composición de la membrana plasmática y la relación entre la cantidad de este con los fosfolípidos es fundamental para la estabilidad de la membrana; no obstante, la

relación de estos compuestos en el espermatozoide porcino es relativamente menor, haciéndolo susceptible al choque térmico por bajas temperaturas (Estrada, 2014).

Las proteínas tienen funciones dinámicas de la membrana plasmática del espermatozoide. Participan en funciones como el transporte de calcio al interior de la célula (canales de calcio), que, resulta vital para la capacitación espermática como la hipermovilidad, reacción acrosomal y linealidad o progresión del movimiento espermático “movilidad progresiva” (Carlson *et al.*, 2003; Darszon *et al.*, 2006). La distribución de las proteínas en la membrana también cambia marcadamente entre el flagelo, pieza media y el acrosoma; con alto grado de polaridad, reportándose entre las proteínas específicas de la membrana espermática:  $\beta$ -1,4 galactosiltransferasa, fucosiltransferasa,  $\alpha$ -d-manosidasa, sp56, p95, entre otras (Gadella, 2008b).

### **2.3. MÉTODOS DE COLECCIÓN DE SEMEN PORCINO**

La técnica de la mano enguantada es la más utilizada por centros de transferencia genética, debido a la facilidad en el manejo y material que resulta básicamente económico, a su vez, garantiza que las características del semen sean las óptimas para su procesamiento (Estrada-Paqui y Martínez, 2017; Trujillo *et al.*, 2017). Para esta técnica es necesario que el verraco reciba un periodo de entrenamiento a partir de los 6 y 7 meses de edad, con la ayuda de una maniquí (Kubus, 2010). La técnica se basa en ejercer presión con la mano enguantada del operador sobre el glándulo del verraco, habrá el reflejo de eyaculación la cual tiene duración de 8 a 25 minutos (Hazel, 2005; Córdova *et al.*, 2015; Estrada-Paqui y Martínez, 2017).

El uso de material limpio y la preparación previo a la colección: colocación de bolsa con filtros de colección dentro del termo colector y guantes desechables de poliuretano o nitrilo (Trujillo *et al.*, 2017). Aunque también existen otros dos métodos de recogida de semen menos utilizados en la especie porcina: el método por vagina artificial que consiste en simular la vagina de la cerda, y se basa en ejercer presión

y una temperatura, es necesario contar con una cerda en estro que permita ser montada por el macho (Knox, 2016; Del Valle, 2017). El otro método es por electroeyaculador, el cual se desarrolló para aquellos verracos cuyo valor genético es valioso así como la edad, el peso o afecciones locomotoras les impiden la monta para la colección, este método consiste en ejercer estímulos eléctricos sobre los nervios pélvicos y las glándulas accesorias provocando la eyaculación, para esto se introduce por el recto del macho un ánodo debidamente lubricado y las descargas eléctricas se ejercen de manera gradual controladas (Espinosa 2002; Wolf y Smital, 2009; Córdova *et al.*, 2015).

## **2.4. ANALÍTICA SEMINAL**

La calidad del semen de cada verraco, considerando que tenga el potencial fecundante, está ligado a la calidad de sus espermatozoides, previo a su procesamiento (Sancho y Vilagran, 2013; Trujillo *et al.*, 2017).

### **2.4.1. Características macroscópicas**

El estudio macroscópico, es la primera evaluación después de la extracción y considera la evaluación de la temperatura, volumen, color, olor y pH (Sancho, 2002; Trujillo *et al.*, 2017).

#### **2.4.1.1. Temperatura**

La temperatura del eyaculado de verraco es de 36 a 37 °C (Espinosa, 2002; Estrada, 2014). Se determina con termómetro de inmersión o infrarrojo, se recomienda sacar la bolsa que contiene el eyaculado del termo colector para medir este parámetro seminal (Trujillo *et al.*, 2017).

#### **2.4.1.2. Volumen**

De acuerdo a la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco el volumen total oscila entre 150 a 500 mL; con respecto a la fracción rica en espermatozoides, el volumen normal oscila entre 50 y 150 mL (Estrada, 2014). Para evaluar esta característica se puede emplear probetas graduadas o balanza

analítica, se coloca la bolsa o vaso que contenga el semen sobre la plataforma y se hace la lectura (Gadea, 2001; Kubus, 2010).

#### **2.4.1.3. Color – olor**

Es variable conforme a la concentración espermática y la clasificación normal es blanco-transparente, blanco-lechoso y blanco-cremoso (Kubus, 2010; Córdova *et al.*, 2015). El color de la fracción rica o espermática es blanco-cremoso (Trujillo *et al.*, 2017). Pueden existir variaciones anormales que frecuentemente indican alteración; tonos rojizo, café o marrón significan presencia de sangre debido a lesión en uretra o replicación viral en el epidídimo (Sancho, 2002). Tonos verdosos o reflejos metálicos indican contaminación con tapioca oxidada (Chun-Xia y Zeng-Ming, 2000); y, los tonos amarillos indican contaminación por orina o esmegma (Espinosa, 2002).

#### **2.4.1.4. pH**

El semen se considera de un pH neutro y los valores normales varían de 6.98 a 7.8; para una evaluación cuantitativa con el potenciómetro (Gadea, 2001). O bien con uso de tiras reactivas, las cuales reportan si el pH es ácido, neutro o alcalino (Espinosa, 2002). El pH refleja el equilibrio entre los valores de las diferentes secreciones de las glándulas accesorias, principalmente la secreción de vesícula seminal alcalina y la secreción ácida prostática (Ariagno y Mormandi, 2016).

#### **2.4.2. Características microscópicas**

La evaluación microscópica incluye parámetros celulares – funcionales y del estado fisiológico – metabólico; los primeros, a través de ensayos para determinar la concentración, movilidad, morfología, viabilidad (integridad de la membrana plasmática) y tolerancia osmótica (Sancho, 2002; Gadea, 2001, Foxcroft *et al.*, 2008). Los parámetros del estado fisiológico – metabólico valoran la fluidez de membrana, integridad nuclear, estado de la vaina mitocondrial, niveles de compuestos oxígeno reactivos (ROS), integridad del acrosoma, así como niveles y actividad de diferentes metabolitos y enzimas (De Andrade, 2007; Bonet *et al.*, 2012;

Trujillo *et al.*, 2017). Para determinar todos estos parámetros es importante tener el conocimiento amplio de la fisiología del espermatozoide.

#### **2.4.2.1. Concentración espermática**

Generalmente el eyaculado de verraco contiene una concentración espermática de 300 a 600 millones/mL (Casas *et al.*, 2010), se puede realizar por diferentes métodos, cada uno con ventajas y limitantes, los más usuales son, cámaras de recuento celular (Bürker, Neubauer, Mackler y/o Thomas) que permiten determinar el número de espermatozoides en determinado volumen (Chun-Xia y Zeng-Ming, 2000; Kubus, 2010), Sin embargo, existen variaciones de 5 y 20% que estará determinado por la dilución y manejo de las cámaras de recuento (Knox, 2004; Christensen *et al.*, 2005). También, se tiene los métodos por colorímetro y espectrofotómetro, basados en la absorción de energía a través de la materia (semen diluido) transmitida por una fuente determinada de energía (Oshio *et al.*, 2004; Sancho y Vilagran, 2013). La absorbancia es proporcional a la concentración espermática; a mayor absorbancia, mayor concentración espermática y menor cantidad de luz llega al receptor (curva de calibrado); no obstante, su diseño es para medir soluciones y no suspensiones heterogéneas como es un eyaculado con presencia de restos celulares, aglutinación espermática, bacterias, tapioca, proteínas en plasma (Curi *et al.*, 2008; Toro-Montoya, 2009; Chenlo *et al.*, 2013).

La concentración también puede ser medida por un sistema informático “CASA” (Computer Assisted Sperm Analysis) y a través de los módulos que conforman el equipo, a su vez, permite evaluar diversos parámetros seminales más específicos como movilidad y calidad de movimiento, morfometría, integridad de las membranas, la fragmentación de ADN y evaluaciones con fluorocromos (Roca *et al.*, 2011; Valverde y Madrigal, 2018). Su uso suele ser limitado, debido a que solo aquellos laboratorios o centros de transferencia genética sofisticados tienen la capacidad de adquirirlo.

Por último, la concentración espermática también puede ser valorada por citometría de flujo, a través de dispersión de luz y fluorescencia, que, su vez ayudarán a determinar gran variedad de parámetros espermáticos específicos, de miles de células individuales en pocos minutos; debido a su velocidad, sensibilidad, objetividad y análisis multiparamétrico de medición, se considera el método de referencia; sin embargo, su uso es limitado a grandes laboratorios de investigación (Córdova *et al.*, 2016; Valverde y Madrigal, 2018).

#### **2.4.2.2. Movilidad espermática**

La estimación de la movilidad espermática indica la capacidad de movimiento de los espermatozoides, valorando la motilidad individual. El método más utilizado para determinar este parámetro debido a que resulta ser práctico, económico y rápido, es la observación directa bajo microscopía óptica de una muestra de semen (Johnson *et al.*, 2000; Quintero-Moreno *et al.*, 2004); se trata de una evaluación cuali-cuantitativa que estima la tasa de espermatozoides en movimiento general (0 a 100%) y la calidad (tipos) de movilidad (escala de 0 a 5). No obstante, es muy subjetivo y de gran variabilidad en los resultados, dependiendo del técnico que lo realiza (Ariagno y Mormandi, 2016). Aunque es un resultado subjetivo, se emplea en programas de inseminación artificial con valores aceptables de entre 70 a 90% (Espinosa, 2002).

El método estándar para evaluar la movilidad espermática ha sido y sigue siendo la clasificación objetiva y sofisticada que arroja el sistema automatizado CASA; al contar con un ordenador, cámara de video, microscopio óptico de contraste de fases (según el requerimiento de cada sistema) y un software; se basa en la captura de múltiples imágenes digitales con el movimiento individual del espermatozoide, calculando y clasificando su trayectoria en base a diferentes parámetros de movilidad definidos por el software (Curi *et al.*, 2008; Vyt *et al.*, 2008; Ariagno y Mormandi, 2016). Cada laboratorio utiliza un equipo diferente con técnicas distintas que dan lugar a resultados dispares, entre centros (Tejerina *et al.*, 2008; Ariagno *et al.*, 2011).



#### **2.4.2.3. Integridad de la membrana plasmática (Viabilidad espermática)**

La integridad de la membrana plasmática es un indicador de la viabilidad, la cual, es necesaria para mantener la función celular, la pérdida de continuidad (ruptura) de la membrana es asociada con la pérdida de viabilidad celular (muerte) (Sancho y Vilagran, 2013; Trujillo *et al.*, 2017). El eyaculado de verraco debe tener como mínimo aceptable un 85% de espermatozoides con membrana intacta para ser considerarse de buena calidad (Espinosa, 2002; Córdova *et al.*, 2015).

La viabilidad puede ser evaluada por diferentes métodos, dentro de los métodos convencionales están el uso de tinciones vitales como la de tripán azul y la eosina-nigrosina, bajo microscopia con luz convencional (Kvist y Bjorndahl, 2002; Trujillo *et al.*, 2017). Estos métodos se basan en que la membrana plasmática de los espermatozoides viables no es permeable a la tinción (espermatozoides blancos), mientras que los espermatozoides no viables se vuelven permeables, por consecuencia absorben la tinción, tornándose azules (tripán azul) y rozados a purpuras (eosina-nigrosina) (Espinosa, 2002; Sancho, 2002; Díaz *et al.*, 2009; Kubus, 2010). La eosina-nigrosina es la más utilizada por su factibilidad y costo, sin embargo, ha llegado a considerarse inadecuada con ciertos medios de dilución, que, a menudo interfieren con la tinción produciéndose resultados erróneos; por su parte, Tsakmakidis *et al.* (2010) reporta que los resultados de viabilidad obtenidos mediante eosina-nigrosina se correlacionan de manera positiva con la tasa de gestación en cerdas.

Por otro lado, nuevos procedimientos para la evaluación de la integridad de la membrana plasmática han sido reportados mediante el uso de las sondas fluorescentes como SYBR-14 y yoduro de propidio (PI), bajo microscopía de fluorescencia o citometría de flujo. Ambos fluorocromos actúan mediante la penetración de la membrana espermática, y evalúan la integridad de la membrana del espermatozoide, marcando las células viables y las bombas iónicas funcionales (Ramalho-Santos *et al.*, 2007; Estrada, 2014). Con esta combinación, el núcleo de los espermatozoides vivos se tiñe verde (SYBR-14), mientras las células

degeneradas, las cuales han perdido la integridad de su membrana, se excitan con el IP y se tiñen de rojo (Yeste *et al.*, 2009; Restrepo *et al.*, 2013).

#### **2.4.2.4. Tolerancia osmótica del espermatozoide (funcionalidad de membranas)**

Aunque el espermiograma parece contener información suficiente para predecir adecuadamente la fertilidad y permitir una buena estimación de la calidad seminal; por un lado, existen pruebas que nos indican la pérdida (ruptura) de la membrana plasmática (pérdida de viabilidad), pero una membrana plasmática intacta no siempre indica que la célula sea viable (Espinosa, 2002; Trujillo *et al.*, 2017). Ante esto, se han desarrollado nuevas técnicas con las cuales se ha adquirido un mejor conocimiento acerca de la célula espermática y tienen que ver con la funcionalidad de la membrana plasmática (Foxcroft *et al.*, 2008). El espermatozoide de verraco es muy sensible a cambios en el medio ambiente y su habilidad de responder al estrés osmótico está relacionado con la funcionalidad celular (Yeste *et al.*, 2010).

La prueba HOST (Hypoosmotic Swelling Test) evalúa la integridad y principalmente la funcionalidad del espermatozoide, asociada a su capacidad de penetración al óvulo; basada en someter al espermatozoide en un medio hiposmótico (102-120 mOsm) para medir de la habilidad de la membrana plasmática para transportar fluidos, si la membrana está intacta y bioquímicamente funcional el agua entrará en el espermatozoide para alcanzar el equilibrio osmótico, entonces, la membrana adquiere la suficiente elasticidad para adaptarse al cambio, originando un repentino incremento del volumen intracelular provocando un hinchamiento y como respuesta el espermatozoide manifestará enrollamiento del flagelo (Díaz *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2015). Se consideran valores aceptables por arriba del 60% de espermatozoides con respuesta de enrollamiento de flagelo (Estrada, 2014).

Por otro lado, existe la prueba de resistencia osmótica ORT (test de resistencia osmótica); consiste en valorar la capacidad del espermatozoide de resistir la incubación en dos medios, uno hipoosmótico (102 mOsm) y otro iso-osmótico (300

mOsm), la tolerancia espermática a los cambios de osmolaridad estará determinado por el porcentaje de alteraciones en el acrosoma (funcionalidad de membrana acrosomal) (Trujillo *et al.*, 2017). El acrosoma tiene un papel crucial en la fecundación al momento de penetrar el ovocito, lo cual sucede debido a cambios fisiológicos en el acrosoma (capacitación espermática y la reacción acrosomal); se consideran valores aceptables por arriba del 60% de espermatozoides con acrosoma integro para eyaculados de verraco destinados a programas de inseminación artificial (Yeste *et al.*, 2010; Bonet *et al.*, 2012).

Existen diversas tinciones que evalúan la integridad del acrosoma, por su parte, la tinción azul de coomassie es una técnica fácil y rápida basada en determinar el estado o alteración acrosomal. La tinción tiene gran afinidad por las proteínas uniéndose a grupos aminos libres, sulfhídricos libres o hidroxilos libres, entonces, las proteínas del acrosoma toman una coloración azul intensamente brillante, favoreciendo la valoración de la integridad de dicha estructura (Trujillo *et al.*, 2017). La técnica de tinción que se utilice será conforme a las estructuras que se deseen observar, ante esto, hay colorantes básicos y ácidos como la hematoxilina, eosina-verde, eosina-nigrosina, azul tripano y Giemsa, y wright que tiñen macromoléculas ácidas o alcalinas (Quintero-Moreno *et al.*, 2011).

## **2.5. CONSERVACIÓN DE SEMEN PORCINO**

El eyaculado porcino debe mantener los parámetros seminales óptimos para asegurar la fertilidad en las hembras. Para prolongar la supervivencia de los espermatozoides, su actividad metabólica se debe disminuir por inhibidores químicos y/o disminuyendo la temperatura; por lo tanto, el eyaculado necesita diluirse y conservarse después de la colección a una temperatura adecuada (Trujillo *et al.*, 2017; Cuenca y Avellaneda, 2017; López *et al.*, 2017). Existen diversos métodos de conservación, como conservación a 15 - 17 °C (fresco-diluido), criopreservación y enfriado a 5 °C; cada uno con sus respectivas limitantes y caracterizados por mantener durante un tiempo determinado, ya sea, periodos cortos o prolongados, sin embargo durante cualquier método de conservación

ocurre un efecto negativo al incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y como consecuencia la disminución en la movilidad y fertilidad (Estrada, 2014; Yeste, 2017; Flores *et al.*, 2018).

### **2.5.1. Semen diluido conservación a 15 - 17 °C**

La conservación de semen a 17°C es más utilizada en programas de IA , su uso logra una fertilidad a parto mayor del 85%, pero con la limitante de que la célula espermática solo se conserva viable de 3 a 5 días (Gadea, 2001). Aproximadamente, más del 90% de las inseminaciones en granjas porcinas del mundo, son realizadas con semen conservado a 17 °C (Torreta *et al.*, 2010).

Este método de conservación se basa en la dilución del eyaculado, inmediatamente después de haber sido recogido (Espinosa, 2002). La adición del medio de dilución en reemplazo del plasma seminal es necesario para mantener la integridad de la célula espermática, puede ser el medio para evitar una baja movilidad, acrosomas dañados, formas anormales, aglutinaciones espermáticas, proteicas y de sales, sin olvidar las contaminaciones; así como para aumentar el volumen del eyaculado, siendo fundamental para poder mantener los parámetros de fertilidad y prolificidad (Cuenca y Avellaneda, 2017; López *et al.*, 2017). No obstante, durante el procedimiento de manejo como la dilución y almacenamiento a bajas temperaturas de semen diluido pueden dañar la membrana espermática; afectando su funcionalidad (Waberski *et al.*, 2011).

La mayoría de los diluyentes disponibles en el mercado proporcionan una protección aceptable durante las primeras 72 horas de almacenamiento, aunque la movilidad y la fertilidad disminuyen cuando se almacena semen durante más de 4 días (Vyt *et al.*, 2004). Ante esto, Fraser y Strzezek. (2004), observaron una reducción del 50% en la movilidad espermática, disminuyó 53% la población de espermatozoides con membrana plasmática íntegra e incrementó 10% con fragmentación de ADN en un periodo de 96 horas de almacenamiento a 16 °C. Sin embargo, Casas y Althouse.

(2013), no observaron diferencias significativas en la movilidad de semen conservado a 17 °C en un periodo de almacenamiento de 0 y 24 horas

En cuanto a parámetros reproductivos en granjas comerciales de ciclo completo, la IA con semen conservado a 15-17 °C, ha destacado sobre los parámetros obtenidos con la monta natural obteniendo tasas de fertilidad hasta de un 85%, en cuanto a tamaño de camada de 12.5 y 10.5 lechones nacidos (Hernández *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2018). No obstante, la refrigeración prolongada es la causa principal de pérdida de movilidad y viabilidad espermática; en este contexto, Obando *et al.* (2012), reportaron tasas de fertilidad del 75% con semen de 24 horas conservado a 17 °C. Por su parte, Gómez-Rincón *et al.* (2009) obtuvieron fertilidad del 100% con semen conservado de 24 horas, en contraste, con semen conservado de 12 y 15 días la fertilidad fue de 76 y 53%, respectivamente. Esta tendencia también la observo Conejo-Nava *et al.* (2003) al evaluar semen conservado a 17 °C más de 5 días, observaron altos porcentajes de movilidad progresiva, pero, un incremento a partir del cuarto día en el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosómica; por lo que, al utilizar el semen para IA obtuvieron una disminución en la tasa de partos y tamaño de camada.

## **2.6. FACTORES QUE AFECTAN LA CALIDAD DEL EYACULADO**

El sistema endócrino y nervioso central tienen una participación importante dentro de la cascada hormonal de la reproducción del verraco y está regulado de manera exógena por estímulos externos como el medio ambiente, manejo, nutrición, entre otros, tienen influencia en la disponibilidad de los neurotransmisores y por los cuales repercuten en el ciclo espermatogénico influyendo en la fertilidad del verraco (figura 6) (Gadea *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2017). En centros de mejoramiento genético, el semen de un solo verraco es utilizado para inseminar alrededor de 1000 cerdas por año (Espinosa, 2002; Smital, 2009; Williams, 2013)



**Figura 6.** Factores que influyen sobre la producción de espermatozoides.

### 2.6.1. Raza o línea genética

La línea genética o raza afecta de forma directa ciertas características reproductivas del verraco, tales como, la pubertad (Hafez, 2002), el volumen de eyaculado (Audet *et al.*, 2004), la concentración espermática (Rocha *et al.*, 2005); de manera específica, se ha determinado que la raza tiene influencia sobre la cinética de movilidad (Wolf y Smital, 2009) y la capacidad de fecundación del espermatozoide de verraco (Knecht *et al.*, 2017). La línea genética explica del 18% al 22% de la variación total de la tasa de fertilidad y prolificidad de cerdas inseminadas (Broeckhuijse *et al.*, 2012).

Si bien, Knecht *et al.* (2014), demostraron que la raza Large White tiene mayor volumen con respecto a razas como Landrace y Duroc/Pietrain. Por su parte, Ramírez *et al.* (2000), reportaron que el volumen de eyaculado del cerdo de la raza pelón mexicano difirió significativamente con respecto a líneas comerciales existentes en México.

### 2.6.2. Edad y frecuencia de colección del verraco

Los verracos inician la pubertad entre los 7 y 9 meses de edad, simultáneamente inicia la etapa de entrenamiento cuando se destinarán para la IA, considerando un factor importante los intervalos de colección (Rocha *et al.*, 2005). Sin embargo, la interacción entre la edad y los intervalos de colección en los verracos varía de

acuerdo a las necesidades de los centros de inseminación (Gadea *et al.*, 2003; Henao *et al.*, 2004). Quintero-Moreno *et al.* (2009) observaron espermatozoides de verracos mayores a 18 meses presentan 20% menos de afección morfométricas de la cabeza, que, los provenientes de verracos jóvenes, es decir, estas características se correlacionan para determinar eyaculados de buena fertilidad. Por otro lado, Velázquez (2013), menciona que la concentración espermática se incrementa considerablemente a partir de los 7 a 8 meses y se mantiene hasta la etapa de adulto. En este contexto Díaz *et al.* (2009), reportaron que eyaculados provenientes de verracos mayores a tres años con respecto a verracos de 1 a 3 años, manifestaron un aumento significativo de gotas citoplasmáticas proximales y disminución de la viabilidad espermática.

En general se ha demostrado que intervalos demasiado largos entre colección, conducen al aumento de malformaciones y disminución de la calidad del eyaculado (Gadea *et al.*, 2003; Knecht *et al.*, 2017). En este sentido, Rocha *et al.* (2005), comprobaron que en verracos con edades de 12 y 24 meses se obtiene la mayor producción de dosis seminales a intervalos de colecta de 5 días. También, Wolf y Smital (2009) demostraron que la frecuencia de colecta con intervalos de 2 a 3 días disminuye la concentración espermática hasta 100 000 espermatozoides por mL.

### **2.6.3. Efecto nutricional**

El aporte nutricional al verraco con actividad reproductiva oscila 2.970 y 3.100 Mcal EM, 14 y 16% de proteína cruda, en cuanto a la lisina 0.7-0.8%, 6 a 9% de fibra aportados en 2.2 a 3.2 kg de alimento/día; dependiendo, de la línea genética, la actividad sexual, la época del año, la temperatura ambiente y sobre todo de la condición corporal (Contri *et al.*, 2011). La obesidad en los machos repercute considerablemente sobre la composición del semen, volumen total del eyaculado y aumentan considerablemente las malformaciones espermáticas (Velázquez, 2013).

Las deficiencias de energía, proteína, minerales o vitaminas tienen un efecto sobre la libido (Audet *et al.*, 2004), disminución en la producción de semen (López *et al.*,

2017) y degeneración testicular (Contri *et al.*, 2011). En cuanto al aumento de energía es el factor que más influye en el exceso de peso, problemas de aplomos y falta de libido, siendo las principales causas de reemplazo en verracos (Fuentes *et al.*, 2006). También, la disminución de la libido se asocia cuando existen niveles de inclusión bajos de proteína y energía; ya que, se relaciona la existencia de niveles plasmáticos de  $17 \beta$ -estradiol (López *et al.*, 2017).

En cuanto a las deficiencias de fibra en la dieta produce estreñimiento, fermentaciones anómalas y producción de toxinas, lo cual puede llegar a afectar el desarrollo normal de los espermatozoides al ser el epidídimo muy permeable (Quiles, 2008). Por otro lado, el aporte de aminoácidos como la lisina, metionina y triptófano resultan importantes, ya que, deficiencias de estos ocasionan cambios histológicos y citológicos en los testículos, afectando a la espermatogénesis (Fuentes *et al.*, 2006).

Es recomendable suplementar dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados como los ácidos linoleico, linolénico y araquidónico, ya que, son precursores de prostaglandinas esenciales para la reproducción y forman parte de los lípidos estructurales de la membrana plasmática de los espermatozoides, jugando un papel clave en la permeabilidad y el funcionamiento celular (Contri *et al.*, 2011).

Los microminerales como el zinc interviene en la producción de espermatozoides, en el desarrollo de las células de Leydig, en la respuesta a la hormona LH y en la formación de esteroides (Quiles, 2008). Las deficiencias en selenio provocan alteraciones en las mitocondrias de los espermatozoides, espermatozoides con menor viabilidad y ocasionan degeneración testicular (Audet *et al.*, 2004). El magnesio mejora la calidad del semen y el cobre forma parte de enzimas que intervienen activamente en la reproducción del verraco (Contri *et al.*, 2011).

En relación a las vitaminas, principalmente están la A, C, D3, E, K y biotina. La vitamina A, interviene en la formación y mantenimiento de tejido epitelial, tiene

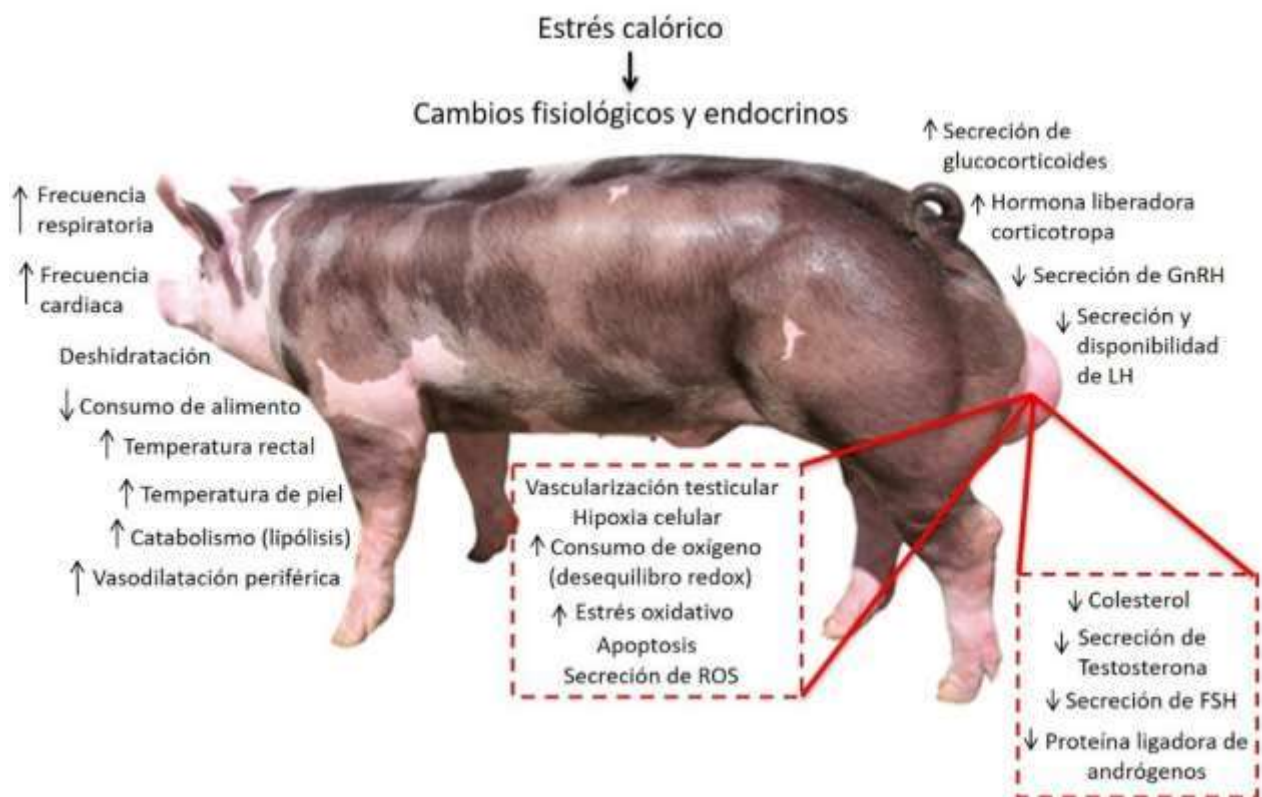


efecto positivo sobre la libido; su deficiencia da lugar a problemas reproductivos (Quiles y Hevia, 2007). La vitamina C actúa en el control de la oxidación, regenera la vitamina E; no obstante, ante situaciones de estrés por altas temperaturas es necesario un aporte extra (Fuentes *et al.*, 2006). La vitamina E influye directamente en la maduración espermática y mantiene la integridad de la membrana espermática, como antioxidante celular, evitando el deterioro de la peroxidasa sobre los fosfolípidos poliinsaturados de la membrana espermática; generalmente va acompañado del selenio mejorando la fertilidad del verraco y su déficit puede ocasionar a largo plazo una degeneración testicular. (Quiles, 2008; Contri *et al.*, 2011; López *et al.*, 2017).

#### **2.6.4. Efecto del medio ambiente**

La temperatura es el factor del medio ambiente que influye sobre la capacidad del verraco para mantener la temperatura corporal, no estresarse y enfermarse (Pallás y De Alba, 2006); el verraco pierde dicha capacidad cuando la temperatura ambiental sobrepasa su zona termoneutral o temperatura de confort que oscila entre los 18 a 22° C, con una humedad relativa ambiental del 60 a 70%; cuando esto sucede el verraco inicia un proceso de estrés calórico (Pallás, 2015; López *et al.*, 2017). Durante el estrés calórico el verraco sufre diversos cambios fisiológicos y endocrinos, los cuales están estrechamente relacionados con la eficiencia reproductiva (figura 7). Además, el verraco tiene poca capacidad para la sudoración ante elevadas temperaturas ambientales, disminuyendo así la capacidad de termorregulación de temperaturas en los tejidos del escroto y del testículo (Córdova, 2016). El aumento de 0.5 a 1 °C de temperatura en los testículos causa un desorden en la espermatogénesis (Castaño *et al.*, 2014). Al elevarse la temperatura testicular aumenta la actividad metabólica, para activar los mecanismos de pérdida de calor, hay vasodilatación por consecuencia degeneración del epitelio seminífero (Aitken y De Luliis, 2010). Endocrinológicamente, el principal mecanismo por medio del cual el estrés lleva a inadecuada calidad seminal se basa en la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la cual desencadena la cascada del estrés con acciones de tipo inhibitorio tanto a nivel testicular y a nivel central, con la inhibición de la hormona

estimuladora de las células intersticiales (ICSH) (Lozano, 2005; Ross *et al.*, 2015). También, las hormonas relacionadas con el estrés pueden influir en la función sexual en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas: en el Hipotálamo, a través de la CRH donde se inhibe la secreción de GnRH en la hipófisis disminuyendo la liberación de LH y FSH en respuesta a la inhibición de la GnRH y en las gónadas, alterando el efecto estimulador de las gonadotropinas (Pereira, 2005). De esta manera, se impide la producción de testosterona y la dihidrotestosterona ejercen a nivel de la espermatogénesis (Córdova, 2016).



**Figura 7.** Cambios fisiológicos y endocrinológicos durante el estrés calórico.

Durante la espermatogénesis, las espermátidas resultan sensibles como resultado en falla en la condensación de la cromatina nuclear, formación de vacuolas, cabezas de formas anormales, disposición de las mitocondrias en la parte central, o falta de adherencia entre las fibras de la cola del espermatozoide (Lipensky *et al.*, 2010). Efecto del estrés calóricos derivado del aumento de la temperatura ambiental en la calidad seminal del verraco entre la sexta y octava semana después del estrés

ambiental. Además, no solo el estrés térmico constante sino también las fluctuaciones de 10 °C (25 a 35 °C), así como una humedad superior al 90%, puede disminuir la producción de espermatozoides (Rocha *et al.*, 2005; Velázquez, 2013; Knecht *et al.*, 2014; Horký *et al.*, 2015). Aunque Henao *et al.* (2004), establecen que es posible que los verracos en trópico desarrollen respuesta de favorable de adaptación, lo que les permite la adecuada termorregulación testicular, favoreciendo la función de los túbulos seminíferos manteniendo la calidad seminal durante períodos prolongados de calor. En este contexto Horký *et al.* (2016) demostraron que verracos expuestos a temperaturas de 23 °C a 32 °C durante 120 días, afectaron significativamente algunos parámetros seminales, mostrando una disminución de 9% en la concentración espermática, disminución de 10% en la movilidad y un aumento en las anomalías espermáticas de 39% , del mismo modo, Lipenský *et al.* (2010), demostraron que el estrés calórico ambiental en verracos influyó significativamente en aparición de espermatozoides con anomalías del 19.4% a 25%.

## **2.7. EFECTOS DE LA DILUCIÓN Y CONSERVACIÓN A 15 - 17 °C SOBRE EL ESPERMATOZOIDE**

El eyaculado de verraco es diluido utilizando diluyentes comerciales de corta, media y larga duración para producir dosis seminales, conservadas de 15 y 17 °C (Trujillo *et al.*, 2017). Sin embargo, el diluyente no es capaz de prevenir totalmente los cambios que fisiológicos y bioquímicos en el espermatozoide y que afectan a su funcionalidad (Gadea, 2001). Es decir, durante la conservación del semen ocurren cambios estructurales y funcionales en el espermatozoide y la intensidad de este proceso puede estar influenciada por las condiciones y el tiempo de conservación, calidad del semen, grado de dilución y tipo de diluyente (Conejo-Nava *et al.*, 2003; Contri *et al.*, 2011; Gómez-Coronado, 2018).

En cuanto a las condiciones de conservación, la temperatura inferior a 14°C provoca alteraciones de la membrana espermática y temperaturas superiores a 20°C no logran minimizar el metabolismo espermático y tampoco inhiben el crecimiento

bacteriano, llevando a la disminución de la movilidad, daño acrosomal y aglutinaciones, así como una acidificación del medio (Córdova *et al.*, 2015). Por otro lado, una excesiva dilución produce disminución significativa de la viabilidad (Vyt *et al.*, 2004). En este contexto, dentro de los cambios en el espermatozoide esta la disminución en la movilidad, viabilidad, actividad mitocondrial y alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática (López *et al.*, 2017).

La conservación origina la pérdida de adenosín trifosfato (ATP) y adenosín monofosfato cíclico (AMPc), así como la reducción de calcio; por lo tanto, el espermatozoide disminuye la movilidad (Johnson *et al.*, 2000), lo cual se relaciona con la capacidad fecundante del espermatozoide (Hidalgo, 2013). Está documentado que el semen conservado durante 4 a 8 días aumenta la proporción de espermatozoides capacitados y con acrosoma reaccionado (Conejo-Nava *et al.*, 2003). La dilución y enfriamiento hacen que la membrana plasmática del espermatozoide aumente su fluidez y disminuya su permeabilidad selectiva permitiendo la entrada de moléculas capacitantes como iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), bicarbonato, albúmina o lipoproteínas de alta densidad procedentes del medio, induciendo así la capacitación espermática prematura por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y a su vez, aumento la fusión entre la membrana plasmática y membrana acrosomal externa (Hidalgo, 2013; Buriticá, 2016). Situación que deriva la cascada de acontecimientos que conllevan a una reacción acrosomal por entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , provocando aumento de  $\text{Na}^{+}$  intracelular y la salida de  $\text{H}^{+}$ , como consecuencia el pH intraacrosomal, activando enzimas necesarias para el proceso de fecundación (Ríos *et al.*, 2010).

Los mecanismos moleculares responsables del deterioro espermático durante la conservación en refrigeración a largo plazo se deben principalmente a las especies reactivas de oxígeno (ROS), produciendo estrés oxidativo por el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática del espermatozoide y la fase lipídica de la membrana puede ser dañada (Aitken *et al.*, 2010; Yeste, 2017).

La capacitación prematura del espermatozoide también es consecuencia del enfriamiento y producción de ROS (Radomil *et al.*, 2011).

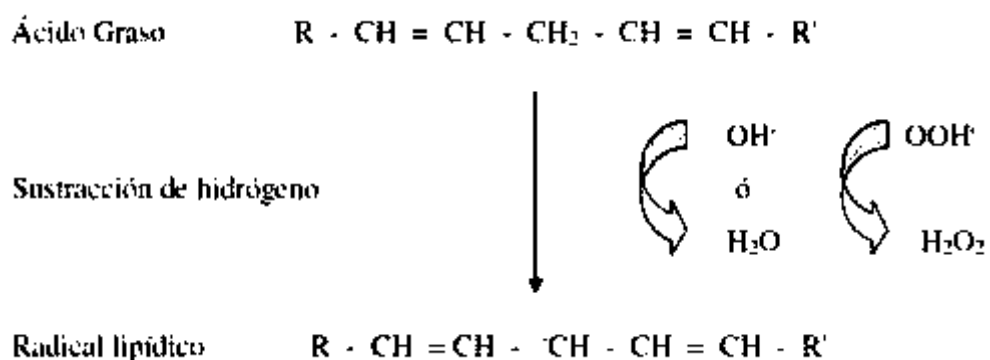
## **2.8. ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA CONSERVACIÓN DE SEMEN A 15 - 17 °C**

El estrés oxidativo es un desequilibrio ocasionado por la producción excesiva de radicales libres, los cuales exceden la capacidad antioxidante de un organismo o por una disminución en la respuesta homeostática de las células o tejidos, provocando daño oxidativo (Olguín *et al.*, 2004; Mata-Campuzano *et al.*, 2012). En relación a los espermatozoides está asociado al daño que pueden sufrir en la integridad de los componentes estructurales y fisiológicos provocado por la formación de ROS o moléculas que contienen radicales libres (Venéreo, 2002; Gogol *et al.*, 2009). Es importante mencionar que los mecanismos oxidativos juegan papel clave en el control fisiológico de las funciones espermáticas; ya que pequeñas cantidades de ROS están involucradas en la capacitación y los procesos de hiperactivación movilidad y cambios en cinética de los espermatozoides; sin embargo, cuando se producen en exceso durante la conservación son altamente tóxicos para el espermatozoide (Michael *et al.*, 2010).

La producción de los ROS se forma cuando se rompe un enlace covalente entre moléculas y un electrón queda con cada átomo recién formado; entonces los ROS contienen dos electrones no apareados en su capa exterior (Buonocore *et al.*, 2010). Los radicales libres son altamente reactivos e inestables, sólo son estables cuando sustraen electrones de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos o cualquier molécula cercana, de este modo la cascada de daños en la célula (Córdova *et al.*, 2010; Mata-Campuzano *et al.*, 2012). Los ROS más comunes son: el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $OH^*$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Siendo el  $OH^*$  extremadamente inestable y altamente reactivo, ataca la mayoría de los componentes celulares y su presencia en el ambiente espermático se relaciona con el aumento de espermatozoides muertos (Maia *et al.*, 2010; Dickinson y Chang, 2011; Hidalgo, 2013). Cabe destacar que el  $O_2^-$  es requerido en

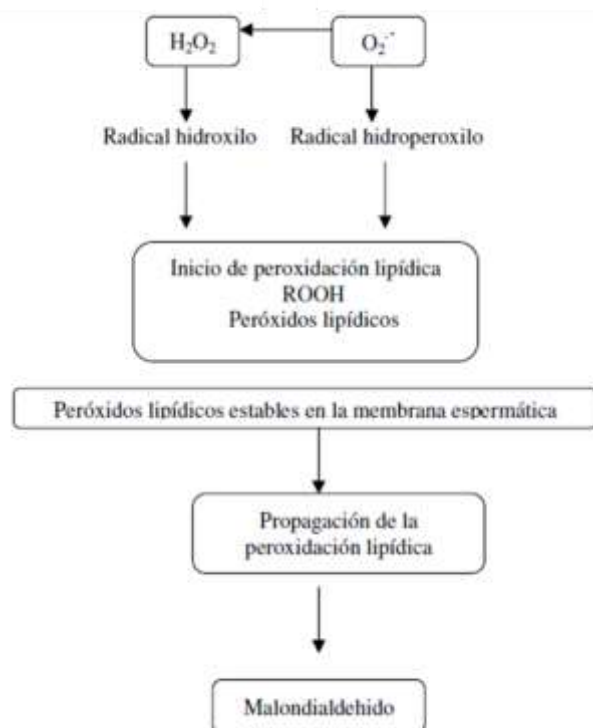
pequeñas proporciones por el espermatozoide para el desarrollo de las funciones; los sitios productores del ROS son la membrana plasmática y especialmente las mitocondrias, debido a la actividad metabólica normal desarrollada en las mitocondrias (Froman y Feltmann, 2010; Estrada, 2014).

Está documentado que las formas maduras como inmaduras de espermatozoides producen ROS, principalmente espermatozoides con citoplasma “gotas citoplasmáticas”; también, espermatozoides muertos durante la conservación liberan aminoácido-oxidasa (Mahfouz *et al.*, 2010). El estrés oxidativo ocasiona daños significativos en el espermatozoide debido a la peroxidación lipídica inducida por ROS; ya que, el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática de los espermatozoides de verraco los hace sensibles (Buhr *et al.*, 2001; Mata-Campuzano *et al.*, 2012; Guthrie y Welch, 2012). Los ácidos grasos poliinsaturados son susceptibles a experimentar proceso oxidativo por la presencia de enlaces dobles que debilita la unión C-H en los átomos de carbono adyacentes y facilita la sustracción de hidrógeno (figura 8) de esta manera se produce la formación de una radical orgánico y puede ocurrir en cualquier parte de la cadena de los ácidos grasos poliinsaturados (fase de iniciación); la pérdida del DHA de la membrana probablemente sea el resultado del desbalance de estos ácidos grasos (Aitken y De Lullis, 2010; Yeste, 2017).



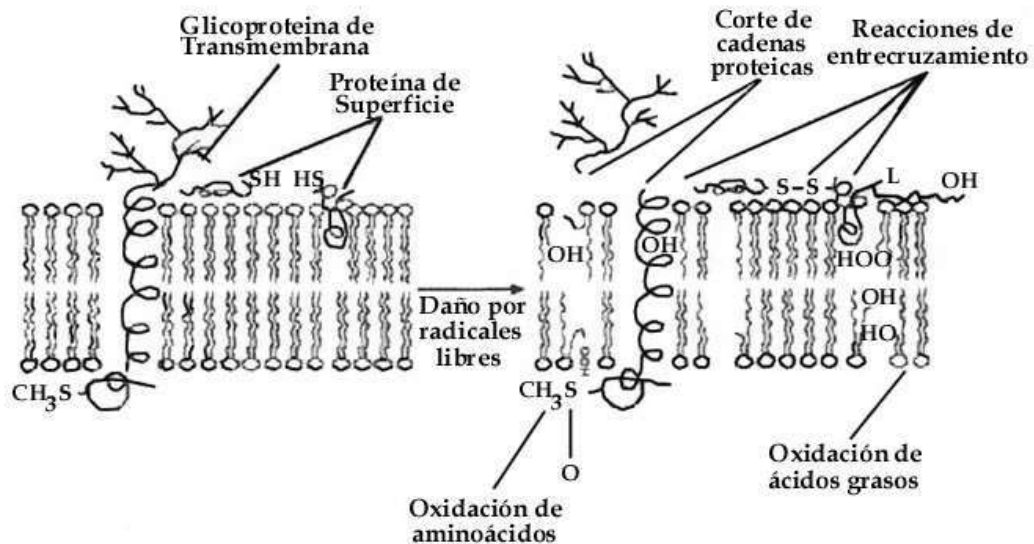
**Figura 8.** Inicio de la peroxidación lipídica en relación a la sustracción de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (Hidalgo, 2013).

Los principales iniciadores de la peroxidación lipídica son los  $\text{OH}^\bullet$ , que se genera a partir de la reacción del  $\text{Fe}^+$  con el  $\text{O}_2^-$ . Posteriormente el inicio la fase de propagación, donde, el radical orgánico sufre reacciones de combinaciones y en adición con el oxígeno se generan radicales peroxilo orgánicos (ROO); estos radicales, tiene la capacidad de captar un átomo de hidrógeno formando el hidroperóxido (ROOH) (Guthrie y Welch, 2012). Los productos finales de la peroxidación lipídica son lípidos peroxidados que al degradarse, originan nuevos radicales libres y compuestos citotóxicos, como los aldehídos (4-hidroxi-2-nonenal y malondialdehído “MDA”) (figura 9); ante esto, se pierde el 60% de los ácidos grasos de la membrana plasmática del espermatozoide, originando decremento de la funcionalidad en la integridad, la cohesión, fluidez, permeabilidad y su función metabólica, produciéndose la muerte del espermatozoide (Michael *et al.*, 2010; Mahfouz *et al.*, 2010). En conjunto lleva la disminución de la movilidad, viabilidad y una pérdida en la capacidad de fusión espermatozoide – óvulo



**Figura 9.** Representación esquemática de la peroxidación lipídica (Guthrie y Welch, 2012)

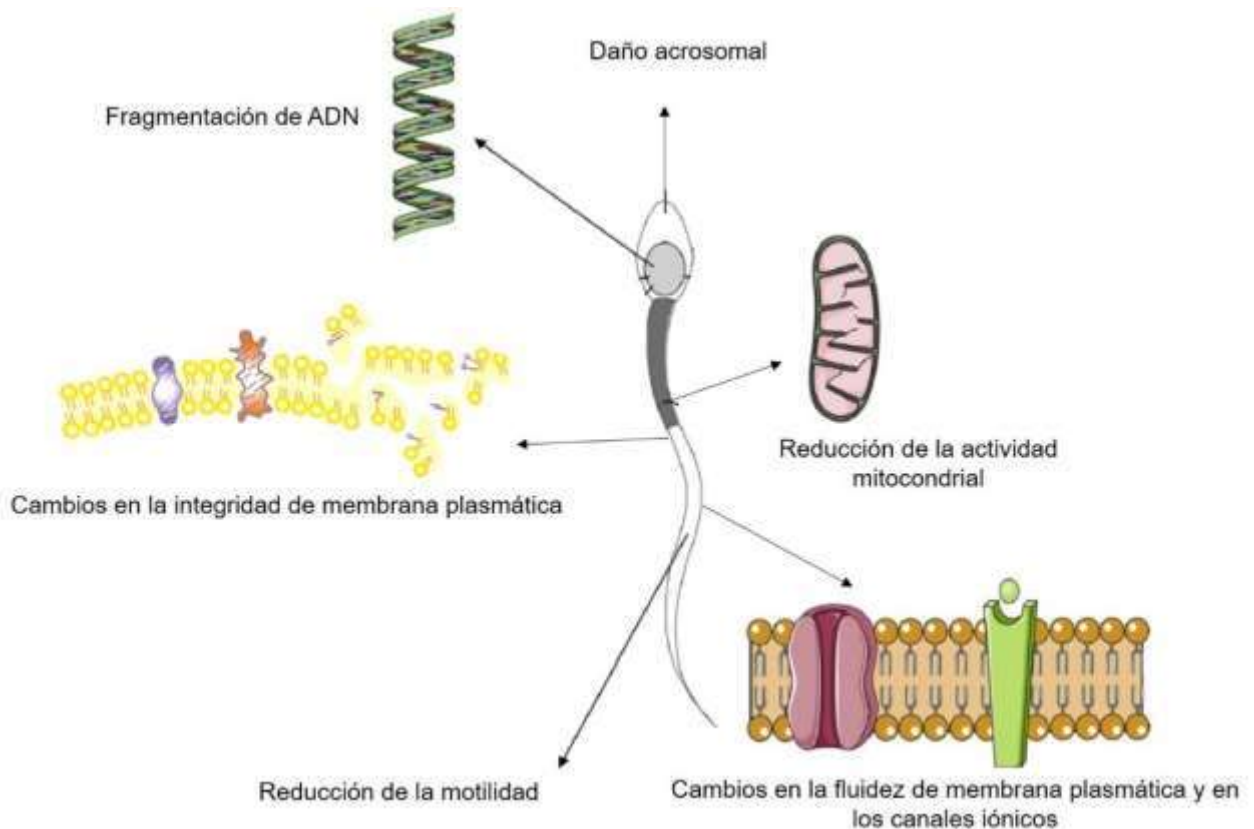
La oxidación de los lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos del espermatozoide provoca acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, citotoxicidad y apoptosis, El daño de los ROS a las proteínas de la membrana causa pérdida de su actividad catalítica de enzimas, daños en la integridad de proteínas estructurales o interrupción en la regulación de las vías metabólicas del espermatozoide (figura 10). Los productos del daño oxidativo de proteínas son la formación de peróxidos y carbonilos (Cárdenas y Pedraza, 2006; Aitken y De Luliis, 2010). Una de las proteínas más estudiadas es el transportador específico de glucosa, la cual, de manera normal está distribuida homogéneamente sobre la membrana acrosomal y en la pieza principal de la cola; sin embargo, durante el enfriamiento se ha podido observar solo en la zona apical del acrosoma y en la pieza principal, dicha alteración, modifica la capacidad del espermatozoide para metabolizar los azúcares, por lo tanto, la eficiencia energética, en general todos estos eventos llevan a la baja fertilidad de las dosis de semen conservado (Córdova, 2010; Yeste, 2017). (Casas *et al.*, 2009).



**Figura 10.** Daño de la membrana plasmática del espermatozoide por la producción de ROS (Cárdenas y Pedraza, 2006)



En cuanto al daño en el ADN espermático causa delección, mutaciones y otros efectos letales; esto se traduce en un pobre desarrollo embrionario y abortos en hembras inseminadas; (Córdova, 2016; Bathgate, 2011). Por su localización el ADN se encuentra expuesto a un flujo constante y elevado de ROS procedente de la cadena respiratoria, además carece de histonas en su estructura, lo cual le resta estabilidad (Yeste, 2017). Los ROS dañan al ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa, causando fragmentación de ADN, ocasionando con ello, problemas de compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina, la cual juega un papel importante en la regulación de la transcripción genética (figura 11) (Maia *et al.*, 2010).



**Figura 11.** Daños al espermatozoide causados por ROS (modificado de Yeste, 2017).

La medición de la producción de malondialdehído (MDA) refleja la peroxidación de los fosfolípidos poliinsaturados, principal componente de la membrana de los

espermatozoides; ante esto, Kumaresan *et al.* (2009) observaron que los niveles del MDA se incrementaron significativamente durante la conservación de semen de verraco a 18°C, el nivel de este compuesto citotóxico aumento 9 veces, así mismo, la movilidad espermática mostro reducción del 50%. Por su parte, Kadirvel *et al.* (2009) observaron que los niveles de ROS intracelular se correlacionan negativamente con la movilidad espermática, durante la conservación de semen refrigerado. En este sentido, Lee y Park (2015) reportan que la proporción de espermatozoides de verraco con alto nivel intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumento significativamente a partir de cuarto día de conservación a 17 °C.

## **2.9. ADICIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA CONSERVACIÓN DE SEMEN**

Los antioxidantes son moléculas que previenen la formación de radicales libres o inhiben sus reacciones; su función es donar electrones para evitar una reacción en cadena de óxido-reducción de moléculas como lípidos, proteínas, ADN (Membrillo *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2006) y se clasifican en antioxidante enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y la peroxidasa; y no enzimáticos como el glutatión reducido (GSH), al  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y el butirato de hidroxitolueno (Bathgate, 2011). Los espermatozoides por su paso por el epidídimo están protegidos por enzimas con acción antioxidante como la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa y catalasa (Membrillo *et al.*, 2003); no obstante, su defensa antioxidante durante la conservación resulta relativamente débil. Ante esto, la inclusión de compuestos con capacidad antioxidante ha mejorado la viabilidad y la capacidad fecundante de los espermatozoides (Gadea *et al.*, 2005; Breininger *et al.*, 2005; Barranco *et al.*, 2015).

Los antioxidantes enzimáticos catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hacia los radicales libres. Los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para ser nuevamente activos (Santiani, 2012). La enzima superóxido dismutasa actúa sobre el O<sub>2</sub><sup>-</sup>, de esta manera protege a las células de la toxicidad inducida por el O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Sin embargo, la enzima tiene un corto

tiempo de vida y debido a su alto peso molecular no es capaz de penetrar las membranas celulares (Wilcox, 2010).

Los principales antioxidantes no enzimáticos son la vitamina A, C, E y el glutatión reducido (GSH) (Córdova, 2010). La vitamina C es una molécula hidrosoluble y es el antioxidante más importante en los líquidos extracelulares, reacciona de forma directa con los radicales libres superóxidos, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos (Chihuilaf *et al.*, 2002); protege al ADN y proteínas de los espermatozoides contra el daño oxidativo y contra la peroxidación a los lípidos (Santiani, 2012). Está documentado que añadida al diluyente de conservación en forma de ácido ascórbico tiene efectos protectores, dependiendo de la concentración utilizada; en este sentido Hu *et al.* (2010), demostraron que una concentración de 4.5 mg/mL de ácido ascórbico aumenta los parámetros de movilidad, acrosoma y membrana plasmática intacta en espermatozoides criopreservados, mientras que un incremento hasta 8.5 mg/mL provoca una disminución significativa de la movilidad espermática.

La vitamina E como  $\alpha$ -tocoferol, tiene propiedades antioxidantes en las membranas celulares, debido a la eliminación de hidrógeno y funciona como donador de electrones (Oldfield, 2003). Además, captura radicales libres superóxido, hidroxilo y peróxidos lipídicos en las membranas celulares, también detiene la lipoperoxidación. La vitamina E es considerada como el principal componente del sistema antioxidante de los espermatozoides y es uno de los mejores protectores de membranas con ROS y la peroxidación lipídica (Yousef *et al.*, 2003; Córdova *et al.*, 2010)

Respecto al GSH es un agente antioxidante que está presente en el ambiente que rodea al espermatozoide y liga los ROS (Blokhina *et al.*, 2003). Su forma reducida "GSH" es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y es el más abundante en las células de mamíferos (Membrillo *et al.*, 2003). El GSH se

encuentra en pequeña concentración en el semen y proporciona defensa intracelular a los espermatozoides contra el estrés oxidativo (Gadea *et al.*, 2004).

Sus propiedades químicas le permiten actuar frente a numerosos compuestos oxidantes, tales como, peróxido de hidrógeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas del carbono; además, reduce el radical libre tocoferoxilo y dehidroascorbato y los reconvierte a su forma original (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004). Por lo tanto, actúa como un mecanismo de defensa contra la peroxidación lipídica causado por ROS (Bucak *et al.*, 2010). Su adición a los medios de criopreservación ha demostrado mejorar la movilidad, la integridad de la membrana y la capacidad de fertilización de los espermatozoides de verraco en el enfriamiento, criopreservación y descongelación (Estrada *et al.*, 2017). En este contexto, se ha observado que la adición de GSH mantiene la distribución normal de los puentes disulfuros y el equilibrio redox intracelular en diversas especies (Brewer *et al.*, 2003; Jacob *et al.*, 2003).

Por su parte, Gadea *et al.* (2004) demostraron efectos positivos al añadir GSH al medio de descongelación, mejorando la viabilidad, la proporción de espermatozoides sin signos de capacitación prematura, la condensación de la cromatina y mejorando la tasa de fecundación *in vitro*. También, Córdova. (2010) demostró que el GSH adicionado al diluyente de conservación a 17 °C, mejoró las características espermáticas durante 5 días de almacenamiento, en cuanto a movilidad total, integridad de membrana y en acrosoma íntegro, esto en relación al tratamiento que no contenía GSH.

En este contexto, la información documentada hasta ahora, indica que la adición de GSH al medio de conservación a 17 °C tiene efectos positivos en los parámetros seminales del verraco.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. General**

Evaluar el efecto del Glutati3n reducido (GSH) sobre la calidad esperm3tica de verraco bajo condiciones de tr3pico subh3medo.

#### **3.2. Espec3fico**

- a) Evaluar dos concentraciones de GSH (1 y 2 mM) como suplemento en el diluyente de conservaci3n a 17 °C y su efecto en la integridad de la membrana plasm3tica, movilidad total, tolerancia osm3tica e integridad acrosomal del espermatozoide de verraco.

#### **IV. HIPÓTESIS**

La adición de GSH al medio de dilución mejorara la movilidad total, integridad de la membrana plasmática, la tolerancia osmótica e integridad acrosomal del espermatozoide conservado a 17 ° C por 96 horas.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Ubicación del área de estudio

La presente investigación se realizó en el centro de transferencia genética (CTG) y laboratorio de reproducción porcina de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 1 de la Universidad Autónoma de Guerrero; ubicada en la región Tierra Caliente del Estado de Guerrero, la cual cuenta con clima de trópico subhúmedo, con temperatura mínima de 34 °C y máxima que supera los 40 °C, una precipitación promedio de 600 mm anuales y la humedad relativa mínima de 25% y máxima hasta un 50% (INEGI, 2017).

### 5.2. Animales experimentales

Se utilizaron 4 verracos de líneas comerciales Yorkshire/Landrace y Pietrain/Duroc entre 24 y 28 meses de edad, alojados en corrales individuales de 10 m<sup>2</sup>, sin clima controlado y piso de concreto, recibieron 2 kg de alimento comercial por día (14% de PC y 3.1 Mcal de energía) y agua a libre acceso. Actualmente cuentan con análisis serológicos por ELISA y PCR con estatus negativo al síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS).

### 5.3. Obtención del eyaculado

Se utilizaron 40 eyaculados provenientes de los 4 verracos (10 réplicas por verraco), se colectaron a intervalos de 7 días por la técnica de mano enguantada de acuerdo a la descrita por Trujillo *et al.* (2017) y se colectó la fracción rica (100 mL). Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de cada eyaculado, previo a su dilución para determinar los valores de referencia (Cuadro 1).

### 5.4. Analítica seminal convencional

#### 5.4.1. Análisis macroscópico

**Volumen:** se midió en bolsa de colección comercial graduada posterior a la colección del eyaculado (Trujillo *et al.*, 2017).

**Temperatura del eyaculado:** se obtuvo por medio de un termómetro de alcohol con un rango de temperatura de -20 a 110 °C (Trujillo *et al.*, 2017).

#### **5.4.2. Análisis microscópico**

**Movilidad total:** se analizó de acuerdo a la técnica adaptada por Estrada *et al.* (2014); se agregó 10µL de semen en un portaobjetos se colocó un cubreobjetos (ambos temperados a 37 °C), se observó en microscopio óptico con el objetivo 10x y el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides con movilidad.

**Concentración espermática:** se evaluó en la cámara de Neubauer, brevemente se diluyó el semen 1:200 en solución formolada al 2.9%, se realizó el conteo espermático en la cámara, el resultado se multiplicó por el factor de dilución y se obtuvo el número de espermatozoides por mililitro (Estrada *et al.*, 2014).

**Viabilidad:** en un portaobjetos atemperado a 37 °C se mezclaron 10 µL de semen con 10 µL de eosina-nigrosina, se realizó un frotis convencional y se evaluó en microscopio óptico bajo el objetivo de inmersión 100x. Los espermatozoides muertos se tiñeron intensamente (rosa o morado) y los vivos presentaban un color blanco tenue debido a la integridad de membrana; el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides vivos y muertos en 2 réplicas de 100 espermatozoides cada uno (Bonet *et al.*, 2006).

**Morfología:** se valoró de acuerdo a la metodología adaptada por Estrada *et al.* (2014). Se colocaron 10 µL de semen en un portaobjetos y se mezclaron con 10 µL de la tinción rosa de bengala, se realizó un frotis convencional y se evaluó en microscopía óptica de luz convencional. Se evaluaron los espermatozoides con formas anormales primarias (cabeza) y secundarias (flagelo); el resultado se expresó en porcentaje de anomalías totales en 2 réplicas.



**Cuadro 1.** Valores de referencia en la analítica seminal del verraco antes de la dilución (n=40).

Parámetro	Promedio ± EE
Temperatura (°C)	37.4 ± 0.02
Volumen (ml) (porción rica)	120.5 ± 1.52
Movilidad total (%)	85.3 ± 1.80
Concentración/ml (x10 <sup>6</sup> )	835.29 ± 32.51
Morfología anormal (%)	5 ± 0.31
Viabilidad (%)	85.2 ± 0.6

EE: error estándar

## 5.5. Procedimiento experimental

### 5.5.1. Dilución de eyaculados y adición de GSH

El eyaculado fue diluido 1:10 con 2000 x10<sup>6</sup> (espermatozoides viables), se utilizó L - Glutación Reducido (GSH C10H17N3O6, Sigma-Aldrich®) (1 y 2 mM) adicionado al diluyente comercial de media duración (MILL®). Los tubos se almacenaron a 16 - 17 °C y se evaluaron las variables de estudio cada 24 horas durante 96 horas (4 días) (Fig. 12).

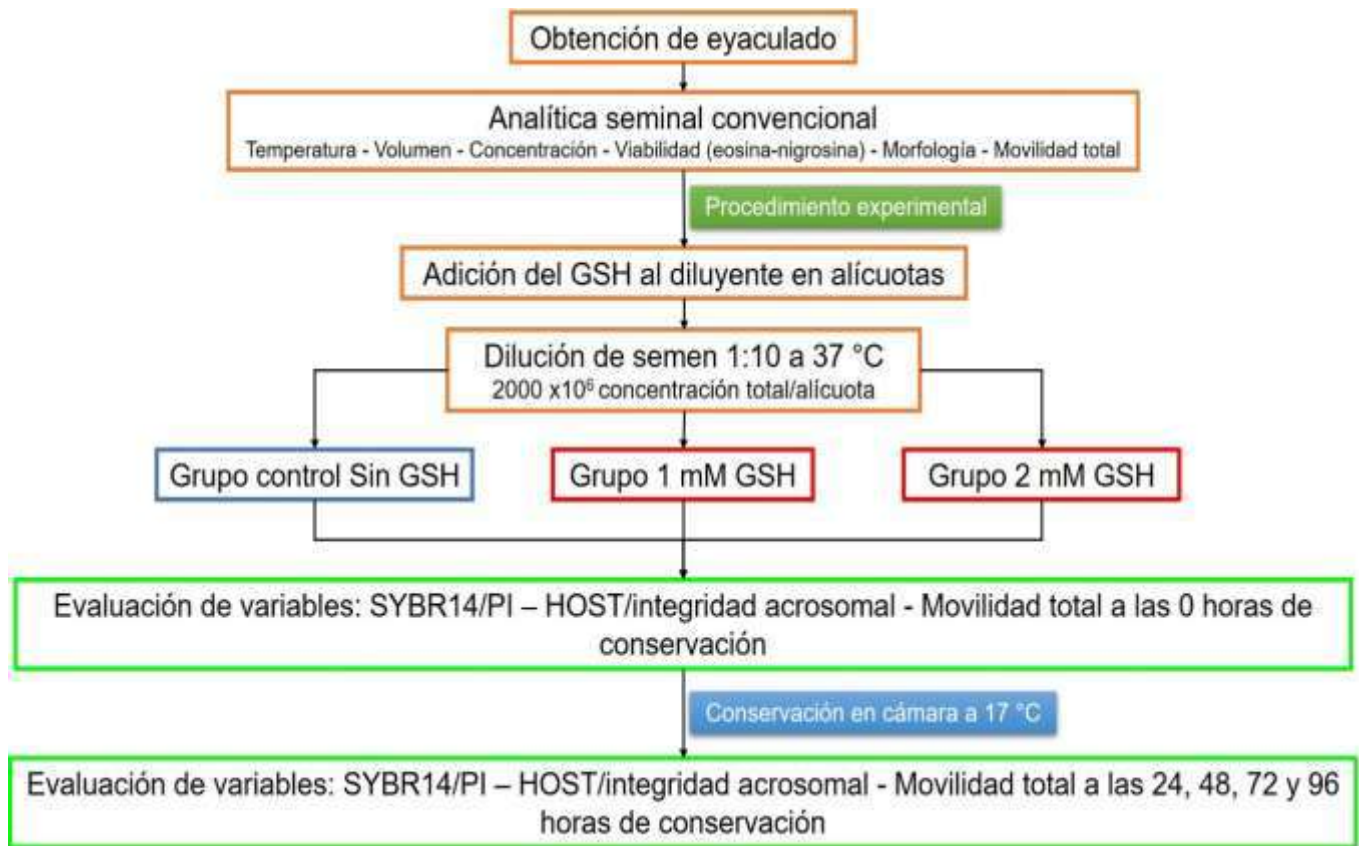


**Figura 12.** A: Glutación reducido; B: alícuotas de eyaculado; C: cámara de conservación.

## 5.6. Grupos experimentales

Se llevó a cabo un diseño longitudinal en medidas repetidas (Wu *et al.*, 1999). El diseño de tratamientos consistió en tres niveles de concentración de GSH: 1 mM y

2 mM, y un grupo control sin GSH. El número de unidades experimentales fueron 40 eyaculados y las mediciones se realizaron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. El protocolo completo desde la obtención del eyaculado hasta las evaluaciones seminales se sintetiza en la figura 13.

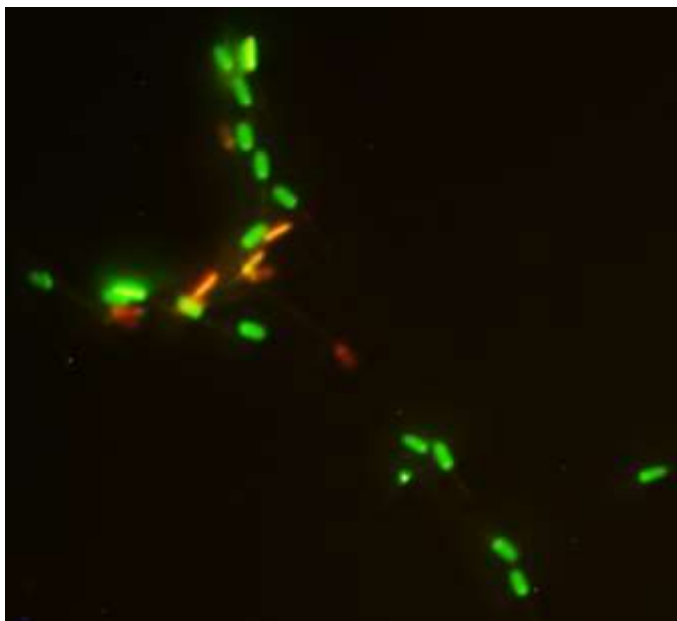


**Figura 13.** Procedimiento experimental para la evaluación del GSH sobre la calidad espermática de semen de verraco.

## 5.7. Variables de estudio

### 5.7.1. Integridad de la membrana plasmática (Viabilidad)

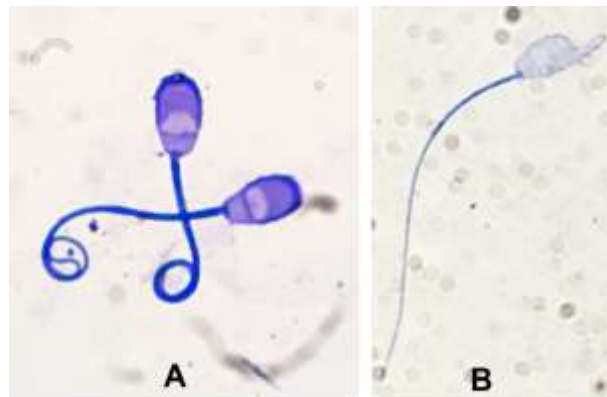
Se analizó mediante la sonda de inmunofluorescencia SYBR-14/PI (LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit (L7011), *Invitrogen* by Thermo Fisher Scientific) bajo microscopio de epifluorescencia, de acuerdo al protocolo descrito por Gardner y Johnson (1995), se alicuotó 50  $\mu\text{L}$  de cada tratamiento en 450  $\mu\text{L}$  de Fosfato Buffer Salino 1x (PBS P4417 Sigma-Aldrich®), se adicionaron 0.5  $\mu\text{L}$  del fluorocromo SYBR-14 (100 nM concentración final) y se incubaron en oscuridad a 38°C durante 10 minutos, posteriormente, se adicionaron 2.5  $\mu\text{L}$  del fluorocromo Ioduro de Propidio (PI) (10  $\mu\text{M}$  concentración final) y se incubaron en oscuridad a 38°C durante 5 minutos. Después 10  $\mu\text{L}$  de cada alícuota se depositaron en portaobjetos, se observó al microscopio con el objetivo 20x y el filtro 1-DAPI/azul. Se clasificaron dos poblaciones espermáticas, en base a la coloración, los espermatozoides viables con membrana plasmática intacta se tiñeron con fluorescencia verde, mientras que los espermatozoides con membrana plasmática dañada (muertos) tomaron una coloración de roja (figura 14). Se contaron 200 espermatozoides y se expresó en porcentaje.



**Figura 14.** Integridad de membrana plasmática por SYBR14/PI

### 5.7.2. Ensayo dual de resistencia osmótica (HOST) / integridad acrosomal (Azul de coomassie)

Se realizó por medio de la metodología adaptada por Schilling *et al.* (1986). Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de semen en 400  $\mu\text{L}$  del medio hipotónico HOST (150 mOsm), se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de la muestra y se realizó frotis convencional, se fijó con paraformaldehído al 4% por 15 minutos y se sumergió en una solución azul de Coomassie (0,22 %) por 3 minutos . El frotis se evaluó en microscopio óptico bajo el objetivo de inmersión (100x). En la valoración los espermatozoides con membrana funcional buscan controlar su osmolaridad y al estar en un medio hiposmótico reaccionaron enrollando el flagelo, por lo que espermatozoides con flagelo enrollado, se consideraron viables y funcionales. La tinción de azul de Coomassie es una tinción con gran afinidad por las proteínas, por lo cual las proteínas acrosomales toman una coloración muy intensa, favoreciendo la valoración de la integridad. Se contaron 200 células y el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides con flagelo enrollado (membrana funcional) e integridad acrosomal (figura 15).



**Figura 15. A:** espermatozoides con membrana funcional e integridad acrosomal; **B:** espermatozoide con membrana no funcional y acrosoma dañado

### **5.7.3. Movilidad total**

Se valoró de acuerdo a la técnica descrita por Estrada *et al.* (2014) en donde se alicuotaron 500  $\mu$ L de cada tratamiento y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, se tomaron 10  $\mu$ L y se depositaron en un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos (ambos atemperados a 37 °C), se observó bajo microscopio óptico de luz convencional, el resultado se expresó en porcentaje de acuerdo a la movilidad total observada. Se realizó por duplicado en cada tratamiento.

### **5.8. Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño factorial 3 x 4 x 5 (3 concentraciones de GSH: 0, 1 y 2 mM; 4 variables: Movilidad total, integridad de membrana plasmática, integridad acrosomal y tolerancia osmótica. 5 mediciones de conservación: 0, 24, 48, 72 y 96); los datos obtenidos se analizaron a través de mediciones repetidas de modelo de efectos fijos y las diferencias entre tratamientos se obtuvieron a través de medias de mínimos cuadrados y significancia de  $P < 0.05$  (Littel *et al.*, 1998).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los promedios por tratamiento obtenidos en la presente investigación indican que la suplementación de GSH al medio de dilución mejoró ( $P < 0.05$ ) los parámetros seminales durante la conservación a 17 °C (cuadro 2), principalmente movilidad total y la integridad de membrana plasmática evaluada por SYBR-14/PI. La integridad de membrana plasmática del espermatozoide de verraco suplementado con GSH 2 mM fue 88.0% y con GSH 1 mM de 87.3%, no observando diferencia entre concentraciones de GSH, pero si con el grupo control con 85.2% ( $P < 0.05$ ). Con respecto a la movilidad total, la adición de GSH a 2 mM fue 58.9% y para GSH 1 mM de 56.9%, mostrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo control de 52.0%; apreciando que existe una diferencia de 5.9% a favor de los tratamientos con GSH. En el caso de las medias en la integridad del acrosoma y tolerancia osmótica no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos con GSH y sin adición de GSH.

**Cuadro 2.** Efecto del uso de GSH sobre la calidad de semen de verraco diluido conservado a 17 °C en el trópico subhúmedo ( $n = 40$ ).

Tratamiento	Integridad de membrana SYBR-14/PI (%)	Movilidad total (%)	Integridad acrosomal (%)	Tolerancia osmótica (%)
Control	85.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	52.0 ± 1.6 <sup>a</sup>	51.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	54.7 ± 1.4 <sup>a</sup>
1 mM	87.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	56.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	49.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	54.6 ± 1.4 <sup>a</sup>
2 mM	88.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	58.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	53.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	54.8 ± 1.4 <sup>a</sup>

*Literales en columnas a, b indican diferencias ( $P < 0.05$ ).*

*Media ± Error estándar*

En apoyo a lo anterior Vongpralub *et al.* (2016), recomienda la adición de una dosis de 1 mM de GSH como un componente alternativo del diluyente de semen de verraco para mejorar la movilidad durante el almacenamiento a 17 °C. En contraste, estos resultados fueron inferiores a los reportados por Zhang *et al.* (2016), quienes obtuvieron una movilidad total con 1 mM de GSH de 73.6%.

En cuanto a la variable integridad de la membrana plasmática, estos resultados concuerdan parcialmente con Zhang *et al.* (2016), quienes al probar cuatro concentraciones de GSH (1, 5, 10 y 15 mM), obtuvieron mejores resultados ( $P < 0.05$ ) con la adición de 1 mM (66.81%) con respecto a las concentraciones superiores (62.87%, 59.74% y 57.37%, respectivamente), así como con el grupo sin GSH (51.52%).

Adicionalmente, observaron que el contenido de radicales libres, principalmente el  $H_2O_2$  fue menor en espermatozoides conservados con 1 mM; bajo este escenario, Petruška *et al.* (2014), documentan que el GSH al ser un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina desempeña un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo a nivel intracelular; por lo que la subunidad cisteína ofrece y expone un grupo sulfhidrilo que neutraliza los radicales libres directamente. También, observaron que altas concentraciones de antioxidantes pueden destruir el acrosoma y la integridad de la membrana plasmática. Ante esto, Peruma *et al.* (2013) afirman que altas concentraciones GSH a partir de 5 mM, el espermatozoide no puede mantener sus funciones fisiológicas vitales; es decir, altas cantidades de GSH en el diluyente pueden dañar la función mitocondrial del espermatozoide.

En el cuadro 3 se puede observar el comportamiento de la movilidad total durante el periodo de conservación; destacando que a las 24 horas el tratamiento con 2 mM de GSH mostró diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) presentando un 61.70%, seguido del tratamiento con 1 mM (54.88%), por último, el control (52.84%). Concluidas las 96 horas de conservación la movilidad total manifestó una disminución del 14% para el grupo control, mientras tanto, los tratamientos con 1 y 2 mM de GSH tuvieron pérdidas del 11 y 6%, respectivamente.

**Cuadro 3.** Movilidad total de eyaculados de verraco diluidos conservados a 17 °C, adicionados con GSH (% , n= 40).

Hora de conservación	Tratamientos		
	Control	1 mM	2 mM
0	56.95 <sup>a</sup>	62.50 <sup>a</sup>	63.18 <sup>a</sup>
24	52.84 <sup>a</sup>	54.88 <sup>a</sup>	61.70 <sup>b</sup>
48	51.81 <sup>a</sup>	56.47 <sup>a</sup>	57.95 <sup>a</sup>
72	53.18 <sup>a</sup>	57.95 <sup>a</sup>	53.29 <sup>a</sup>
96	42.84 <sup>a</sup>	51.81 <sup>b</sup>	56.93 <sup>b</sup>

Literales a, b en filas indican diferencias (P<0.05).

Estos resultados concuerdan con Vongpralub *et al.* (2016) quienes obtuvieron mejores resultados de movilidad durante un periodo de conservación de 7 días con la adición de 1 mM de GSH (81.72%), con respecto al control, 0.1 y 5 mM (74.33, 79.61 y 78.94%, respectivamente). Un comportamiento similar fue reportado por Li *et al.* (2017) quienes obtuvieron un descenso de la movilidad en el semen de verraco a 17 °C, obteniendo 45.58% al cuarto día de conservación, dichos autores, establecen una relación en base al descenso de la movilidad con el tiempo efectivo de conservación, considerando valores inferiores al 50% como límite mínimo. Por lo tanto, definieron que el semen de verraco diluido y conservado a 17 °C tiene un periodo de supervivencia de 4 días.

Bajo este contexto, la adición de GSH prolonga el periodo de supervivencia por al menos un día más. Cabe mencionar que el tiempo de evaluación en la presente investigación solo fue hasta las 96 horas de conservación (4 días). Es decir, que el efecto GSH positivo se pueda deber a la compensación en la producción de ROS durante la conservación. Yeste *et al.* (2014) han sugerido que los ROS afectan la movilidad de los espermatozoides a través de un agotamiento de ATP, mediado por la inhibición de la fosforilación y la glucólisis oxidativa por peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Por su parte, Vyt *et al.* (2008) establecieron una asociación entre la movilidad total y progresiva con la fertilidad del eyaculado, donde, observaron que



el mantenimiento de la movilidad en el semen diluido se relaciona con el aumento de 0.14 lechones nacidos por camada.

Los hallazgos en el presente trabajo con respecto a la variable integridad de la membrana plasmática (cuadro 4), durante el almacenamiento a 17 °C a las 0 y 24 horas no se mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos; fue a partir de las 48 horas que los tratamientos con 1 mM (87.18%) y 2 mM (87.04%) de GSH comenzaron a comportarse de mejor manera al mantener la integridad de la membrana espermática del espermatozoide ( $P<0.05$ ) con respecto al control (84.31%). Hasta ese momento, el tratamiento control había disminuido en 3% la población de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (espermatozoides vivos), seguido del tratamiento con la adición de 2 mM en 2%, finalmente el tratamiento con 1 mM que disminuyó un 1%.

**Cuadro 4.** Integridad de la membrana plasmática del espermatozoide de verraco suplementado con GSH conservado a 17 °C (% , n= 40).

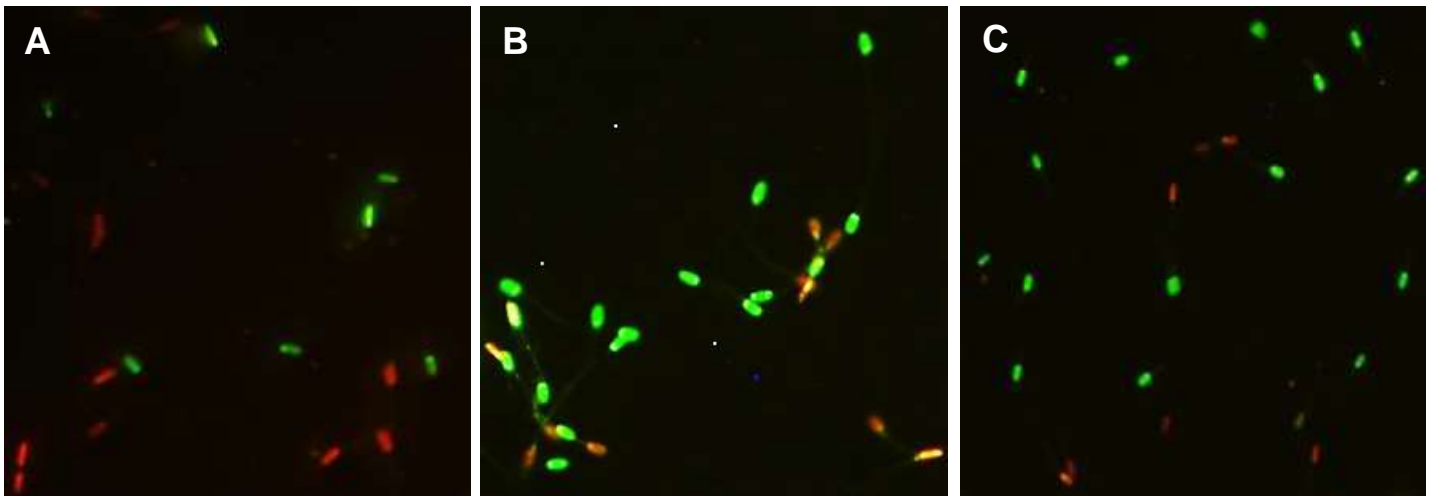
Hora de conservación	Tratamientos		
	Control	GSH	
		1 mM	2 mM
0	87.54 <sup>a</sup>	88.52 <sup>a</sup>	89.47 <sup>a</sup>
24	86.31 <sup>a</sup>	88.04 <sup>a</sup>	88.22 <sup>a</sup>
48	84.31 <sup>a</sup>	87.18 <sup>b</sup>	87.04 <sup>b</sup>
72	87.13 <sup>a</sup>	86.97 <sup>a</sup>	87.47 <sup>a</sup>
96	80.65 <sup>a</sup>	85.40 <sup>b</sup>	87.52 <sup>c</sup>

*Literales a, b en filas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).*

A las 96 horas de conservación a 17 °C fue el tratamiento con 2 mM de GSH el que logró mantener significativamente ( $P<0.05$ ) un 87.52% de espermatozoides con membrana íntegra, seguido del tratamiento con 1 mM (85.40%), comparado con el control con 80.65%. Durante este tiempo de conservación el tratamiento con 2 mM tuvo un mejor comportamiento, ya que, solo disminuyó 2%; por su parte, el

tratamiento con 1 mM disminuyó 3%, por último, el control disminuyó considerablemente en un 7% siendo 4 veces más con respecto al tratamiento con 2 mM (figura 16).

Ante esta tendencia, Li *et al.* (2017) reportaron que los espermatozoides conservan suficientes enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión reductasa, catalasa, entre otras) para resistir el daño oxidativo durante los 3 primeros días; es entonces cuando el GSH actúa, a partir del disulfuro de glutatión que se regenera/reducido por la enzima glutatión reductasa para completar el ciclo, impidiendo el aumento de la formación de ROS que dañan la integridad de la membrana plasmática (Petruška *et al.*, 2014).



**Figura 16.** Integridad de membrana plasmática de tratamientos a 96 horas de conservación a 17 °C, **A:** Control; **B:** 1 mM GSH; **C:** 2 mM GSH (sondas de inmunofluorescencia SYBR-14/PI).

Estos resultados concuerdan parcialmente con Zhang *et al.* (2016) quienes durante un periodo de conservación de 96 horas con 1 mM de GSH añadido al diluyente de conservación a 17 °C obtuvieron mejores porcentajes ( $P < 0.05$ ) de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (57.73%) en relación al semen que no se añadió GSH (40.32%). Sin embargo, Vongpralub *et al.* (2016), indican diferencias no significativas ( $P > 0.05$ ) en la integridad de la membrana plasmática con la adición de

GSH; sin embargo, estos autores atribuyen sus resultados a las sondas de fluorescencia utilizadas (PI, FITC-PNA y JC-1) así como a la variación de la temperatura de incubación. Cabe destacar que la integridad de la membrana plasmática es uno de los parámetros evaluados con mayor frecuencia durante el análisis seminal de rutina, y su determinación es útil para predecir *in vitro* la capacidad fecundante del espermatozoide. En este contexto, Ariagno y Mormandi. (2016) a membrana plasmática del espermatozoide es esencial para algunas funciones metabólicas tales como la capacitación, interacción con células del útero, reacción del acrosoma e interacción con la zona pelúcida; por lo tanto, la pérdida de su integridad es considerada como incompatible con la capacidad del espermatozoide de fecundar un ovocito *in vivo*.

Por otro lado, en las variables seminales de tolerancia osmótica e integridad acrosomal de los espermatozoides de verraco durante el periodo de almacenamiento, no mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ , cuadro 5).

**Cuadro 5.** Tolerancia osmótica e integridad acrosomal de espermatozoides conservados a 17 °C adicionados con GSH (% , n= 40).

Parámetro	Hora de conservación	Tratamiento		
		Control	1 mM	2 mM
Tolerancia osmótica (%)	0	58.36	54.81	59.20
	24	52.77	56.81	54.90
	48	54.77	53.86	54.75
	72	52.91	53.18	50.86
	96	54.57	54.07	54.50
Integridad acrosomal (%)	0	51.52	49.65	55.40
	24	52.84	53.29	56.02
	48	50.40	49.88	51.60
	72	50.30	47.61	51.20
	96	49.84	48.68	52.82

*Literales a, b en filas indican diferencias significativas ( $P<0.05$ ).*

El hecho de no haber encontrado diferencias entre tratamientos en el presente estudio, indica que durante el almacenamiento a 17 ° la funcionalidad bioquímica de la membrana plasmática no se vio afectada; cabe mencionar que los tres grupos mantuvieron valores promedio de 55% en el caso de la tolerancia osmótica y del 50% para la integridad acrosomal. Estos resultados concuerdan con Schulze *et al.* (2017), quienes reportaron que durante la conservación a 17 °C no encontraron diferencias significativas en cuanto a la integridad acrosomal en espermatozoides de verraco.

En este contexto es importante destacar que, en condiciones fisiológicas la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente alterada, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto, la prueba dual HOST/azul de comassie es un indicador más preciso. Ante esto, Yeste *et al.* (2010) resaltan que el espermatozoide realiza mecanismos de adaptación y resistencia a los repentinos cambios en la osmolaridad, involucrando complejas vías metabólicas; por ejemplo, los canales iónicos relacionados a ATPasa – dependientes de iones Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>; que, en una membrana no funcional bioquímicamente conlleva al choque osmótico que afecta la difusión de fosfolípidos en la bicapa de la membrana espermática.

Riesenbeck. (2015) postula que realizar la dilución de semen con alta calidad es crucial para el éxito en la inseminación artificial (IA), donde, ha observado que en dosis de IA la integridad acrosomal se mantiene estable en un máximo de 5 días a 16 – 18 °C. Por su parte, González-Peña *et al.* (2014) hacen referencia en la tasa de dilución y la eliminación del plasma seminal que se asocian con la reducción de componentes de capacitación espermática; ante la aseveración Henning *et al.* (2015), establecen que realizar la dilución de semen de verraco con al menos 10% de plasma seminal residual, desencadena un estado similar a la capacitación, que culmina en reacciones del acrosoma prematuras y por consecuencia muerte celular.

## **VII. CONCLUSIONES**

- La suplementación con GSH de 2 mM al medio de dilución tiene efecto de mejora durante la conservación a la 17 °C de espermatozoide de verracos en condiciones de tóxico subhúmedo.
- El almacenamiento del semen de 72 a 96 horas a 17 °C suplementado con GSH induce cambios positivos en la integridad estructural de la membrana plasmática (viabilidad) y movilidad total.
- La adición de GSH al medio de conservación a 17 °C es una alternativa para conservar la fertilidad del semen de verraco en condiciones de trópico subhúmedo.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Haila A. y Tulsiani DRP. 2000. Mammalian sperm acrosome: Formation, contents and function. *Arc Bioc Bio*. Vol. 379, pp. 173-182.
- Adams TE. 2005. Using gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH analogs to modulate testis function and enhance the productivity of domestic animals. *Anim Reprod Sci*, Vol. 88 pp.127-139.
- Aitken R, De Luliis G. 2010. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, Vol. 16(1), pp. 3-13.
- Aitken RJ, Baker MA, De Luliis GN, Nixon B. 2010. New insights into sperm physiology and pathology. *Handb Exp Pharmacol*, Vol. 198, pp. 99-115.
- Arenas RE, Cambrón RA, Ambríz GD, Zúñiga RPJP, Rodríguez TA, Rosado GA. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contactos*, Vol. 78, pp. 5-11.
- Ariagno J. y Mormandi E. 2016. Guía práctica para la evaluación del semen. *Guía Práctica ByPC*, Vol. 80(3), pp. 29-36.
- Ariagno JI, Curi SM, Chenlo P, Repetto HE, Pugliese MN, Palaoro LA, Sardi M, Mendeluk GR. 2011. Our experience in sperm morphology assessment. *Asian J Androl*. Vol. 13(2), pp. 201-202.
- Audet I, Laforest JP, Martineau GP, y Matte JJ. 2004. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. *J Anim Sci*, Vol. 82(2), pp. 626–633.
- Aurich C. 2005. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. Vol. 89, pp. 65-75.
- Avelar FG, Oliveira FAC, Soares MJ, Silva JI, Dobrinski I, Hess AR. 2010. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: a non-random event. *Theriogenology*, Vol. 74, pp. 11-23.
- Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patiño C, Parrilla I, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-Martinez H y Roca J. 2015. High total antioxidant capacity of the porcine seminal plasma (SP-TAC) relates to sperm survival and fertility. *Sci Repor*, Vol. 5, pp. 1-9.

- Bathgate R. 2011. Antioxidant mechanisms and their Benefit on post-thaw boar sperm quality. *Reprod Domest Anim*, Vol. 46, pp. 23-25.
- Bernabé SA, Navarro CJA, Pallarés MFJ. 2009. Citología e Histología veterinaria. Universidad de Murcia. Disponible en: <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologia-e-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema31-reproductor-masculino.pdf>
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany*, Vol. 91, pp. 179-194.
- Bonet S, Briz M, Pinart E, Sancho S, García-Gil N, Badia E. 2000. Morfologia espermàtica en porcí. Institut d'Estudis Catalans Ed. *Arxius de les Seccions de Ciències* Vol.126. Barcelona, España.
- Bonet S, Briz MD, Yeste M. 2012. A proer assessment of boar sperm function may not only require conventional analyses but also others focused on malecular markers of epididymal maturation. *Reprod Dom Anim*. Vol. 47, pp. 1-13
- Bonet S, Martínez E, Rodríguez JE, Barrera X. 2006. Biotecnología de la reproducción porcina. Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Ed. Universitat de Girona y Red temática de la reproducción porcina.
- Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM y Beconti MT. 2005. Alpha-tocophenol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, Vol. 63, pp. 2126-35.
- Brewer L, Corzett M, Lau EY y Balhorn R. 2003. Dynamics of protamine-1 binding to single DNA molecules. *J Biol Chem*, Vol. 278, pp. 403-408.
- Briz M. 1994. Microscopical analysis of the ejaculated sperm and the sperm spididymal maturation of *sus domesticus*. Tesis doctoral pp. 308-310.
- Briz M. y Fábrega A. 2013. The boar spermatozoon In: Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends (eds Bonet S, Casas I, Holt WV y Yestes M.), *Springer* Berlín, Alemania pp. 3-47.
- Broekhuijse ML, Sostaric E, Feitsma H y Gadella BM. 2012. The value of microscopic semen motility assessment at collection for a commercial artificial insemination center, a retrospective study on factors explaining variation in pig fertility. *Theoriogenology*, Vol. 77, pp. 1466-1479.

- Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Baspinar N, Taspinar M, Cayan K, Bilgili A, Akalin PP, Büyükleblebici S, Aydos S, Ilgaz S, Sunguroglu A y Oztuna D. 2010. Effect of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, Vol. 61.
- Buhr MM, Fiser P, Bailey JL y Curtis EF. 2001. Cryopreservation in different concentrations of glycerol alters boar sperm and their membranes. *J Andrology*, 22, pp.961-69.
- Buonocore G, Perrone S y Tataranno ML. 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactiveoxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, Vol. 15, pp. 186-190.
- Buriticá HME. 2016. Efecto de anandamida sobre la capacitación prematura de espermatozoides porcinos sometidos a congelación. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Producción Animal. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Caballero I, Parrilla I, Almiñana C, Del Olmo D, Roca J, Martínez EA y Vázquez JM. 2012. Seminal plasma protein as modulators of the sperm fuction and their application in sperm biotechnologies. *Reprod Dom Anim*, Vol. 47, pp. 12-21.
- Caires KC, Schmidt JA, Oliver AP, De Ávila J, Mclean DJ. 2008. Endocrine regulation of the establishment of spermatogenesis in pigs. *Reprod Dom Anim*, Vol. 43(2), pp. 80-287.
- Cárdenas RN y Pedraza CJ. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Edu quím*, Vol. 17(2), pp. 164-173
- Cardozo JA, Fernández-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analysed by two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. *Theriodenology*, Vol. 66(4), pp. 841-50.
- Carlson AE, Westenbroek RE, Quill T, Ren D, David EC, Hille B, Garbers DL y Babcock DF. 2003. CatSper1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. *Cell Biology*, Vol. 100(25), pp.14864-14868.



- Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2009. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, Vol. 72(7), pp. 930-948.
- Casas I. 2010. A practical approach on boar sperm cryodamage. Morphofunctional and immunocytochemical study of cryopreserved boar sperm intended for use in artificial insemination. *Doctoral thesis*, Universidad of Girona.
- Casas I. y Althouse GC. 2013. The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. *Cryobiology*, Vol. 66(1), pp. 69–75.
- Castaño FA, Rugeles CC, Betancur CA, Ramírez-López CJ. 2014. Impacto del estrés calórico sobre la actividad reproductiva en bovinos y consideraciones para mitigar sus efectos sobre la reproducción. *Rev Biosalud*, Vol. 13(2), pp. 84-94.
- Chenlo PH, Ariagno JI, Pugliese MN, Repetto HE, Sardi LM, Mendeluk GR, Curi SM. 2013. Estudio del semen humano: implementación de un método objetivo. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, Vol.47(1)
- Chihuailaf RH, Contreras Pa, Wittwer FG. 2002. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet Méx*, Vol. 33.
- Christensen P, Stryhn H y Hansen C. 2005. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, Vol. 63, pp. 992-1003.
- Chun-Xia Z, Zeng-Ming Y. 2000. Evaluation on sperm quality of freshly ejaculated boar semen during *in vitro* storage under different temperatures. *Theriogenology*, Vol. 53, pp. 1477-1488.
- Conejo-Nava J, Fierro R, Gutiérrez CG, Betancourt M. 2003. Membrane status and *in vitro* capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 °C. *Arch of Andro*, Vol. 49(4), pp. 287-295.
- Confederación de Porcicultores Mexicanos A. C. 2018. Compendio estadístico del sector porcícola 2018. Disponible en:
- Contri A, De Amicis I, Molinari A, Faustini M, Gramenzi A, Robbe D y Carluccio A. 2011. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, Vol. 75(7), pp. 1319–1326.

- Córdova IA, Iglesias RAE, Espinosa CR, Guerra LJE, Inzunza CJF, Juárez MML, Gómez VA, Rodríguez DBE. 2016. Aplicación de la citometría de flujo en veterinaria. *Rev Comp Cienc Vet*, Vol. 10(2), pp. 60-73.
- Córdova IA, Pérez GJF, Méndez HW, Villa MAE y Huerta CR. 2015. Obtención, evaluación y manipulación del semen de verraco en una unidad de producción mexicana. *Rev Vet*, Vol. 26(1), pp. 69-74.
- Córdova JCA. 2010. Control de la peroxidación lipídica de semen refrigerado y criopreservado de verraco mediante antioxidantes ( $\alpha$ -Tocoferol / Glutatión reducido), y su repercusión sobre la calidad espermática. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria, Departamento de sanidad animal. Universidad de León. León, España
- Cuenca CM y Avellaneda CJ. 2017. Diluyentes utilizados en inseminación artificial porcina. *REDVET*, Vol. 18(9), pp. 1-11.
- Curi S, Ariagno J, Chenlo P, Pugliese N, Sardi M, Repetto H, Mazziotta D y Blanco AM. 2008. Control de calidad externo en el estudio del semen. *Acta Bioquím Clín Latinoam*, Vol. 42(2), pp. 183-187.
- Darszon A, Acevedo J, Galindo B, Hernández-González E, Nishigaki T, Treviño, C, Wood, C y Beltrán C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction*, Vol. 131, pp. 977-988.
- De Andrade AF, De Arruda RP, Celeghini EC, Nascimento J, Martins SM, Raphael CF, Moretti AS. 2007. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod Domest Anim*, Vol. 42, pp. 190-194.
- De Mercado PE. 2011. Caracterización de la congelabilidad y mejora de los diluyentes de crioconservación espermática en porcino ibérico. Memoria para optar al grado de doctor. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de veterinaria. Departamento de medicina y cirugía animal 1.
- Del Valle RA. 2017. Evaluación de la calidad espermática de sementales porcinos utilizados en la monta natural. *REDVET*, Vol. 18(10) pp. 1-17.
- Díaz FO, Mesa H, Valencia MLG, Gómez LG, Henao UFJ. 2009. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática

- en cerdos reproductores con gotas citoplasmáticas persistentes. *Rev Cient*, Vol. 19(5), pp. 500-505.
- Dickinson BC y Chang CJ. 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat Chem Biol*, Vol. 7, pp. 504–511.
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. 2010. Anatomía Veterinaria; 4ª ed.; Ed. Manual Moderno, México.
- Espinosa HS. 2002. Inseminación Artificial. Editores Trujillo OM, Martínez GR, Herradora LMA. La pira Reproductora. 1ª ed. ED. México: Mundi-Prensa, pp. 165-188.
- Estrada PE, Rivera AMM, Rodríguez-Gil JE y Yeste M. 2017. The addition of reduced glutathione to cryopreservation media induces changes in the structure of motile subpopulations of frozen thawed boar sperm. *Cryobiology*, Vol. 78, pp. 56-64.
- Estrada PE, Rodríguez GJE, Rocha LG, Balasch S, Bonet S, Yeste M. 2014. Supplementing cryopreservation media with reduced glutathione, increases fertility and prolificacy of sows inseminated with frozen-thawed boar semen. *Andrology*, Vol. 2, pp. 88–99.
- Estrada PE. 2014. Efectos del glutatión reducido y la procaína en la resistencia a la criopreservación de semen porcino. Acciones a nivel de la estabilidad nuclear y su efecto en la fertilidad “in vivo”. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Estrada-Paqui y Martínez R. 2017. Tendencias actuales de reproducción en porcino, reproducción e inseminación artificial. 1ª ed. ED Académica Española, Barcelona, España.
- Fábrega A, Puigmule M, Yeste M, Casas I, Bonet S, Pinart E. 2011. Impact of epididymal maturation, ejaculation and *in vitro* capacitation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited of boar (*Sus domesticus*) spermatozoa. *Theriogenology* Vol. 76, pp. 135-1366.
- Ferreira F, Pires M y Martínez M. 2006. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos a oestresse calórico. *Bras Med Vet Zootec*, Vol. 5(5), pp. 732-738.
- Flores C y Vilanova L. 2015. Metabolismo espermático. *Gaceta de ciencias veterinarias*. Vol. 20 (1), pp. 23-32.

- Flores C, Meléndez C, Mendoza C, Márquez Y. y Vilanova LT. 2018. Efecto antioxidante de la melatonina durante la conservación de semen de cerdo. *Rev Vet*, Vol. 29(1), pp. 13-17.
- Flores E, Ramió-Lluch L, Bucci D, Fernández-Novell JM, Peña A, Rodríguez-Gil JE. 2011. Freezing-thawing induces alterations in histone H1-DNA binding and the breaking of protein- DNA disulfide bonds in boar sperm. *Theriogenology*, Vol. 76, pp. 1450-1464.
- Foote RH. 2002. Within-herd use of boar semen at 5 degrees C, with a note on electronic monitoring of oestrus. *Reprod Domest Anim*, Vol. 37, pp. 61-63.
- Foxcroft GR, Dyck MK, Ruiz-Sánchez A, Novak S, Dixon WT. 2008. Identifying useable semen. *Theriogenology*, Vol. 70, pp. 1324-1336.
- Fraser L. y Strzezek J. 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Histocytobiology*, Vol. 42(1), pp. 49-55.
- Froman DP y Feltmann AJ. 2010. A new approach to sperm preservation based on bioenergetic theory. *J Anim Sci*, Vol. 88, pp. 1314-1320.
- Fuentes CM, Pérez GL, Suárez HY y Soca PM. 2006. Características reproductivas de la cerda. Influencia de algunos factores ambientales y nutricionales. *REDVET*, Vol. 7(1), pp. 123-135.
- Gadea J, García-Vazquez F, Matás C, Gardón JC, Cánovas S, Gumbao D. 2005. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J Androl*, Vol. 26, pp. 396-404.
- Gadea J, Ruiz S, Sellés E. y Marco Ma. 2003. Factores que afectan a la capacidad de congelación del semen porcino. *Rev ITEA*, Vol. 24(1), pp. 330-332
- Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R y Ruiz S. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, Vol. 62, pp. 690-701.

- Gadea J. 2001. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro*. Revisión. *Prod Sanid Anim*, Vol. 16(1), pp. 63-77.
- Gadella BM y Harrison RA. 2000. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. *Development*, Vol. 127(11), pp. 2407-20.
- Gadella BM, Harris RA. 2002. Capacitation induces cyclic Adenosine 3', 5' monophosphate dependent but apoptosis related, exposure of phospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Rep*, Vol. 67, pp. 340-350.
- Gadella BM, Tsai P, Boerke A, Brewis IA. 2008a. Sperm head membrane reorganization during capacitation. *Dev Biol*, Vol. 52, p. 473.
- Gadella BM. 2008b. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci*, Vol. 107, p. 229.
- Galina C y Valencia J. 2011. Reproducción de animales domésticos. 3ª ed. ED. Limusa. México.
- Galina C. y Valencia J. 2009. Reproducción de animales domésticos. 3ª edición; Ed. Limusa; México DF.
- García JC, Domínguez JC, Peña FJ, Alegre B, González R, Castro MJ, Habing GG, Kirkwood RN. 2010. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: effects on sperm quality and fertility. *Anim Reprod Sci*, Vol. 119, pp. 160-165.
- García-Gil N, Pinart E, Sancho S, Badia E, Bassols J, Kadar E. 2002. The cycle of the seminiferous epithelium in landrace boars. *Anim Reprod Sci*; Vol. 73, pp. 211-225.
- Germann WJ. y Stanfiel CL. 2005. Principals of human physiology. 2ª ed. ED. Pearson Education, Inc. San Francisco, CA.
- Gogol P, Szcześniak-Fabiańczyk B, Wierzchoś-Hilczer A. 2009. The photon emission, ATP level and motility of boar spermatozoa during liquid storage. *Reprod Biol*, Vol. 9, pp. 39-49.

- Gómez-Coronado CMT. 2018. Estudio de nuevos métodos de conservación seminal en el verraco. Tesis de grado. Facultad de Veterinaria, Departamento de Fisiología Animal. Universidad de Extremadura.
- Gómez-Rincón C, Dahmani Y, García-Tomás M, Mozo-Martín R, Jiménez S, Berges AC, Grandía J. 2009. Valoración del diluyente de extra-larga duración Duragen®: parámetros reproductivos en cerdas inseminadas con semen de 1, 12 ó 15 días. *Jorn Estu XIII Produc Animal*, Vol. 2, pp. 741-743. Zaragoza, España.
- González-Peña D, Knox RV, Pettigrew J y Rodríguez-Zas SL. 2014. Impact of pig insemination technique and semen preparation on profitability. *J Anim Sci*, Vol. 92, pp. 72–84.
- Gravance CG, Garner DL, Baumber J, Ball BA. 2000. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology*, Vol. 53, pp. 1691-1703.
- Grunert E, Birge HE y Vale GW. 2005. Patología clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia. São Paulo. Livraria Varela.
- Guan J, Kinoshita M, Yuan L. 2009. Spatiotemporal association of DNAJB13 with the annulus during sperm flagellum development BMC. *Dev Biol*, Vol. 9, p. 23.
- Guthrie HD y Welch GR. 2012. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology*, Vol. 78, pp. 1700–1708.
- Hafez ESE, Hafez B. 2002. Reproducción e inseminación artificial en animales; 7° ed.; ED. Mc Graw Hill, México.
- Hazel LN. 2005. The science and practice of pig production. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 292 pp.
- Henaó RG, Trujillo AL, Buriticá HM, Sierra PC, Correa LG, y González BÓ. 2004. Efecto del clima sobre las características seminales de porcinos en una zona de bosque húmedo tropical. *Fac Nac Agron Mede*, Vol. 57(2), pp. 2355-2371.
- Henning H, Ngo TT y Waberski D. 2015. Centrifugation stress reduces the responsiveness of spermatozoa to a capacitation stimulus in in vitro-aged semen. *Andrology*, Vol. 3, pp. 834–842.
- Hermo L, Pelletier R, Cry D y Smith C. 2010. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part. 2: Changes in spermatid

- organelles associated with development of spermatozoa. *Mycros Res Tech*, Vol. 73, pp. 279-319.
- Hernández A, Hernández AK, Barrientos M, Cervantes P. 2015. Actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) del plasma seminal de cerdo en Veracruz, México. *Act Iberoam Conser Anim*, Vol. 6, pp. 98-111.
- Hernández PJE, Fernández RF, y Mejía RAI. 2008. Efecto de la monta natural y el uso de diferentes tipos de semen sobre la productividad de la cerda. *Salud Animal*, Vol. 30(2), pp. 98-102.
- Hicks JJ, Torres RY, Sierra VM. 2006. Estrés oxidativo. Concepto y clasificación. *Endocrinología y Nutrición*, Vol. 4, pp. 223-226.
- Hidalgo MD. 2013. Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina Animal. Universidad de Extremadura.
- Horký P, Tmejova K, Kenova R, Cernei N, Kudr J, Sapakova E, Ruttkay-Nedecky B, Adam V, Kizek R. 2015. Effect of heat stress on the antioxidant activity of Boar ejaculate revealed by spectroscopic and electrochemical methods. *Int J Electrochem Sci*, Vol. 10, pp. 6610–6626.
- Horký P, Zeman L, Skládanka J, Nevrkla P y Sláma P. 2016. Effect of selenium, zinc, vitamin C and E on boar ejaculate quality at heat stress. *Act Univ Agric Silv Mend Brun*, Vol. 64(4), pp. 1167-1172.
- Hu JH, Tian WQ, Zhao XL, Zan LS, Eang H, Li QW, Xin YP. 2010. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. *Anim Reprod Sci*, Vol. 121, pp. 72-77.
- INEGI, 2019. Encuesta Nacional Agropecuaria. Disponible en: [www.inegi.org.mx/programas/ena/default.html#Tabulados](http://www.inegi.org.mx/programas/ena/default.html#Tabulados)
- Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H. 2003. Sulfur and selenium: the role of oxidation states in protein structure and function. *Angrew Chem Int*, Vol. 42, pp. 4742-4758.
- Johnson L, Thompson LD, Varner DD. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci*, Vol. 105, pp. 23-51.

- Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WMC. 2000. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, Vol. 62, pp. 143-172.
- Jones E. y DeCherény A. 2005. The male reproductive system. In: W. F. Boron and E. L. Boulpaep. *Med Phys. Elsevier Inc.*, pp. 1122 - 1140
- Kadirvel G, Kumar S, Kumaresan A. 2009. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potencial and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracelular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. *Anim Reprod Sci*, Vol. 114, pp. 125-134.
- Knecht D, Jankowska-Mąkosa A. y Duziński K. 2017. The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of AI boar's productivity. *Lives Sci*, Vol. 201, pp. 13-21.
- Knox RV. 2004. Practicalities and pitfalls of semen evaluation. *Adv in Pork Produ*, Vol. 15, pp. 315-322.
- Knox RV. 2016. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, Vol. 85(1), pp. 83-93.
- König HE y Liebich HG. 2005. Anatomía de los animales domésticos, tomo 2; 2ª ed. ED. Médica Panamericana, S.A., Madrid, España.
- KUBUS S.A. 2010. Manual práctico para profesionales. Inseminación artificial porcina. 3ª Ed. ED. Polígono Industrial Európolis, Madrid, España.
- Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi Rk, Das A, Kumar S, Naskar S. 2009. Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, Vol. 110, pp. 162-171.
- Kuster CE y Althouse GC. 2007. Reproductive physiology and endocrinology of boars. In Youngquist RS, Therlfall WR, editors. Current therapy in large animal theriogenology. 2ª ed. USA. *Elsevier Inc.* pp. 17-21.
- Kvist U y Bjorndahl L. 2002. Manual on basic semen análisis, *ESHERE monographs. Oxford University Press*, Oxford, UK.
- Lee S-H y Park C-K. 2015. Antioxidative effects of magnetized extender containing bovine serum albumin on sperm oxidative stress during long-term liquid preservation of boar semen, *Bioch Bioph Resea Comm*, Vol. 30, pp. 1-6.



- Li H, Zhang X-G, Fang Q, Liu Q, Du R-R, Yang G-S, Wang L-Q y Hu J-H. 2017. Supplemental effect of different levels of taurine in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. *Anim Sci J*, Vol. 88(11), pp. 1692–1699.
- Lipenský J, Lustyková A, Čeřovský J. 2010. Effect of season on boar sperm morphology. *J Cent Europ Agric*, Vol. 11(4), pp. 465-468.
- Littel RC, Henry PR, Ammerman CB. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J Anim Sci*, Vol. 76, pp. 1216-1231.
- López RA, Van SA, Loannis A, Maes D. 2017. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extender semen. *Porc Heal Manag*, DOI Vol. 3(1) pp. 2-12.
- Lozano D, Vásquez P, González P. 2005. Effect of heat stress and its interaction with other management and productive variables on pregnancy rate in dairy cows in Aguascalientes, Mexico. *Vet. Mex*, Vol. 36(3), pp. 245-260.
- Mahfouz RZ, Du Plessis SS, Aziz N, Sharma R, Sabanegh E, Agarwal A. 2010. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. *Rev Fertil Steril*, Vol. 93(3), pp. 814-21.
- Maia DSM, Bicudo DS, Sicherle CC, Rodello L, Saltaren GCI. 2010. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim Reprod Sci*, Vol. 122, pp. 118-123.
- Martín HD. 2013. Fisiología celular y calidad seminal durante la conservación del semen porcino refrigerado. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Departamento de Medicina Animal. Universidad de Extremadura.
- Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, De Paz P. 2011. Statistical Series: opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. *Theriogenology*, Vol. 75, pp. 783-795.
- Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodriguez M, Del Olmo E, Fernández-Santos MR, Garde JJ y Martínez-Pastor F. 2012. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation

- at 37°C in presence of several antioxidants. *Theriogenology*, Vol. 78, pp. 1005–1019.
- Medrano A, Fernández-Novell JM, Ramio L, Álvarez J, Goldberg E, Montserrat Rivera M, Guinovartt JJ, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2006. Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, Vol. 73, pp. 369-378.
- Membrillo OA, Córdova IA, Hicks GJJ, Olivares CIM, Martínez TVM, Valencia MJJ. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, Vol. 28(12), pp. 699-704.
- Membrillo OA, Córdova IA, Hicks GJJ, Valencia MJJ y Castillo JH. 2011. Efecto de la adición de antioxidantes en el diluyente de semen de macho cabrío antes de congelar y después de descongelar. *Rev Vet*, Vol. 22(2), pp. 85-90.
- Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, 2010. Effect of n-acetyl-l-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, Vol. 45, pp. 201 - 207.
- Moura AA, Chapman DA, Koc H, Kilian GJ. 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy Bulls. *J Androl*, Vol. 27, pp. 534-541.
- O'donnell L, Nicholls KP, O'bryan KM, Mclachlan IR, Stanton GP. 2011. Spermiation the process of sperm release. *Spermatogenesis* Vol. 1, pp. 14-35.
- Obando P, Alfaro M, Hurtado E y Rodríguez T. 2012. Respuesta reproductiva de cerdas multíparas a la adición de oxitocina y prostaglandina F2 alfa previo a la inseminación artificial. *Zoot Trop*, Vol. 30(2), pp. 169-174.
- Oldfield JE. 2003. Some recollections of early swine research with selenium and vitamin E. *J Anim Sci*, 81(2), pp. 145–148.
- Olguín CG, Guiller GM, Zúñiga RRA, Pasquetti PA. 2004. Antioxidantes y aterosclerosis. *Rev Endoc Nut*, Vol. 12(4), pp. 199-206.
- Oshio S, Ashizawa Y, Yotsukura M, Tohyama Y, Iwabuchi M, Adachi Y, Matsuda H, Tomomasa H, Yoshida S, Takeda K, Umeda T. 2004. Individual variation in semen parameters of healthy young volunteers. *Arch Androl*, Vol. 50(6), pp. 417-425.

- Oskam IC, Lervik S, Tajet H, Dahl E, Ropstad E, Andresen Q. 2010. Differences in testosterone, androstenone, and skatole levels in plasma and fat between pubertal purebred Duroc and Landrace boars in response to human chorionic gonadotrophin stimulation *Theriogenology*, Vol. 74 pp.1088-1098.
- Pallás ART y De Alba RC. 2006. Condiciones ambientales e instalaciones: influencia sobre la salud y la calidad seminal. *Avan Tecno Porci*, Vol. 3(9), pp. 64-75.
- Pallás ART. 2015. Manejo del verraco en situaciones de estrés térmico Anaporc: *Rev Asoc Porc Cient*, Vol. 12(120), pp. 22-27.
- Peña FJ, Saravia F, Núñez-Martínez I, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2006. Do different portions of the boar ejaculated vary in their ability to sustain cryopreservation. *Anim Reprod Sci*, Vol. 93, pp. 101-113.
- Pereira CC. 2005. Fundamentos de Bioclimatología Aplicados à Produção Animal. 1a Ed. Belo Horizonte.
- Pesch S y Bergmann M. 2006. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron* Vol. 37, pp. 597-612.
- Petruška P, Capcarova, Sutovsky P. 2014. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. *Turk J Vet Anim Sci*, Vol. 38, pp. 643-652.
- Quiles A, Hevia ML. 2007. Infertilidad estacional en la cerda. Departamento de Producción Animal. Facultad de Veterinaria, universidad de Murcia. *Prod Anim*, Vol. 233.
- Quiles A. 2008. La nutrición del verraco. *CYSP*, Vol. 17, pp. 24-30.
- Quintero-Moreno A, González-Villalobos D, López-Brea JJ, Estes MC, Fernández-Santos MR, Carvalho-Crociata JL, Mejía-Silva W, León-Atencio G, 2009. Morphometric Evaluation of Sperm Head of Domestic Pig According their Age. *Rev Cient* Vol. 18 (5), pp. 570-577
- Quintero-Moreno A, Mayorga-Torres JM, Cardona MW. 2017. El análisis seminal como herramienta para predecir el potencial reproductivo en toros. *J Vet Andro*, Vol. 2(1), pp. 30-37.

- Quintero-Moreno A, Rigau T, Rodríguez-Gil JE. 2004. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools boar semen quality analysis. *Theriogenology*, Vol. 61, pp. 673-690.
- Quintero-Moreno A, Rubio Guillén, J, González Villalobos, D, Gutiérrez, JC, Madrid Bury, N, & López-Brea, JJG. 2011. Identification of cryodamage on plasma membrane integrity in bull spermatozoa and its relationship with field fertility. *Revista Científica, FCV-LUZ XXI* (5): 403-407.
- Radomil L, Pettitt MJ, Merkies KM, Hickey KD, Buhr MM. 2011. Stress and dietary factors modify sperm for processing. *Reprod Domest Anim*, Vol. 46, pp. 39-44.
- Ramalho-Santos J, Amaral A, Sousa A, Rodrigues A, Martins L, Baptista M, Mota PC, Tavares R, Amaral S y Gamboa S. 2007. Probing the structure and function of mammalian sperm using optical and fluorescence microscopy. *Mod Res Edu Top in Micros*, pp. 394-402.
- Ramírez A, Aguilar S, Córdova A y Méndez M. 2000. Evaluación y producción de semen de cerdo Pelón Mexicano. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.
- Restrepo BG, Úsuga SA, Rojano BA. 2013. Técnicas para el análisis de la fertilidad potencial del semen equino. *Rev CES Med Zootec*, Vol. 8(1), pp. 69-81.
- Riesenbeck A, Schulze M, Rüdiger K, Henning H y Waberski D. 2015. Quality control of boar sperm processing: implications from European AI centers and two spermatology reference laboratories. *Reprod Domest Anim* Vol. 50, pp. 1-4.
- Ríos EA, Ruiz AC, García DA, Rubio PJPZ, Tobón AR y García AR. 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *Contactos*, Vol. 78, pp. 5-11.
- Roca J, Parrilla I, Rodríguez-Martínez H, Gil MA, Cuello C, Vázquez JM. 2011. Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. *Reprod Domest Anim*, Vol. 46, pp. 79–83.
- Rocha G, Castañeda J, y Valencia J. 2005. Factores que afectan la producción de dosis de semen en centros de inseminación artificial porcina. *Avan Invest Agrop*, Vol. 9(3), pp. 33-43.

- Rodríguez-Martínez H, Barth AD. 2007. *In vitro* evaluation of sperm quality related to *in vivo* function and fertility. *Soc Reprod Fertil* Vol. 64, pp. 39-54.
- Roldan E. 2012. Forma, función y fertilidad de los espermatozoides. *SEBBM Divulgación*.
- Ross JW, Hale BJ, Gabler NK, Rhoads RP, Keating AF y Baumgard LH. 2015. Physiological consequences of heat stress in pigs. *Anim Produc Sci*, Vol. 55, pp. 1381–1390.
- Sancho S y Vilagran I. 2013. The boar ejaculate: sperm function and seminal plasma analyses in: fundamentals and new biotechnological trends (eds. S Bonet, I Casas, WV Hotl and M Yeste), pp. 741-516. *Springer*. Berlín, Alemania.
- Sancho S, Pinart E, Briz M, García-Gil N, Badia E, Bassols J, Kadar E, Pruneda A, Bussalleu E, Yeste M, Coll MG, Bonet S. 2004. Semen quality of postpubertal boars during increasing and decreasing natural photoperiods. *Theriogenology*, Vol. 62, pp. 1271-1282.
- Sancho S. 2002. Efectos del fotoperíodo sobre la calidad espermática de machos porcinos *Sus domesticus*. *Doctoral thesis*. Universitat d' Girona.
- Santiani AAV. 2012. Uso de dos análogos de superóxido dismutasa para prevenir la desestabilización espermática prematura durante la criopreservación y vitrificación en espermatozoides de alpaca. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria. Unidad de postgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Schilling, E. Vengust, M., Bajt y Omcic, M. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. Proc. 9th IPVS Congress. Barcelona. 77.
- Schulze M, Ammon C, Schaefer J, Luther AM, Jun M y Waberski D. 2017. Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. *Anim Reprod Sci*, Vol. 182, pp. 138–145.
- Senger P. 2003. Pathways to pregnancy and parturition. 2ª ed. ED. *Current conceptions, Inc.*, Pullman, WA.
- SIAP, 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, estadísticas 2018. Disponible en: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>

- Smital J. 2009. Effects influencing boar semen. *Anim Reprod Sci*, Vol. 110, pp. 335–346.
- Tejerina F, Buranaamnuary K, Saravia F, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. 2008. Assessment of motility of ejaculated, liquid-storage boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology*, Vol. 69, pp. 1129-1138.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlesi-Hundrieser M, y Tsoleva M. 2008. Glycobiology of fertilization in the pig. *Int Jou Dev Biol*, Vol. 52(6), pp.717–736.
- Toro-Montoya AI. 2009. Espermograma. *Medicina & Laboratorio*, Vol. 15, p. 145.
- Torretta M, Rabaglino M, Ferrero S. 2010. Caracterización cuali-cuantitativa de patologías espermáticas estudio comparativo de la incidencia de anomalías espermáticas en semen porcino fresco y refrigerado. *REDVET*, Vol.11(12), pp. 1-20.
- Trujillo OME, Contreras OAJ, Espinosa HS, Gutiérrez PO, Hernández TE, Nava NJ, Martínez GRG, Martínez RR, Rojas CJC, Sánchez HM, Viguera VRM, Catellanos SGY. 2017. El Verraco. 1ª ed. ED. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CU, CDMX.
- Trujillo OME, Martínez GR, Herradora LMA. 2002. Inseminación Artificial Editores. La pira Reproductora 1ª ed. ED. Mundi-Prensa, México, pp. 165-188.
- Tsakmakidis IA, Lymberopoulos AG, Khalifa TA. 2010. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *J Vet Sci*, Vol. 11, pp. 151-154.
- Valverde A y Madrigal-Valverde M. 2018. Sistema de análisis computarizado de semen en la reproducción animal. *Agron Mesoam*, Vol. 29(2), pp. 469-484.
- Velázquez VC. 2013. Factores que influyen en la calidad y principales características seminales del verraco. *Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrion*.
- Venéreo GJR. 2002. Daño Oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev cub Med Milit*, Vol. 31(2), pp. 126-133.
- Villa NA, Sánchez LE, Ceballos A. 2008. Actividad de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en plasma seminal y sangre en cerdos reproductores. *Veterinary and animal science*. Vol. 3(1).
- Vongpralub T, Thananurak P, Sittikasamkit C, Chuawongboon P, Duangjinda M, Boonkum W, y Chankitisakul V. 2016. Comparison of Effects of Different

- Antioxidants Supplemented to Long-term Extender on Boar Semen Quality Following Storage at 17°C. *Thai J Vet Med*, Vol. 46(1), pp. 119-126.
- Vyt P, Maes D, Dejonckheere E, Castryck F, Van Soom A. 2004. Comparative study on five different commercial extenders for boar semen. *Reprod Domest Anim*, Vol. 39, pp. 8–12.
- Vyt P, Maes D, Quinten C, Rijsselaere T, Deley W, Aarts M, De Kruif A, Van Soom A. 2008. Detailed motility evaluation of boar semen and its predictive value for reproductive performance in sows. *Vlaams Dierge Tijds*, Vol. 77, pp. 291-298.
- Waberski D, Henning H, Petrunkina AM. 2011. Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reprod Domest Anim*, Vol. 46, pp. 45-48.
- Wagner A y Claus R. 2009. The effects of postnatal FSH substitution on Sertoli cell number and the sperm production capacity of the adult boar. *Anim Reprod Sci*, Vol. 110, pp. 269-282.
- Watherhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, Vol. 131, pp. 887-894.
- Wilcox C. 2010. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress. *Pharmacol Ther*, Vol. 126, pp. 119-145.
- Williams S. 2013. Criopreservación de semen porcino: desafíos y perspectivas. *Rev Bra Reprod Anim*, Vol. 37(2), pp. 207-212.
- Wolf DE. 1995. Lipid domains in sperm plasma membranes. *Mol Memb Biol*, Vol. 12, pp. 101-104.
- Wolf J y Smital J. 2009. Quantification of factors affecting semen traits in artificial insemination boars from animal model analyses. *J Anim Sci*, Vol. 87, pp. 1620-1627.
- [www.porcimex.org/Compendio%20Estadistico%202018.pdf](http://www.porcimex.org/Compendio%20Estadistico%202018.pdf)
- Yeste M, Briz M, Pinart E, Sancho S, Bussalleu E, Bonet S. 2010. The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. *Anim Reprod Sci*, Vol. 119, pp. 265-274.

- Yeste M, Estrada E, Pinart E, Bonet S, Miró J y Rodríguez-Gil JE. 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*, Vol. 68(2), pp. 251–261.
- Yeste M, Lloyd RE, Badia E, Briz M, Bonet S, Holt WV. 2009. Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, Vol. 113, pp. 263-278.
- Yeste M. 2017. State of the art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Anim Reprod*, Vol. 14(1), pp. 69-81.
- Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. 2003. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci*, Vol. 76, pp. 99-111.
- Zarco L. 2008. Endocrinología de la reproducción. Editores Galina C, Valencia J. Reproducción de los animales domésticos. 3a ed. ED Limusa, México. pp. 59-83.