



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL

**CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN
REFRIGERADO Y CRIOPRESERVADO DE VERRACO MEDIANTE
ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol / Glutación reducido), Y SU REPERCUSIÓN
SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.**

*Memoria que presenta para optar al grado de Doctor el Licenciado en
Veterinaria*

CRISTIAN ALEJANDRO CÓRDOVA JIMÉNEZ

León (España), Septiembre 2010

A mis padres, hermanas, pelle y changuito.

Solo aquellos que se arriesgan a ir muy lejos,
pueden saber lo lejos que pueden llegar.

T.S. Elliot

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a Dios, por darme la fuerza y voluntad para desarrollar este trabajo, además por poner en mí camino a gente que ha hecho posible la realización de esta empresa.

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, por otorgarme los recursos económicos, por medio de la beca de formación en el extranjero, lo que hizo posible mi estancia durante todo este tiempo.

Este trabajo ha sido posible debido a la desinteresada colaboración de un gran número de personas, por lo que es justo mostrar un sincero reconocimiento por dicha colaboración y un gran agradecimiento a todas ellas, y en especial:

- A mis directores, el Dr. Juan Carlos Domínguez Fernández de Tejerina y a la Dra. Beatriz Alegre; al primero, por introducirme en el campo de la Reproducción Animal, y por haber puesto todos sus recursos a mi disposición para que mi estancia y mi trabajo de Tesis Doctoral fuese lo mejor posible, pero además, por mostrarme su constante apoyo; al segundo, por su amistad, por su apoyo y consejos durante la realización de la experimentación, además por inculcarme el rigor y la disciplina necesarios para realizar un buen trabajo en el laboratorio.
- A mi amigo el Dr. Raúl González Urdiales, por su gran paciencia y su especial capacidad de transmitir sus conocimientos de una manera comprensible, también por sus invaluable consejos y ánimos en los momentos de mayor desánimo, pues siempre tuvo tiempo, aunque no fuese lo que le sobraba, para ayudarme en cualquier duda o problema que se me presentó, por lo tanto, muchas gracias pues sin su ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo de Tesis.
- A los Doctores, Jesús Peláez García de la Puerta, Elizabeth Breininger, Joaquín Gadea por dedicar parte de su valioso tiempo en contestar a todas mis dudas y cuestionamientos a lo largo de la realización de este trabajo.

- A todos mis compañeros de Centrotec S.A., cuya infraestructura me permitió la realización de esta Tesis, empezando por la Dra. Beatriz Alegre, el Dr. Raúl González Urdiales. A Erica, Adrián, Álvaro, y Raúl por estar dispuestos a echarme una mano en todo momento, colaborando activamente en la parte experimental.

- A la Dra. Maite Carbajo por su ayuda en cualquier situación en que yo la necesitara, pero sobre todo por su gran amistad, de igual forma a la Dra. Jennifer por su apoyo en el laboratorio, por su gran disposición y paciencia conmigo y por la gran amistad que me ha brindado.

- Al resto de compañeros de la Unidad de Reproducción y Obstetricia, especialmente a Sergio, Sonia, David, Rocío, José Carlos, Julio, Francisco, Adelino, Patri y Adrian, a todos ellos por su disposición permanente tanto para ayudarme en lo que necesitase, como por sus palabras de ánimo en momentos complicados.

- A mis grandes amigos David y Mirna, Minerva y Jose Jorge, por su gran amistad, apoyo y consejos que me han servido para seguir adelante.

- A todas las personas y amigos de Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, en especial a Julio, Javi, Pablo, Cristina, por su gran ayuda en las técnicas de laboratorio necesarias para este trabajo de Tesis.

- A mi familia, por su gran apoyo, palabras de amor, a mi madre por su abnegación, por todos esos momentos que aunque no fueran buenos, ella siempre me hacía sentir bien y con ganas de seguir adelante con este proyecto, apoyo que jamás olvidaré ni podré llegar a compensar, muchas gracias Camo. A mi padre por su asesoría, consejos e impulso para comenzar esta nueva etapa en mi vida profesional.

- A mis hermanas por su cariño, por todas las palabras de ánimo, por su confianza y por estar simplemente ahí, apoyando a la familia en mi ausencia.

- A changuito por su inexplicable valor, y por su puesto a mi sobrinito Pelle, pues son un gran motivo para terminar este trabajo.

- A mis cuñados, Sergio Santiago y Mario Pérez, por su gran amistad, por apoyarme a mi y a toda mi familia en todo este tiempo, se los agradeceré siempre.

ÍNDICE DE TABLAS	XVI
ÍNDICE DE FIGURAS	XXI
GLOSARIO DE ABREVIATURAS	XXVI
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 TRACTO REPRODUCTOR DEL MACHO.....	10
2.1.1 Testículo.....	10
2.1.2 Epidídimo.....	11
2.1.3 Pene.....	12
2.1.4 Glándulas anejas.....	12
2.1.4.1 Glándulas bulbouretrales.....	12
2.1.4.2 Glándula prostática.....	12
2.1.4.3 Vesículas seminales.....	13
2.2 Espermatozoide.....	14
2.2.1 Espermatogénesis.....	14
2.2.1.1 División celular.....	15
2.2.1.2 Espermiogénesis.....	16
2.2.2 Morfología del espermatozoide.....	16
2.2.2.1 Cabeza.....	16
2.2.2.2 Cuello.....	17
2.2.2.3 Cola o flagelo.....	18
2.2.2.4 Membrana citoplasmática.....	20

2.3 REFRIGERACIÓN DEL SEMEN.....	22
2.3.1 Antecedentes.....	22
2.3.2 Medios de conservación en refrigeración.....	24
2.4 CONGELACIÓN DEL SEMEN.....	28
2.4.1 Antecedentes.....	28
2.4.2 Utilización del semen congelado.....	29
2.4.3 Proceso de criopreservación.....	32
2.4.4 Efectos de la congelación y descongelación sobre el espermatozoide.....	32
2.4.5 Efectos sobre la estructura y funcionalidad espermática.....	36
2.4.6 Efectos sobre la membrana.....	36
2.4.7 Efectos sobre el citoesqueleto.....	39
2.4.8 Efectos sobre el núcleo.....	39
2.4.9 Efectos sobre la capacidad fecundante.....	41
2.4.10 Efectos del crioprotector.....	43
2.4.11 Diluyentes.....	44
2.4.12 Componentes de los diluyentes.....	45
2.4.13 Envases o geometría de congelación.....	46
2.5 SUSTANCIAS REACTIVAS DEL OXIGENO.....	50
2.5.1 Peroxidación Lipídica.....	50
2.5.2 Efectos sobre los lípidos.....	51
2.5.3 Efecto sobre las proteínas.....	53
2.5.4 Efecto sobre el ADN.....	53
2.5.5 Daño oxidativo sobre los espermatozoides.....	54

2.6 ANTIOXIDANTES.....	56
2.6.1 Clasificación de los antioxidantes.....	57
2.6.2 Antioxidantes naturales.....	59
2.6.2.1 Antioxidantes enzimáticos.....	59
2.6.2.2 Antioxidantes no enzimáticos.....	61
2.6.2.3 Función antioxidante de los metales.....	63
2.6.3 Antioxidantes sintéticos.....	64
2.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS SEMINAL.....	65
2.7.1 Evaluación de la movilidad espermática.....	67
2.7.2 Parámetros medidos por el sistema CASA.....	67
2.7.3 Evaluación de la morfología espermática.....	70
2.7.4 Evaluación de la integridad de la membrana.....	72
2.7.5 Evaluación de la integridad del acrosoma.....	75
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
3.1 PRODUCTOS Y SOLUCIONES.....	81
3.2 ANIMALES EMPLEADOS.....	84
3.3 RECOLECCIÓN DEL SEMEN.....	85
3.4 VALORACIÓN CONVENCIONAL DEL SEMEN.....	86
3.5 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA.....	88
3.6 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ACROSOMA.....	89
3.7 VALORACIÓN DE LA RESISTENCIA OSMÓTICA (ORT).....	90
3.8 VALORACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA DEL ESPERMATOZOIDE.....	91

3.9 PREPARACIÓN DE DOSIS COMERCIALES.....	92
3.10 CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN.....	92
3.11 TEST DE TERMORRESISTENCIA.....	95
3.12 METODOLOGÍA PARA LA VALORACIÓN DE LA MOVILIDAD MEDIANTE EL EQUIPO <i>INTEGRED SEMEN ANALYSIS SYSTEM</i> ® (<i>ISAS</i> ®).....	96
3.13 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	98
3.13.1 Experimento 1.....	98
3.13.2 Experimento 2.....	100
3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	107
4. RESULTADOS.....	109
4.1 EXPERIMENTO 1. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN REFRIGERADO A 15°C MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol /Glutación reducido), Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.....	111
4.1.1 Efecto de un Análogo de la Vitamina E, y del Glutación Reducido sobre la integridad de la membrana.....	111
4.1.2 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutación Reducido sobre la integridad del acrosoma.....	116
4.1.3 Efecto de un análogo de la vitamina E y del Glutación reducido sobre la movilidad espermática.....	121
4.1.4 Efecto del Vitamina E y del Glutación reducido sobre la Peroxidación Lipídica.....	137
4.1.5 Correlaciones de Pearson entre la Peroxidación Lipídica y la integridad de la membrana, integridad del acrosoma y movilidad.....	142
4.2 EXPERIMENTO 2. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol / Glutación reducido), Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.....	147

4.2.1 Efecto de un Análogo de la Vitamina E, y del Glutati3n Reducido sobre la integridad de la membrana.....	147
4.2.2 Efecto del An3logo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre la integridad del acrosoma.....	152
4.2.3 Efecto de un an3logo de la vitamina E y del Glutati3n reducido sobre la movilidad esperm3tica.....	157
4.2.4 Efecto del Vitamina E y del Glutati3n reducido sobre la Peroxidaci3n Lipídica.....	175
4.2.5 Correlaciones de Pearson entre la Peroxidaci3n Lipídica y la integridad de la membrana, integridad del acrosoma y movilidad.....	177
5. DISCUSI3N.....	181
5.1 EXPERIMENTO 1. CONTROL DE LA PEROXIDACI3N LIPÍDICA DEL SEMEN REFRIGERADO A 15°C MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol /Glutati3n reducido), Y SU REPERCUSI3N SOBRE LA CALIDAD ESPERM3TICA.....	183
5.1.1 Efecto del An3logo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre la integridad de la membrana, estado del acrosoma y movilidad en semen refrigerado.....	183
5.1.2 Efecto del An3logo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre los par3metros cin3ticos en semen refrigerado.....	188
5.1.3 Efecto del An3logo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre la Peroxidaci3n Lipídica en semen refrigerado.....	192
5.2 EXPERIMENTO 2. CONTROL DE LA PEROXIDACI3N LIPÍDICA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol/Glutati3n reducido), Y SU REPERCUSI3N SOBRE LA CALIDAD ESPERM3TICA.....	195
5.2.1 Efecto del An3logo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre la integridad de la membrana, estado del acrosoma y movilidad en semen descongelado.....	195
5.2.2 Efecto del An3logo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre los par3metros cin3ticos en semen descongelado.....	200
5.2.3 Efecto del An3logo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre la Peroxidaci3n Lipídica en semen descongelado.....	204
6. CONCLUSIONES.....	209

7. RESUMEN	214
8. SUMMARY	220
8. BIBLIOGRAFÍA	228
9. ANEXOS	256

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Censo del Ganado Porcino en España.....	3
Tabla 2. Composición de los diluyentes empleados en la congelación de semen de verraco.....	45
Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes según su sitio de acción.....	57
Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes según su origen.....	58
Tabla 5. Reactivos.....	81
Tabla 6. Diluyente de Refrigeración.....	82
Tabla 7. Diluyente de Congelación.....	82
Tabla 8. Solución stock de Glutaraldehido al 2%.....	82
Tabla 9. Solución Formolada.....	82
Tabla 10. Solución stock de Ioduro de Propidio.....	82
Tabla 11. Solución Stock de Acetato Carboxifluoresceina.....	83
Tabla 12. Ácido Tricloracetico al 20%.....	83
Tabla 13. Ácido Tiobarbiturico 0.67%.....	83
Tabla 14. Verracos utilizados.....	84
Tabla 15. Composición del pienso C-7 [®] (Uvesa).....	85
Tabla 16. Evolución de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos.....	111
Tabla 17. Evolución de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre los tres grupos.....	116
Tabla 18. Evolución de la movilidad (%) entre los tres grupos.....	121
Tabla 19. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos para el día 0	126
Tabla 20. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos para el día 5.....	127

Tabla 21. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos para el día 7	128
Tabla 22. Evolución de la Peroxidación Lipídica (mmol TBARS/10 ⁶) entre los tres grupos.....	137
Tabla 23. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Integridad de la membrana en el grupo Control.....	142
Tabla 24. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Integridad de la membrana en el grupo Vitamina E.....	143
Tabla 25. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Integridad de la membrana en el grupo Glutación.....	143
Tabla 26. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Integridad del Acrosoma en el grupo Control.....	144
Tabla 27. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Integridad del Acrosoma en el grupo Vitamina E.....	144
Tabla 28. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Integridad del Acrosoma en el grupo Glutación.....	145
Tabla 29. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Movilidad en el grupo Control.....	145
Tabla 30. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Movilidad en el grupo Vitamina E	146
Tabla 32. Correlación de Pearson entre la Peroxidación y la Movilidad en el grupo Glutación....	146
Tabla 32. Evolución de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos.....	147
Tabla 33. Evolución de la Integridad del acrosoma (% de acrosomas íntegros) entre los tres grupos.....	152
Tabla 34. Evolución de la Movilidad (% total) entre los tres grupos.....	157
Tabla 35. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 0 tras la descongelación.....	162
Tabla 36. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 1 tras la descongelación.....	163
Tabla 37. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 2 tras la descongelación.....	164

Tabla 38. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 3 tras la descongelación.....	165
Tabla 39. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 4 tras la descongelación.....	166
Tabla 40. Evolución de la Peroxidación Lipídica (mmol TBARS/10 ⁶ espermatozoides) entre los tres grupos.....	175
Tabla 41. Correlaciones de Pearson entre los parámetros de calidad seminal y la Peroxidación Lipídica en el grupo Control.....	177
Tabla 42. Correlaciones de Pearson entre los parámetros de calidad seminal y la Peroxidación Lipídica en el grupo Vitamina E.....	178
Tabla 43. Correlaciones de Pearson entre los parámetros de calidad seminal y la Peroxidación Lipídica en el grupo Glutación.....	179
Tabla 44. Volumen y concentración espermática/ml en los eyaculados de cada verraco.....	259
Tabla 45. Valoración morfológica de los eyaculados.....	259
Tabla 46. Valoración subjetiva del porcentaje de movilidad y la calidad del movimiento.....	260
Tabla 47. Valoración de la Resistencia Osmótica.....	260
Tabla 48. Valoración de la Integridad de la membrana el día 0 en semen refrigerado 15°C	261
Tabla 49. Valoración de la Integridad de la membrana el día 5 en semen refrigerado a 15°C	261
Tabla 50. Valoración de la Integridad de la membrana el día 7 en semen refrigerado a 15°C.....	262
Tabla 51. Valoración del Estado del acrosoma el día 0 en semen refrigerado a 15°C.....	262
Tabla 52. Valoración del Estado del acrosoma el día 5 en semen refrigerado a 15°C.....	263
Tabla 53. Valoración del Estado del acrosoma el día 7 en semen refrigerado a 15°C.....	263
Tabla 54. Valoración de la movilidad (% total) el día 0 en semen refrigerado a 15°C.....	264
Tabla 55. Valoración de la movilidad (% total) el día 5 en semen refrigerado a 15°C.....	264
Tabla 56. Valoración de la movilidad (% total) el día 7 en semen refrigerado a 15°C.....	265

Tabla 57. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 0 en semen refrigerado a 15°C.....	266
Tabla 58. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 0 en semen refrigerado a 15°C.....	267
Tabla 59. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 5 en semen refrigerado a 15°C.....	268
Tabla 60. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 5 en semen refrigerado a 15°C.....	279
Tabla 61. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 7 en semen refrigerado a 15°C.....	270
Tabla 62. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 7 en semen refrigerado a 15°C.....	271
Tabla 63. Valoración de la Peroxidación Lipídica el día 0 en semen refrigerado a 15°C.....	272
Tabla 64. Valoración de la Peroxidación Lipídica el día 5 en semen refrigerado a 15°C.....	272
Tabla 65. Valoración de la Peroxidación Lipídica el día 7 en semen refrigerado a 15°C.....	273
Tabla 66. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 0 en semen descongelado.....	273
Tabla 67. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 1 en semen descongelado.....	274
Tabla 68. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 2 en semen descongelado.....	274
Tabla 69. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 3 en semen descongelado.....	275
Tabla 70. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 4 en semen descongelado.....	275
Tabla 71. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 0 en semen descongelado.....	276
Tabla 72. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 1 en semen descongelado.....	276
Tabla 73. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 2 en semen descongelado.....	277
Tabla 74. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 3 en semen descongelado.....	277
Tabla 75. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 4 en semen descongelado.....	278
Tabla 76. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 0 en semen descongelado.....	278
Tabla 77. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 1 en semen descongelado.....	279
Tabla 78. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 2 en semen descongelado.....	279
Tabla 79. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 3 en semen descongelado.....	280

Tabla 80. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 4 en semen descongelado.....	280
Tabla 81. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 0 en semen descongelado.....	281
Tabla 82. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 0 en semen descongelado.....	282
Tabla 83. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 1 en semen descongelado.....	283
Tabla 84. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 1 en semen descongelado.....	284
Tabla 85. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 2 en semen descongelado.....	285
Tabla 86. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 2 en semen descongelado.....	286
Tabla 87. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 3 en semen descongelado.....	287
Tabla 88. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 3 en semen descongelado.....	288
Tabla 89. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 4 en semen descongelado.....	289
Tabla 90. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 4 en semen descongelado.....	290
Tabla 91. Valoración de la Peroxidación Lipídica en el semen descongelado.....	291

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista sagital del aparato reproductor del verraco.....	14
Figura 2. Vista dorsal (A) y corte sagital (B) de la cabeza espermática	17
Figura 3. Espermiogénesis o Espermatohistogénesis.....	19
Figura 4. Estructura de la Membrana plasmática	21
Figura 5. Biocongelador conectado al tanque de nitrógeno líquido.....	29
Figura 6. Empleo del semen criopreservado en IA en el mundo.....	31
Figura 7. Representación esquemática del daño producido por los radicales libres en los fosfolípidos de las membranas celulares	52
Figura 8. Representación de los daños producidos por la peroxidación lipídica a la célula y producción de MDA	55
Figura 9. Acción del antioxidante frente a los radicales libres.....	56
Figura 10. (A) Maniquí para extracción de semen. (B) Termo para la recolección de semen.....	86
Figura 11. Anormalidades en el espermatozoide de verraco.	88
Figura 12. Valoración de la integridad de membrana.	89
Figura 13. Valoración de la integridad del acrosoma.	90
Figura 14. Imágenes bajo contraste de fases de diferentes estados de la vesícula acrosómica, en función de su morfología.....	90
Figura 15. Régimen de enfriamiento utilizado en la congelación del semen.....	94
Figura 16. Cámara Makler.....	96

Figura 17. Captura del programa CASA.....	97
Figura 18. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas desde la recogida hasta la refrigeración del semen a 15°C.....	102
Figura 19. Diagrama de flujo de la operaciones realizadas durante los días del experimento con semen refrigerado.....	103
Figura 20. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas en el proceso de congelacion de semen.....	104
Figura 21. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas una vez hecha la descongelación.....	105
Figura 22. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas en la valoración de los niveles de Peroxidación una vez hecha la descongelación.....	106
Figura 23. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos...	112
Figura 24. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y el grupo Vitamina E.....	113
Figura 25. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y el grupo Glutación.....	114
Figura 26. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Vitamina E y el grupo Glutacion.	115
Figura 27. Diferencia de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control, Vitamina E y Glutación.....	117
Figura 28. Diferencia de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y Vitamina E.....	118
Figura 29. Diferencias de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y Glutación.....	119
Figura 30. Diferencia de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Vitamina E y Glutación.....	120

Figura 31. Diferencia de la movilidad total (%) entre los tres grupos.....	122
Figura 32. Diferencia de la movilidad total (%) entre Control y Vitamina E.....	123
Figura 33. Diferencia de la movilidad total (%) entre Control y Glutación.....	124
Figura 34. Diferencia de la movilidad total (%) entre Vitamina E y Glutación.....	125
Figura 35. Diferencia de la Velocidad Curvilínea ($\mu\text{m/s}$) entre grupos.....	129
Figura 36. Diferencia de la Velocidad Rectilínea ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.....	130
Figura 37. Diferencia de la Velocidad Media ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.....	131
Figura 38. Diferencia del Índice de Linealidad (%) entre los tres grupos.....	132
Figura 39. Diferencia del Índice de Rectitud (%) entre los tres grupos.....	133
Figura 40. Diferencia del Índice de Oscilación (%) entre los tres grupos.....	134
Figura 41. Diferencia de la Amplitud de Desplazamiento de la cabeza (μm) entre grupos.....	135
Figura 42. Diferencia en la Frecuencia de Batido (Hz) entre los tres grupos.....	136
Figura 43. Diferencia de la Peroxidación Lipídica ($\text{mmol TBARS}/10^6$ espermatozoides) entre los tres grupos.....	138
Figura 44. Diferencia de la Peroxidación Lipídica ($\text{mmol TBARS}/10^6$ espermatozoides) entre Control y Vitamina E.....	139
Figura 45. Diferencia de la Peroxidación Lipídica ($\text{mmol TBARS}/10^6$ espermatozoides) entre Control y Glutación.....	140
Figura 46. Diferencia de la Peroxidación Lipídica ($\text{mmol TBARS}/10^6$ espermatozoides) entre Vitamina E y Glutación.....	141
Figura 47. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos....	148

Figura 48. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y el grupo Vitamina E.....	149
Figura 49. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y Glutación.....	150
Figura 50. Diferencia de la Integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Vitamina E y Glutación.	151
Figura 51. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre los tres grupos.....	153
Figura 52. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y el grupo Vitamina E.,.....	154
Figura 53. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y el grupo Glutación.....	155
Figura 54. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y el grupo Glutación.....	156
Figura 55. Diferencia en la movilidad (% total) entre los tres grupos.....	158
Figura 56. Diferencia en la movilidad (% total) entre el grupo Control y Vitamina E.....	159
Figura 57. Diferencia en la movilidad (% total) entre grupo Control y Glutación.....	160
Figura 58. Diferencia en la movilidad (% total) entre el grupo Vitamina E y Glutación.....	161
Figura 59. Diferencia en la Velocidad Curvilínea ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.....	167
Figura 60. Diferencia en la Velocidad Lineal ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.....	168
Figura 61. Diferencia en la Velocidad Media ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.....	169
Figura 62. Diferencia en el Índice de linealidad (%) entre los tres grupos.....	170
Figura 63. Diferencia en el Índice de Rectitud (%) entre los tres grupos.....	171
Figura 64. Diferencia del Índice de Oscilacion (%) entre los tres grupos.....	172

Figura 65. Diferencia de la Amplitud de Desplazamiento de la cabeza (μm) entre grupos.....173

Figura 66. Diferencia en la Frecuencia de Batido (Hz) entre los tres grupos.....174

Figura 67. Diferencia en la presencia de Peroxidación Lipídica entre los tres grupos.....176

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ADN.	Ácido desoxirribonucleico
ADP.	Adenosin difosfato
AGP.	Ácidos grasos poliinsaturados
ALH.	Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide.
AMPc.	Adenosin Mono Fosfato cíclico.
ANOVA.	Análisis de varianza
ASMA.	Automated Semen Morphology Analysis
ATP.	3'-5' Adenosin trifosfato.
ATPasa.	Enzima que hidroliza ATP en ADP
BCF.	Frecuencia de batido.
BHA.	Butil hidroxianisol
BHT.	Butil hidroxitolueno
BSA.	Albumina sérica bovina.
BTS.	Beltsville Thawing Solution (solución " <i>Beltsville</i> " de descongelación)
CASA.	Computer Analisis Semen Assisted.
CAT.	Catalasa

CD46.	Proteína cofactor de la membrana.
CENTROTEC.	Centro Tecnológico de Inseminación Artificial.
DMSO.	Dimetil sulfóxido.
EDTA.	Ácido etileno diaminetetra-acético.
ELISA.	Ensayo inmunoenzimático
FITC.	Isotiocianato de fluoresceína
g.	Gramos.
GR.	Glutación reductasa
GSH.	Glutación Reducido.
GSH-Prx.	(GPx) Enzima Glutación peroxidasa.
GSSH.	Glutación Oxidado
GST.	Glutación Transferasa.
Hoechst A23187.	Tinción fluorescente específica del ADN.
Hz.	Hercio.
IA.	Inseminación artificial.
ISAS [®] .	INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM.
LIN.	Índice de linealidad.

LTI.	Laboratorio de técnicas instrumentales.
M.	Molar.
MDA.	Malondialdehido
ml.	Mililitro.
mm.	Milímetro.
mM.	Milimolar.
MMARM.	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
MR-A	Diluyente comercial para semen porcino.
NADHP.	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
nm.	Nanómetro.
ORT.	Prueba de Resitencia Osmotica (Test de Resistencia Osmótica).
PBS.	Phosphate Buffered Saline (Solución amortiguadora de sales de fosfato).
PET.	Tereftalato de polietileno.
PHGPx.	Enzima Fosfolípido Hidroperóxido Glutación peroxidasa
PKA.	Proteín kinasa a.
PNA.	Aglutinina de <i>Arachis hypogea</i>

PSA.	Aglutinina de <i>Pisum Sativum</i>
PVC.	Policloruró de vinilo.
RA.	Reacción acrosomal.
ROS.	Sustancias reactivas del oxígeno
r.	Correlación
SOD.	Superóxido dismutasa
SRT.	Índice de rectitud.
SYBR-14.	Agente intercalante utilizado en la tinción de ADN.
TBARS.	Sustancias Reactivas del Ácido Tiobarbiturico.
TBHQ.	Terc Butil hidroquinona
TCA.	Ácido tricloracetico.
U.I.	Unidades internacionales.
VAP.	Velocidad Media.
VCL.	Velocidad curvilínea.
VSL.	Velocidad lineal.
WGA.	Aglutinina <i>Triticum vulgaris</i>
WOB.	Índice de oscilación.

ZP.	Zona pelúcida.
μm .	Micrómetro.
μM .	Micromolar.
$\mu\text{m/s}$.	Micrómetro/segundo.

1. Introducción y Objetivos

Dentro de la ganadería, el sector porcino en España es el más importante, ocupando el segundo puesto a nivel europeo en producción porcina, por lo tanto podemos considerar a este sector de gran importancia en la economía española, por lo que cualquier medida que suponga una mejoría en la producción de este sector es de gran relevancia.

Según datos del MMARM, el subsector porcino en España supone el 34% de la producción ganadera final y el 12% de la producción agraria final, que suman 25 millones de animales (tabla 1), de los cuales un porcentaje considerable se destinan a la industria de transformación, como son mataderos industriales, secaderos de jamones, elaboración de embutidos, entre otros (MMARM. Estadística Noviembre, 2009).

Tabla 1. Censo del Ganado Porcino en España. (MMARM. Estadística Noviembre, 2009)

Ganado porcino	Resultados encuesta Noviembre 2009
Total de animales	25.342.606
Lechones	6.591.179
Cerdos de 20 a 49 kg	5.314.091
Total Cerdos de cebo	10.944.740
Cebo de 50 a 79 kg	4.748.555
Cebo de 80 a 109 kg	4.868.915
Cebo más de 109 kg	1.327.271
Verracos	52.638
Total cerdas reproductoras	2.439.958
Cerdas nunca cubiertas	190.322
Cerdas cubiertas 1ª vez	220.407
Cerdas cubiertas más veces	1.460.072
Cerdas criando o reposo	569.157

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, que es de interés en nuestro trabajo, debemos decir que, más del 80% de las hembras reproductoras fueron inseminadas con semen conservado fresco o en refrigeración (Gadea, 2004), en este sector la utilización del semen criopreservado, no presenta el mismo grado de aplicación que se puede ver en el sector bovino, donde la inseminación con semen descongelado brinda altos rendimientos, puesto

que en el caso de la especie porcina el rendimiento de la inseminación con semen criopreservado se encuentra por debajo de la obtenida con semen fresco/refrigerado, por lo que la preferencia se ha decantado hacia este último.

Cuando se realiza la inseminación artificial (IA) con semen criopreservado los rendimientos se encuentran alrededor del 50% de partos y una prolificidad de 7 lechones por camada (Johnson *et al.*, 2000), lo que anula el resto de beneficios del empleo de la congelación como medio de almacenamiento, no siendo así en el caso de realizar la IA con semen fresco/refrigerado pues con esta técnica se han obtenido resultados equiparables o superiores a los obtenidos con la monta natural (Colenbrander *et al.*, 1993)

Aunque de momento la utilización de semen descongelado en la producción intensiva no es generalizada, se sigue con la investigación en el área de la congelación del semen porcino, no solo para mejorar las líneas genéticas, también para poder incluir esta técnica en la producción porcina intensiva.

La utilización de la IA con semen refrigerado 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 2-5 días.

A pesar de los resultados obtenidos en la IA con semen refrigerado, el uso de semen descongelado presenta algunas ventajas en comparación al semen refrigerado (Gadea, 2004):

- ✓ El intercambio de material genético a larga distancia y durante un periodo muy largo (años).
- ✓ La creación de bancos genéticos. De evidente interés en el caso de la conservación de razas en peligro de extinción y de grandes posibilidades para la conservación de líneas o estirpes de especial interés.

Todas las células vivas producen bajo condiciones aeróbicas sustancias reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales se originan principalmente de funciones metabólicas normales de la misma célula (Brouwers *et al.*, 2005). Las células espermáticas de los mamíferos presentan en su estructura ácidos grasos poliinsaturados (AGP), especialmente la raza 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 (PL) (Dorota y Maciej, 2004).

La alta concentración de AGP en la membrana plasmática de los espermatozoides y el pequeño tamaño de su citoplasma favorecen la producción de ROS, perjudicando el correcto funcionamiento de la célula espermática, funciones tales como movilidad y vitalidad, con su consecuente pérdida de la capacidad de fusión esperma-ovocito (Saezet *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2001; Álvarez, 2006). Los ROS inducen peroxidación de AGP esterificados a fosfolípidos de membrana, lo cual produce alteraciones en la permeabilidad del plasmalema, es decir, provoca la aparición de puntos en la membrana (orificios), lo que conduce a una pérdida de la vitalidad y movilidad.

Los procesos de refrigeración y congelación producen alteraciones de carácter físico y químico sobre las membranas de los espermatozoides, teniendo como consecuencia la reducción de la viabilidad celular y por lo tanto de su capacidad fecundante. Las alteraciones producidas por el descenso de temperatura están asociadas con el llamado estrés oxidativo, que se genera por la acción de los ROS.

Sin embargo en los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo para mejorar la fertilidad del semen descongelado utilizado en la IA, obteniéndose a nivel experimental resultados muy prometedores, que suponen porcentajes de partos del 70% (Eriksson *et al.*, 2002; Sellés *et al.*, 2003; Roca *et al.*, 2003; Bolarin *et al.*, 2006). En cualquier caso, se debe desterrar la idea muy difundida entre el sector que afirma que los espermatozoides porcinos no se pueden congelar de forma adecuada y su uso no permite unos rendimientos reproductivos aceptables.

La conservación de semen fresco y refrigerado con la finalidad de realizar IA es la técnica más empleada, aunque esta técnica de conservación y como se ha mencionado anteriormente también presenta algunas limitaciones, en este trabajo hemos considerado que una de las principales limitaciones es el tiempo de vida útil de las dosis seminales, siendo esta de 5 días en el centro de producción donde hemos realizado nuestro trabajo (CENTROTEC), dicha caducidad está

condicionada por la producción de ROS, debida al inevitable proceso del metabolismo de los espermatozoides.

Por tal motivo y por lo que hemos mencionado anteriormente, nos hemos planteado en nuestro trabajo de Tesis Doctoral, cuantificar la presencia de peroxidación lipídica en el semen de verraco y controlar sus efectos sobre él, por lo cual empleamos un análogo de la vitamina E y glutatión reducido (GSH), tanto en la elaboración de dosis seminales refrigeradas a 15°C, como en la criopreservación del semen de verraco para disminuir el deterioro que ambos procesos provocan a las células espermáticas.

Por lo antes mencionado nos hemos planteado en este trabajo de investigación los siguientes **OBJETIVOS:**

Primero:

- Estudiar la evolución de la peroxidación lipídica del semen refrigerado de verraco conservado a 15°C durante 7 días, así como del semen criopreservado una vez descongelado y sometido a un test de termorresistencia durante 4 mediante la cuantificación del Malondialdehido (MDA) a través de la técnica de sustancia reactivas del ácido Tiobarbiturico (TBARS).

Segundo:

- Evaluar el efecto de dos antioxidantes no enzimáticos (α -tocoferol y glutatión reducido), sobre el control de la peroxidación lipídica tanto en el semen refrigerado como criopreservado de verraco.

Tercero:

- Valorar si el control de la peroxidación lipídica de los antioxidantes señalados, a dosis de 200 μ M para el α -tocoferol, y 5 mM para el glutatión reducido, añadidos, respectivamente, en el diluyente utilizado en la preparación de dosis seminales de verraco refrigeradas a 15°C, o bien en el diluyente de refrigeración, en el caso del semen criopreservado, produce algún efecto sobre la calidad espermática, objetivo que llevaremos a cabo mediante el estudio los siguientes parámetros de calidad seminal:

- Integridad de la membrana, mediante microscopía de fluorescencia.
- Integridad del acrosoma, mediante microscopia de contraste de fase positivo.
- Movilidad total y parámetros cinéticos, ambos medidos mediante la utilización de un programa informático (CASA), que valora el porcentaje de la movilidad total, así como los siguientes parámetros cinéticos: Velocidad curvilínea (VCL), Velocidad lineal (VSL), Velocidad media (VAP), Índice de linealidad (LIN), Índice de rectitud (STR), Índice de oscilación (WOB), Amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y Frecuencia de batido flagelar (BFC).

2. Revisión Bibliográfica

2.1 TRACTO REPRODUCTIVO DEL MACHO.

2.1.1 Testículo.

Es el órgano encargado de las dos funciones fundamentales en el proceso reproductivo; síntesis y secreción de hormonas (estereoidogénesis), función realizada en el seno del tejido conjuntivo intersticial (glándula diastemática), y la producción de espermatozoides (espermatogénesis), proceso que se lleva a cabo en el interior del epitelio de los túbulos seminíferos, a pesar de ser compartimentos anatómicos distintos se interrelacionan entre sí (Hafez, 2002).

El tejido conjuntivo intersticial situado entre los túbulos seminíferos en los testículos, se encuentra formado por macrófagos, linfocitos, vasos sanguíneos, tejido conjuntivo, vasos linfáticos y distintos tipos de células entre los cuales destacan las células de Leydig, las cuales presentan una forma poliédrica y se agrupan en pequeños cúmulos o islotes distribuidos por todo el tejido intertubular (cuyo conjunto se denomina glándula diastemática testicular), estas células tienen capacidad de producir hormonas de carácter esteroide y no esteroide, dentro de las hormonas producidas, las que destacan por su importancia reproductiva son la testosterona y la 5- α -dihidrotestosterona, cuyas funciones son la de permitir la diferenciación sexual, control de la producción de gametos (especialmente en la espermatohistogénesis), y el mantenimiento de la homeostasis endocrina del macho (Skinner, 1991; Hedger y Meinhardt, 2003; Tejerina, 2007).

El epitelio de los túbulos seminíferos, está formado por dos tipos de células, las células de Sertoli y las células de la línea germinal, las células de Sertoli son de gran tamaño, poseen una cantidad elevada de retículo endoplásmico liso, en su porción apical cilíndrica presenta un sistema complejo de delgadas prolongaciones que rodean a la célula germinal, y ocupan los intersticios que hay entre ellas. Este tipo de células, tienen como funciones la nutrición, aislamiento de la circulación general (barrera hematotesticular), y el apoyo estructural a las células germinales para favorecer su proliferación, desarrollo y diferenciación; también ayudan al movimiento de las células germinales dentro del túbulo seminífero y la liberación de los espermatozoides a la luz del túbulo seminífero (espermiación) (Skinner 1991; Hedger and Meinhardt, 2003; Bernal, 2009).

Las células germinales se multiplican en el epitelio germinal, llevan a cabo divisiones celulares y terminan transformándose en espermatozoides, se encuentran ordenadas en una serie de estados bien definidos, dicha secuencia de estados se denomina “ciclo del epitelio seminífero”, en el caso del verraco, éste ciclo tiene una duración de 8-6 días, requiriéndose para el desarrollo de la espermatogénesis un total de 4 ciclos, cuya duración total es de 34 días, estas células poseen capacidad de realizar meiosis, lo que las diferencia del resto de las células del organismo, su diferenciación es temprana en el embrión y están interconectadas por medio de puentes intercelulares, lo que permite la formación de grupos celulares en la misma fase de desarrollo (Swierstra, 1968).

2.1.2 Epidídimo.

Es una doble estructura contorneada, que en el verraco tienen una longitud de 54 m y al igual que todas las especies de mamíferos, se divide en tres porciones anatómicas; cabeza, cuerpo y cola. La cabeza, en la que se unen un número variable de conductos eferentes; el cuerpo, que presenta forma estrecha, que continúa y termina hasta la cauda epididimal, formando la porción conocida como cola. El epidídimo, estructuralmente está formado por una capa serosa, una doble capa muscular lisa longitudinal y circular y una capa epitelial de revestimiento, encontrándose tejido conectivo laxo entre las distintas capas, siendo el epitelio de epidídimo pseudoestratificado con células de gran tamaño columnares, los espermatozoides acceden a él a través de los conductos eferentes donde se produce un proceso de maduración y almacenamiento, lo cual significa que los espermatozoides adquieren la movilidad y capacidad de fecundar un ovocito de forma natural (Wilson *et al.*, 1981; Hafez, 2002).

El fluido de la luz del epidídimo contiene diversas proteínas, las cuales son secretadas a lo largo del conducto; el tipo de proteína, varía dependiendo de la región del epidídimo, estas proteínas son las responsables de los cambios en la membrana y en los patrones de movimiento en los espermatozoides, también actúan como moléculas transportadoras de compuestos liposolubles, participan en la protección de la membrana del espermatozoide, inducen el movimiento progresivo de los espermatozoides, evitan su aglutinación y aumenta su capacidad fecundante tanto *in vitro* como *in vivo*, toda esta función secretora es dependiente de las hormonas esteroideas, secretadas por las células de Leydig (Testosterona y 5- α -dihidrotestosterona) (Cooper, 1998).

2.1.3 Pene.

El pene del cerdo sexualmente activo, tiene una longitud de 50-75 cm. y 2 cm. de diámetro. En su extremo presenta un giro en forma de sacacorchos. Dos músculos retractores se unen a la parte ventral anterior de la flexión sigmoidea, en el caso del cerdo, su tamaño es grande, estos músculos son capaces de controlar la longitud del pene, por la acción que ejercen en el pliegue sigmoideo (Wilson *et al.*, 1981).

Prepucio. Se puede dividir en dos porciones, la porción peneana y la prepeneana. En el caso del verraco, el prepucio consta de un pequeño vestíbulo con un orificio externo estrecho, y se observa un gran divertículo dorsal en el que se acumulan orina y material de desecho epiteliales, cuya presencia es causa de contaminación al momento de la obtención del eyaculado.

2.1.4 Glándulas Anejas.

2.1.4.1 Glándulas bulbouretrales. Son glándulas pares se localizan dorsalmente a la uretra, en la porción posterior a la glándula prostática, rodeadas por el musculo isquioglandular. En el eyaculado la secreción de estas glándulas representa el 15-30% del total, la secreción es de naturaleza viscosa y con aspecto gelatinoso, la principal función atribuida es la de ocluir el cérvix para evitar el reflujo del semen (Córdova *et al.*, 2007).

2.1.4.2 Glándula prostática. Su secreción contiene ácido cítrico, fosfatasa ácida y fibrinolisisina, el compuesto que destaca en la secreción de la glándula prostática es el ácido cítrico, ya que es el responsable del mantenimiento del equilibrio osmótico, activa la fosfatasa ácida, favorece la de los espermatozoides con ayuda de iones de sodio y potasio, debido al carácter alcalino de su secreción neutraliza el plasma seminal que tiende a acidificarse debido a la acumulación de dióxido de carbono metabólico y lactato, inicia los movimientos activos de los espermatozoides y ayuda a la neutralización del pH vaginal.

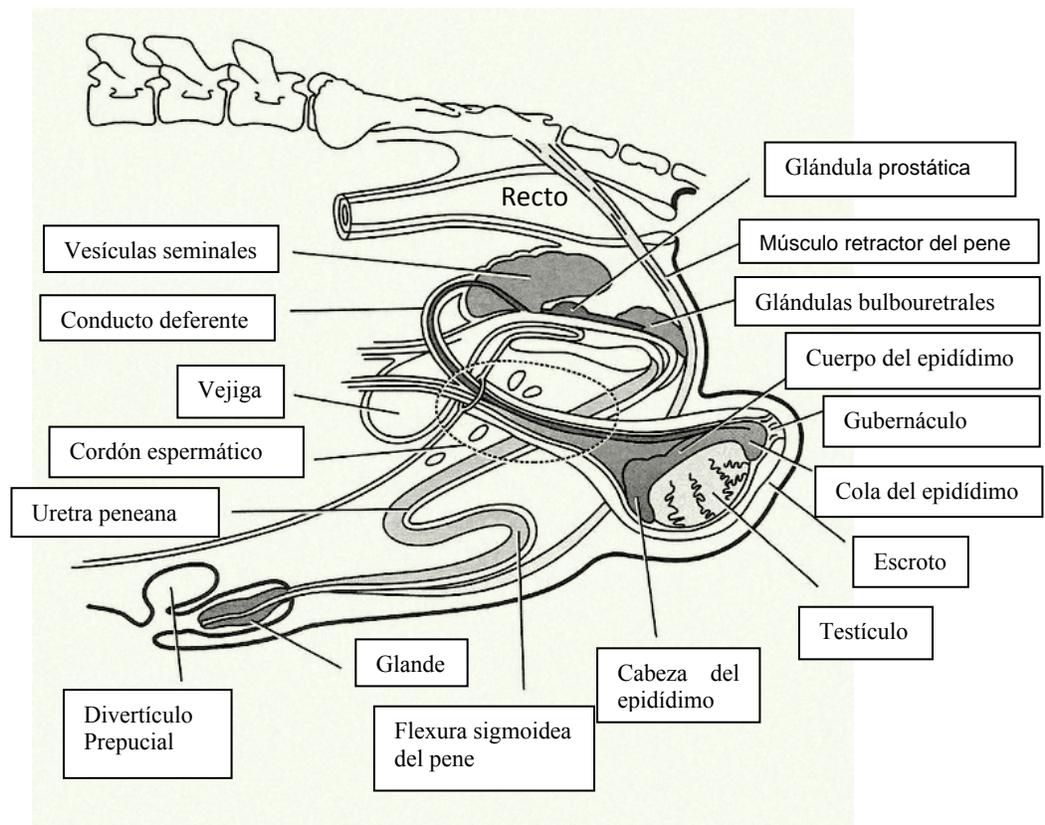
La glándula prostática está compuesta por un número variable de glándulas tubuloalveolares individuales derivadas del epitelio de la uretra pélvica, se distinguen dos porciones una interna (*par disseminata prostatae*) o diseminada bien desarrollada que rodea la uretra pelviana y una externa

en forma de placa (*corpus prostaticae*) (Wrobel y Dellmann, 1993). Es responsable también de la secreción de zinc en forma de iones libres y unidos a proteínas, dentro de las funciones que se le atribuyen, están la estabilidad de la membrana plasmática y de la cromatina nuclear, tienen relación con el contenido proteico en el plasma seminal, la presencia de zinc se ha relacionado con el consumo de oxígeno por los espermatozoides y su movimiento, ya que se ha visto que en concentraciones bajas la calidad seminal se ve disminuida (Sáiz y Marigorta, 2003; Córdova *et al.*, 2007).

2.1.4.3 Vesículas seminales. Son dos glándulas pares, compuestas, tubuloalveolares, su conducto de secreción y el conducto eferente comparten un conducto eyaculatorio común que se abre a la uretra, su secreción presenta un color blanco o amarillento de consistencia gelatinosa. También denominadas como glándulas seminales ubicadas dorsalmente a la uretra y próximas a su nacimiento. La secreción de esta glándula representa el componente mayoritario del semen del verraco, la secreción funciona como fuente de energía para los espermatozoides ya que es rica en fructosa y monosacáridos, sobre todo en condiciones anaerobias, guarda relación con la movilidad inicial de los espermatozoides, hay presencia también de diversos aminoácidos, ácido cítrico, inhibidores de la acrosina y un elevado contenido de ergotioneína e inositol (Wrobel y Dellmann, 1993; Hafez, 2002; Strzezek, 2002; Rodríguez-Martínez, 2003a)

Las proteínas segregadas por la glándula seminal representan el 80-90% del total de las proteínas presentes en el semen, cumplen diversas funciones como la de cubrir y proteger la superficie de los espermatozoides y aumentar la movilidad (Moore y Hibbit, 1977; Strzezek, 2002).

Figura 1. Vista sagital del aparato reproductor del verraco. (Tejerina, 2007).



2.2 Espermatozoide.

El espermatozoide es una célula haploide, que contiene el 50% de información genética necesaria para la formación de un nuevo individuo, dicha información procede del padre. Para su formación es necesario un proceso que se describe a continuación.

2.2.1 Espermatogénesis. A partir de los gonocitos primordiales, los cuales son células germinales que producen espermatogonias, las cuales, dentro de este proceso y en el epitelio de los túbulos seminíferos, sufren una serie de transformaciones que culminan con la formación de los espermatozoides.

Existe una fase denominada “Fase proliferativa”, en la cual las espermatogonias que son células diploides, entran en meiosis que tendrá como resultado la producción de generaciones de células cada vez más especializadas, llamadas espermatozoides.

2.2.1.1 División Celular. Los espermatoцитos primarios, son los que sufren la primera división meiótica, cuyas etapas se describen brevemente a continuación:

Profase. Es en la primera parte de esta etapa, en la que se produce la replicación del ADN, se produce la formación de quiasmas entre los cromosomas duplicados y es aquí en donde se lleva a cabo el intercambio de información genética.

Metafase. En esta etapa, se produce la alineación de los cromosomas en el ecuador de la célula y se fijan al huso acrosómico, previamente a esto se lleva a cabo la disolución de la membrana nuclear.

Anafase. Los cromosomas homólogos, migran hacia el extremo de las células, los centrómeros permanecen intactos.

Telofase. En esta etapa, los cromosomas completan su migración hacia los polos de la célula, se desenrollan y se forma la membrana plasmática de los futuros espermatozoides. Hasta este punto, las células hijas resultantes, se denominan espermatoцитos secundarios, cada cromosoma está formado por dos cromátidas; por lo tanto, contienen un número haploide de cromosomas, pero su contenido de ADN es diploide.

La segunda parte de la meiosis, tiene como principal diferencia que como resultado de ella, las células hijas contiene un número haploide de cromosomas. A partir de cada espermatoцитo secundario se crean dos espermátidas.

2.2.1.2 Espermiogénesis o Espermatohistogénesis. Proceso a través del cual las espermátidas sufren cambios morfológicos y maduración a espermatozoides, dentro de los cambios principales se distinguen: (figura 3).

- el desarrollo del flagelo
- la transformación del núcleo
- la formación del acrosoma
- la reorganización de los orgánulos y del citoplasma

Al final se produce la espermiación, que es el proceso de liberación de los espermatozoides a la luz de los túbulos seminíferos.

2.2.2 Morfología del espermatozoide. Los espermatozoides morfológicamente normales, son aquellos donde se puede distinguir tres regiones principales con dimensiones determinadas que a continuación se describen:

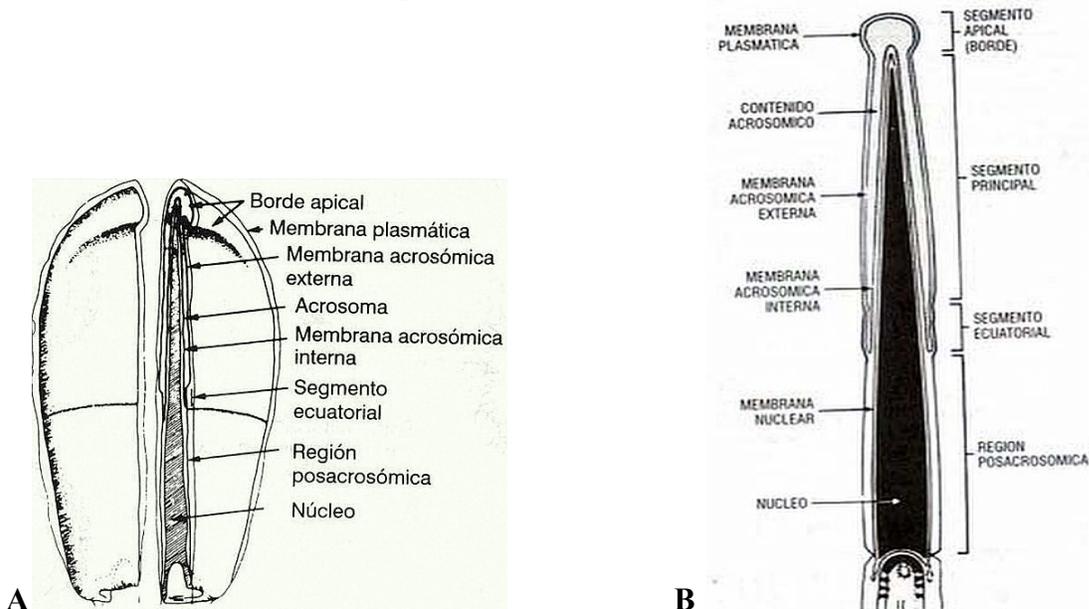
2.2.2.1 Cabeza. Oval y plana, en la que con ayuda de microscopia óptica, se aprecian una región acrosómica, una postacrosómica y un segmento ecuatorial. Con una longitud de $7.4\pm 0.5\mu\text{m}$ y con un diámetro $3.7\pm 0.4\mu\text{m}$ (Gonzalez-Urdiales *et al.*, 2006). Se pueden distinguir también una pequeña cantidad de estructuras citoesqueléticas y un pequeño citoplasma. En esta estructura anatómica, se pueden distinguir el núcleo, la zona acrosomal con su porción apical (Quintero-Moreno, 2003). (figura 2).

En la cabeza, se encuentra el núcleo que contiene la información genética, el número de cromosomas es haploide, contiene nucleoproteínas relativamente pequeñas, ricas en arginina y cisteína, la cromatina está tan condensada que no se puede replicar, éste empaquetamiento es necesario para la protección del material genético (ADN), durante el almacenamiento en el epidídimo o durante el tránsito por el aparato reproductor de la hembra (Evenson *et al.*, 2002); el proceso de condensación/descondensación de la cromatina es muy importante, ya que si no se realiza de manera correcta, pueden aparecer problemas como lesiones al ADN, en el caso de que se lleve a cabo una condensación deficiente, las lesiones se producen al quedar expuesto el ADN a agentes físicos o químicos, mientras que hipercondensación provoca el retardo en la formación del pronúcleo masculino después de la penetración del ovocito, lo que puede conducir a subdesarrollo y/o muerte embrionaria precoz (Pasteur *et al.*, 1991; Hingst *et al.*, 1995; Tejerina, 2007).

Dentro de la cabeza del espermatozoide, podemos distinguir una estructura llamada acrosoma, que se forma durante la espermatogénesis a partir del aparato de Golgi de las espermátidas (Figura 3), es una vesícula intracelular que cubre la parte anterior del núcleo, consta de dos membranas una externa y una interna. Su importancia se aprecia durante la reacción acrosómica, ya que durante dicho proceso, la membrana plasmática y acrosomal externa del espermatozoide, se unen dejando libre el contenido acrosomal, constituido principalmente por enzimas hidrolíticas siendo las más destacadas desde el punto funcional, la acrosina y la hialuronidasa, que permiten la penetración de la zona pelúcida del ovocito. La acrosina, es una proteasa que se encuentra en el acrosoma en forma de proacrosina, es una isoenzima específica del

espermatozoide, la cual se convierte a su forma activa durante la reacción acrosomal, la hialuronidasa es una glicosidasa y parece ser una enzima específica del espermatozoide, ya que difiere de la forma común de la hialuronidasa lisosomal de las células somáticas (Tejerina, 2007).

Figura 2. Vista dorsal (A) y corte sagital (B) de la cabeza espermática. (Hafez 2002).



2.2.2.2 Cuello. Une la cabeza con la cola, tiene una longitud de $10,7 \pm 0,2 \mu\text{m}$ y un diámetro de $0,8 \mu\text{m}$. Sus componentes principales son: el capitulo, las columnas estriadas, la placa basal y el anillo posterior, estas estructuras están alineadas con el centriolo, estructura desde la que nacen los microtúbulos y fibras que dan forma a la cola o flagelo (Lindemann y Kanous, 1989). Contiene mitocondrias enrolladas alrededor de las fibras densas, envolviendo el axonema, formando el retículo submitocondrial, por lo que constituye el almacén de energía para el espermatozoide. Dentro de la pieza intermedia y extendiéndose hasta el segmento principal de la cola, se encuentran las fibras densas externas, se sitúan rodeando el complejo del axonema en número de 9 en la pieza intermedia y de 7 en el segmento principal de la cola, se encuentran compuestas por proteínas tipo queratina, ricas en cisteína que presentan grupos sulfhidrilo (-SH), lo que lleva a formación de muchos puentes disulfuros (-S-S-) (Cooper, 1986).

2.2.2.3. Cola o flagelo. Es la última porción del espermatozoide, cuenta con una longitud de $29,1 \pm 1.4 \mu\text{m}$ formado por el segmento principal que tiene una longitud de $26,6 \mu\text{m}$ y un diámetro de $0,4 \mu\text{m}$ y segmento terminal.

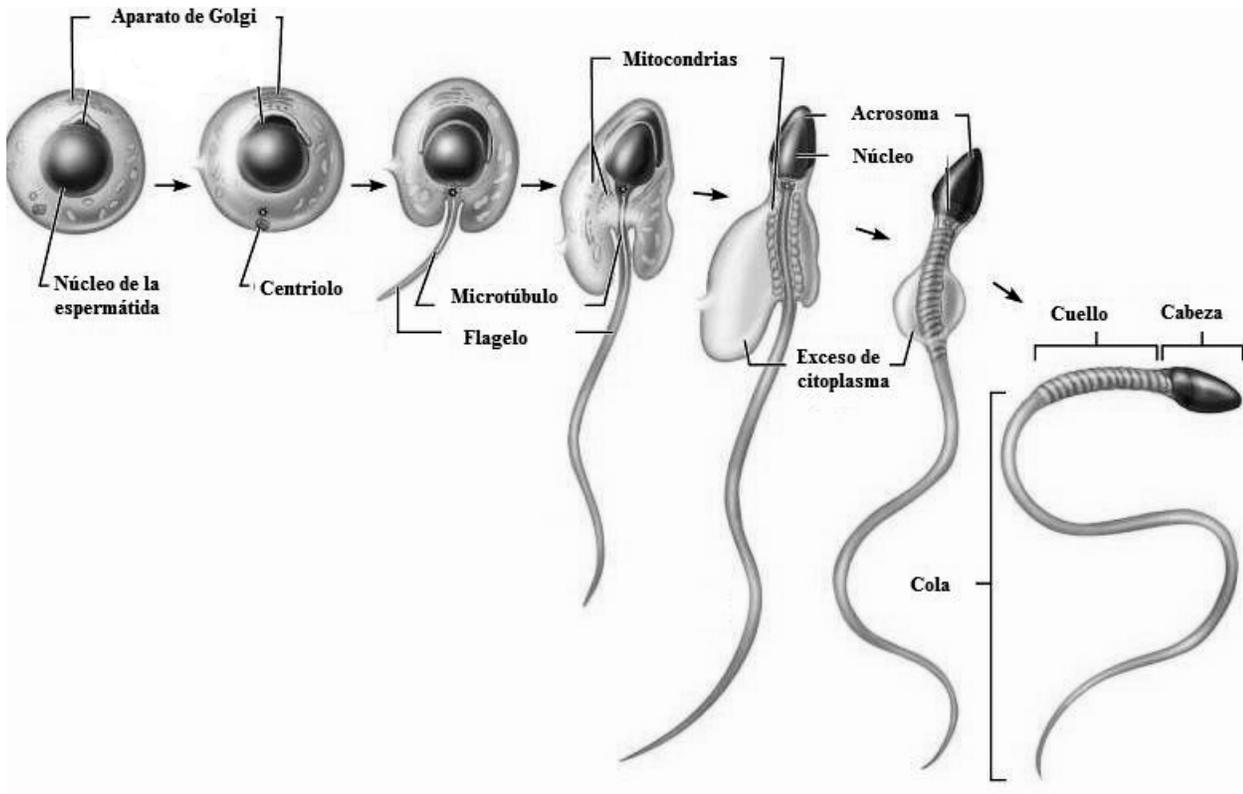
Recorriendo la parte central de toda la cola y estrechamente asociada a las fibras densas, se encuentra el axonema siguiendo una estructura de “9+2” denominada de esta forma debido a que está compuesta de una pareja de de microtúbulos centrales denominados C1 y C2, rodeados por nueve pares (dobletes) de microtúbulos periféricos, estando conectados los microtúbulos C1 y C2 a cada microtúbulo periférico A, mediante unas estructuras llamadas radios. Cada doblete está constituido por un microtúbulo A completo unido a un microtúbulo B incompleto. De cada microtúbulo A, nacen dos brazos de dineína uno interno y otro externo hacia el microtúbulo B del siguiente doblete, la dineína tiene la característica de presentar actividad de ATPasa, lo que significa, que es la encargada de hidrolizar ATP, liberando la energía que será utilizada para el movimiento de la cola. Los microtúbulos están formados por proteínas estructurales denominadas α y β Tubulina (Tejerina, 2007).

La presencia de elementos semirrígidos, otorgan direccionalidad y flexibilidad al movimiento flagelar (Gagnon, 1995), permitiendo que la cola presente un movimiento rotacional y elíptico, dicho movimiento se transmite a la cabeza del espermatozoide por medio del cuello. Este movimiento subsidiario de la cabeza, es lo que otorga en última instancia el movimiento progresivo al espermatozoide (Mortimer, 2000).

El proceso que desencadena el movimiento, desde el punto de vista molecular, se inicia cuando los brazos de dineína sufren una fosforilación, hidrolizando ATP y liberando energía, esta energía liberada permite que los brazos de dineína interactúen con el microtúbulo B del par de microtúbulos adyacente generando así el deslizamiento de un par de microtúbulos sobre otro. Debido a que el axonema está adherido a la base de la cabeza del espermatozoide, esta fuerza deslizando se transforma en un movimiento ondulante de la cola. La desfosforilación de la dineína por la calcineurina, que es una fosfatasa dependiente de calmodulina, permite la liberación del microtúbulo al que se había unido por efecto de la fosforilación, de esta forma el axonema vuelve a su posición inicial y comienza a doblarse en dirección contraria. Por lo tanto, para que exista un movimiento ondulatorio se necesita de la fosforilación y desfosforilación, la activación y

desactivación de la dineína de manera asincrónica a lo largo del axonema (Turner, 2003). La movilidad espermática necesita de ATP para poder realizarse, hay estudios que revelan que no solo es necesario el aporte de energía proveniente de las mitocondrias, sino que también se ven involucrados mecanismos no oxidativos a partir de la glucosa (Westhoff *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2001; Turner, 2006). En la movilidad de los espermatozoides están involucradas, aun si conocer del todo el proceso, la vía intracelular del AMPc/PKA y la fosforilación de proteínas también los iones HCO_3^- y Ca^{2+} (Aparicio, 2006).

Figura 3. Espermiogénesis o Espermatohistogénesis.



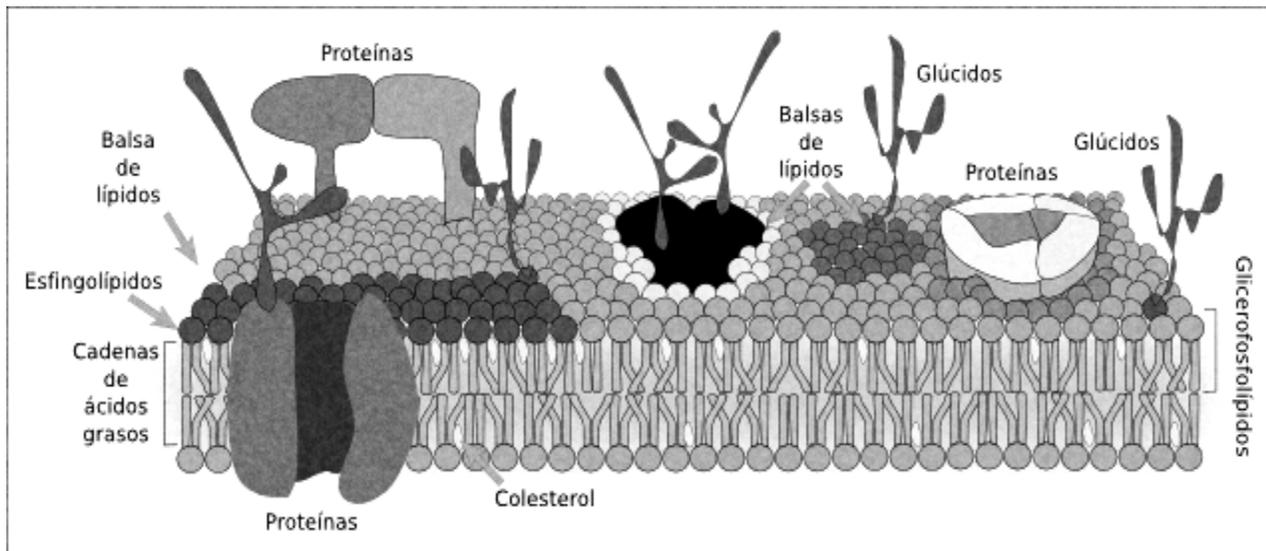
2.2.2.4. Membrana Citoplasmática.

Se encuentra dividida en regiones muy bien definidas que cuentan con funciones y composición distinta, de esta manera, en la cabeza, podemos distinguir tres regiones: marginal, principal y ecuatorial, en cuanto a la cola, esta sección podemos distinguir un dominio que cubre la hélice mitocondrial y otro que va desde la pieza intermedia hasta el extremo de la cola (Tejerina 2007).

De manera general, la membrana citoplasmática, está constituida por tres capas: una bicapa lipídica, una interfase de fosfolípidos y agua, y un glicocalix, dentro de los cuales, los principales lípidos son fosfolípidos y el colesterol; los fosfolípidos que destacan, son la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la esfingomiélin, la cardiolipina y pequeñas cantidades de fosfatidilserina y fosfatidilinositol (Nolan y Hammerstedt, 1997) (figura 4). El colesterol, junto con las proteínas integrales funcionan como estabilizador de la membrana, y la relación de los fosfolípidos con el colesterol determinara la fluidez de la membrana, siendo su relación molar en el caso del verraco 0.20 mOms/kg, la proporción de colesterol no es constante en toda la membrana siendo mayor su concentración en la región del acrosoma (López y de Souza, 1991). La concentración de proteínas en la membrana plasmática, es mucho más alta en comparación a las células somáticas, su disposición en la membrana puede ser ya sea integradas en la misma, es decir, atravesando por completo la membrana citoplasmática o integradas o unidas a ella de forma covalente siendo su anclaje las proteínas integrales, dentro de sus funciones, está la de ser canales de paso de distintas sustancias, enzimas, receptores, o funciones de transporte (Dostalova *et al.*, 1994; Dobrinsky, 1997).

La protección más externa del espermatozoide, está constituida por el glicocalix, que se encuentra formado por oligosacáridos, que se unen covalentemente a la membrana a través sus proteínas y lípidos, protegiendo así, a la célula de posibles daños causados por agentes físico y/o químicos; también puede jugar un papel en la interacción con otras células, de esta manera, se constituye la porción más externa de la membrana plasmática de los espermatozoides (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Figura 4. Estructura de la Membrana plasmática. (Edidin, 2003).



2.4 REFRIGERACIÓN DEL SEMEN.

2.4.1 Antecedentes.

La finalidad de conservar el semen refrigerado, es la creación de dosis comerciales destinadas a la inseminación artificial (IA); fue iniciada por Ivanow en Rusia a principios del siglo XX (Sanchez, 2006), en la década de los 30'se desarrolla su uso en las granjas estatales rusas (Milovanow, 1938); en los años siguientes se fue extendiendo a otros países como EEUU (Mckenzie, 1931) y Japón (Ito *et al.*, 1948), reintroducida en el sector porcino en el Reino Unido gracias a los trabajos de Chris Polge (1956), ya que las ventajas que esta técnica presentaba era la de mejor aprovechamiento del potencial genético de los mejores verracos en un amplio número de reproductoras, facilitando la mejora genética.

El desarrollo y amplia aplicación a nivel comercial de la IA, se produce a partir de los años 80', cuando se estandarizan los protocolos de inseminación (revisado por Reed, 1985; Crabo, 1991; Johnson *et al.*, 2000), la aplicación de la inseminación artificial se realiza en todo el mundo desarrollado, aunque el grado de utilización varía dependiendo el país, alcanzando porcentajes de hasta el 80% en algunos países de la comunidad europea como Holanda, Francia, Alemania, España, Noruega, Finlandia entre otros; actualmente, en el mundo el 99% de las inseminaciones artificiales se realizan con semen conservado a 15-20°C (Johnson, 2000).

El desarrollo de IA porcina, radica fundamentalmente en la obtención de una metodología simplificada y rentable para el ganadero. Según se ha avanzado en su utilización se han conseguido mejoras en los materiales empleados, con esquemas de trabajo que permiten la producción de un gran número de dosis con una buena calidad (Sánchez, 2006).

Para la conservación y mantenimiento de las dosis seminales está ampliamente establecido la utilización de la refrigeración a 15°C de los espermatozoides previamente diluidos en un diluyente de conservación (Althouse, 1997; Althouse *et al.*, 1998; Dubé *et al.*, 2004) y con temperaturas inferiores a 15°C, no se han obtenido buenos resultados en la inseminación (Cisale *et al.*, 2001).

En los comienzos de la técnica, se llegó a emplear la refrigeración a 5°C que necesitaba la utilización de diluyentes con crioprotectores, lo que complicaba la técnica (Sánchez, 2006). El inconveniente que presenta la conservación a dichas temperaturas moderadamente bajas, es que se limita la capacidad de almacenamiento, por una parte, porque no se puede reducir el metabolismo celular a niveles más favorables para la misma célula, y por otro lado, no se pueden controlar las condiciones microbiológicas con la misma efectividad que se consigue con la conservación a temperaturas inferiores a 5°C (Gadea, 2004).

Las características particulares que presenta el espermatozoide de verraco hace que sea muy sensible al shock por frío (termino descrito en la sección de criopreservación del semen), cuando se reduce la temperatura por debajo de 15°C, los movimientos laterales de los fosfolípidos que componen la membrana se ven reducidos y se producen separaciones de fases lipídicas, dicha situación se asocia a alteraciones irreversibles en las proteínas de las membranas. Lo que hace que se altere la funcionalidad de la membrana espermática y que la integridad de la célula se vea comprometida (Sánchez, 2006).

Se ha reportado una serie de resultados que indican la importancia de la temperatura del semen sobre la respuesta reproductiva de la cerda, Tonieto *et al.* (2003), señalan como uso común, del semen conservado entre 15-18°C, hasta el tercer día después de haber preparado las dosis seminales. Johnson *et al.* (2000), señalan que el semen utilizado en la inseminación artificial debe ser conservado a una temperatura de 15°C. Fuentes (2000), recomiendan inseminar a las cerdas con semen conservado por 12-48 horas a una temperatura de 17-18°C para alcanzar los más altos porcentajes de concepción y buen tamaño de la camada.

Según Sánchez (2006) para obtener una buena conservación en refrigeración se deben tener en cuenta los siguientes factores que determinan la viabilidad durante su manipulación y conservación:

La calidad intrínseca del propio eyaculado, depende de la capacidad individual de cada animal. Se debe tener en cuenta que las frecuentes disminuciones en la calidad seminal de un animal son producidas por multitud de causas como por ejemplo golpes de calor, procesos infecciones, mal manejo, malas instalaciones, etc. Que pueden afectar la producción de

espermatozoides y alterar bioquímicamente el plasma seminal. Estos procesos con frecuencia hacen que la capacidad de conservación se disminuya.

La elección adecuada del diluyente de conservación: para su elección es adecuado realizar pruebas de conservación que nos garanticen buena viabilidad espermática según la metodología utilizada en el laboratorio de inseminación.

Como último factor, se hace mención a la correcta manipulación que se debe hacer del eyaculado para evitar daños a los espermatozoides o alteraciones del medio extracelular, para lo cual es muy importante tener en cuenta la temperatura de manipulación, el semen no debe sufrir cambios bruscos de temperatura, cualquier material que se ponga en contacto con el semen debe estar a la misma temperatura del eyaculado. La bajada de temperatura de 37°C hasta 15°C debe ser de manera gradual, así mismo la temperatura de transporte debe de ser de 15°C. La higiene por supuesto que es otro punto muy importante, durante toda la manipulación del semen se debe evitar cualquier posible contaminación biológica, lo que provocaría daños a la célula espermática, un punto crítico es el momento de la recogida del semen por lo que se debe tener especial atención a ese momento, por lo tanto todo material que este en contacto con el semen debe estar perfectamente limpio y esterilizado (Sánchez, 2006).

2.4.2 Medios de conservación en refrigeración.

Los medios de conservación que se usan en la actualidad son fruto de la investigación de las necesidades de las células espermáticas y sus condiciones de conservación a 15°C. Los primeros que se utilizaron a nivel de granja se usaron en Rusia (Milavanov, 1932), eran soluciones muy sencillas que no permitían una buena conservación espermática, posteriormente y por influencia de la técnica de IA en la especie bovina, que en esta especie estaba más desarrollada, se hicieron modificaciones en los diluyentes utilizados en dicha especie (Polge, 1956).

El primer diluyente utilizado de forma masiva, fue el Kiev desarrollado por Plisko en 1965, se utilizó en Rusia, proporcionaba una mayor conservación, este diluyente sirvió como base para la creación de otros diluyentes como el EDTA, Merck I, Plisko Y Guelp (Sánchez, 2006).

Posteriormente y como consecuencia de los estudios desarrollados para conseguir diluyentes de congelación para el semen de verraco, Pursel y Johnson desarrollaron en 1975, el Beltsville Thawing Solution (BTS), dicho diluyente con el tiempo fue adaptado para poder utilizarlo en la refrigeración de semen, una de sus características particulares es la aportación de una pequeña cantidad de potasio, que permite mantener la actividad de la bomba-sodio-potasio, evitando su reducción intracelular, lo que induce a una disminución en la movilidad de los espermatozoides conservados (Alvarez y Storey, 1983; Johnson *et al.*, 1988). A inicios de los 80' se empieza a aplicar formulas más complejas, comienzan a incluir elementos que permiten un mayor control de pH, compuestos que estabilizan la membrana y mantienen mejor la integridad celular, entre estos hay que destacar diluyentes como el Zorlesco, Modena y el MR-A (Gottardi *et al.*, 1980; Moretti, 1981; Martin-Rillo, 1984). Otra línea de diluyentes de entre los que cabe mencionar, que aportan macromoléculas que tienen un efecto positivo sobre el acrosoma, se encuentran el Zorpva (Cheng, 1985) y Reading (Revell y Glossop, 1989), pero tienen como inconveniente su alto costo.

En la década de los 90', destaca el diluyente Androhep (Weitze *et al.*, 1990), cuya principal característica es la incorporación de albúmina sérica bovina (BSA), la adición de este compuesto en la dilución, compensa la pérdida de proteína e induce una buena movilidad, el inconveniente que presenta es su coste, y al ser un producto de origen biológico su funcionalidad puede ser variable.

La conservación de semen refrigerado, depende principalmente del diluyente, que contribuye a la conservación de las características funcionales de la célula espermática, de esta manera evita que la capacidad fecundante del espermatozoide se pierda.

A nivel práctico, en las condiciones actuales de producción los diluyentes se han clasificado en dos grandes grupos, los llamados de corto plazo, los cuales tienen como objetivo la conservación de las dosis seminales por 1-3 días, o aquellos que permiten la conservación por más de 4 días. Los primeros, se utilizan principalmente en estructuras de distribución de las dosis seminales a corta distancia, mientras que en los de largo plazo, se utilizan en situaciones en las que la distancia de la granja destino sea mucho mayor (Gadea, 2003); además, de permitir la realización de pruebas diagnósticas antes de ser utilizadas, para detectar posibles amenazas o realizar análisis completos de la calidad seminal, permite una mejor organización de tareas en los centros de recogida seminal y facilita en gran medida la distribución de las muestras a las granjas.

En el área de la producción porcina la IA con semen refrigerado se ha utilizado con éxito durante los últimos años en la mayoría de los países desarrollados, demostrado por el alto porcentaje de su utilización, pues el 99% de las dosis destinadas a la IA en la especie porcina son dosis de semen refrigerado (Johnson *et al.*, 2000), obteniéndose con esta técnica resultados de 83% de partos, con una prolificidad de 10-11 lechones por camada (Johnson, 1998).

Esta gran diferencia en la utilización del semen refrigerado con respecto al semen criopreservado, se basa tanto en aspectos técnicos como comerciales, pues es sabido, que tanto la refrigeración como la congelación provocan cambios similares en la funcionalidad de la célula espermática. El proceso de criopreservación provoca una mayor disminución en la capacidad fecundante frente al proceso de refrigeración, debido a las grandes alteraciones ultra estructurales que sufre la célula en el proceso de criopreservación, sumados a la exposición a un cambio mucho más agresivo de temperatura, además de la toxicidad que representan los crioprotectores y a la formación y disolución de cristales de hielo durante el proceso (Watson, 2000).

Por otro lado se encuentra el factor económico, pues el coste de la congelación de semen es más elevado al de la refrigeración, lo que aumenta finalmente el gasto de la realización de la IA. La combinación de estos factores puede ser la causa que explica el poco uso que tiene el semen criopreservado en el manejo rutinario de las granjas porcinas.

A través de la membrana plasmática, el espermatozoide se comunica con el exterior, recibiendo señales que le guían y estímulos que le conducen hacia la fecundación. La integridad de la membrana plasmática es indispensable para que todos estos procesos tengan lugar. Las temperaturas extremas producen daños en otras estructuras del espermatozoide como el acrosoma y las mitocondrias que dan lugar a pérdida de iones, enzimas, ATP y degeneración del ADN. Por todo ello, si pretendemos conservar el semen en dosis comerciales a 15°C, debemos tener en cuenta los siguientes puntos:

- ✓ Las disminuciones y aumentos de temperatura deben ser graduales.
- ✓ Oscilaciones de temperatura durante la conservación a 15°C.

2. Revisión Bibliográfica

- ✓ Utilizar el medio adecuado para su conservación a 15°C (diluyente adecuado).
- ✓ Las temperaturas límites son 37°C y 15°C.

Desde que el eyaculado es recogido a 37°C hasta que alcanza los 15°C para su conservación y aplicación, vamos a distinguir fases muy claras en cuanto a los cambios de la temperatura:

- ✓ Obtención: el eyaculado se recoge a 37°C en un recipiente a la misma temperatura y se conserva en él hasta su evaluación y dilución. Es aconsejable recoger sobre una cantidad de diluyente, que estará a 37°C y provoca que el descenso inicial de temperatura sea más lento. El periodo comprendido entre la obtención, la dilución y el comienzo de la disminución de la temperatura debe ser el menor posible. La sala de recogida debe estar a temperatura adecuada y cerca del laboratorio. Si es necesario salir al exterior se utilizará una nevera de transporte.
- ✓ Laboratorio: después de su evaluación, el eyaculado se mezcla con el diluyente elegido que debe estar previamente preparado y a una temperatura de $\pm 1^\circ\text{C}$ respecto a la del eyaculado. Para ello tanto el eyaculado como el diluyente estarán colocados en un baño maría a 35°C. Una vez diluido, se deja a la temperatura ambiente del laboratorio (20-22°C) durante un mínimo de 2 a 3 horas para que alcance los 20°C gradualmente. Luego se introduce en la nevera de 15°C.
- ✓ Conservación: en la nevera de 15°C las dosis seminales permanecerán un período de tiempo que varía según las necesidades de inseminación, la calidad del eyaculado y del diluyente. La temperatura no debe bajar de 15°C, lo que debe ser controlado mediante un termómetro de máxima y mínima, colocado en el interior de la nevera de 15°C.

2.3. CONGELACIÓN DE SEMEN.

2.3.1. Antecedentes.

El punto de partida para la criopreservación espermática, tuvo lugar en el año 1949, cuando un grupo de investigadores, C. Polge, A. Smith y A. Parkes en Inglaterra, descubrieron las propiedades crioprotectoras del glicerol en la conservación de espermatozoides (Polge, 1985). Pero no sería sino hasta el año 1956, cuando se realizó la primera congelación de semen de verraco y fue hasta el año 1970, cuando se constató el éxito de la aplicación de esta técnica en la reproducción porcina (Watson, 1990), al obtener los primeros lechones a partir de espermatozoides criopreservados tras haber realizado inseminación quirúrgica, efectuada mediante laparotomía (Polge *et al.*, 1970).

En 1971 en Estados Unidos tres equipos de investigación (Crabo y Einarson, Graham y colaboradores, y Pursel y Johnson) consiguen las primeras camadas de lechones a partir de semen criopreservado realizando inseminación artificial convencional (Hernández *et al.*, 2006).

En 1975 en Alemania los investigadores Westendorf *et al* y en Estados Unidos Pursel y Johnson, establecen los primeros protocolos de criopreservación específicos para espermatozoides de verraco, dichos protocolos se han utilizado de manera intensa a nivel comercial.

A partir de la creación de los protocolos de criopreservación de espermatozoides de verraco antes mencionados, se ha producido una profunda evolución de los mismos, lo cual ha derivado en métodos más optimizados que se reflejan en una mejora en la calidad espermática posdescongelación. Las diferencias más significativas entre los protocolos clásicos y actuales se han reflejado en:

Envasado de dosis seminales. Por su poca homogeneidad de congelación, las macropajuelas de 5 ml y las píldoras, por su dificultad al momento de su identificación, han sido reemplazadas por las pajuelas francesas de 0.25 ml y 0.5 ml o los FlatPack[®], que permiten una homogénea congelación y descongelación.

Biocongeladores. Han sustituido a los tradicionales contenedores de poliespan, ya que los biocongeladores permiten la congelación de un número mucho mayor de pajuelas y la congelación se realiza de manera más precisa y homogénea.

Figura 5. Biocongelador conectado al tanque de nitrógeno líquido (izquierda).



Velocidad de congelación y descongelación. Hoy en día, a los protocolos específicos para la congelación y descongelación de espermatozoides de verraco, se han incorporado curvas de congelación y velocidades de descongelación más precisas, fruto de la investigación sobre los cambios físicos que ocurren en la célula espermática durante el proceso de criopreservación, lo que permite tener un protocolo de congelación y descongelación para cada tipo de envase utilizado.

2.3.2. Utilización del semen congelado.

El semen congelado, se ha utilizado a gran escala en la inseminación del ganado bovino; sin embargo, en el ganado porcino, aún es muy limitada; su utilización podría ser una alternativa para el desarrollo y optimización de la industria porcina (Colenbrander, 1993; Peláez *et al.*, 2003; Roca *et al.*, 2003) (Figura 6).

Un dato que refleja la situación de la utilización del semen criopreservado, frente a la utilización de semen fresco, es un estudio realizado en 1998 (Wagner y Thibier 2000), en donde el número de dosis producidas con semen descongelado fue de 15 900 frente a las 65 millones de dosis producidas con semen fresco, en el año de este estudio se atestiguó la disminución que tuvo la utilización de semen descongelado ya que según Almlid y Hofmo (1996), dos años antes, la producción de dosis con semen criopreservado fue de 21.800 dosis.

El factor más limitante en el uso del semen criopreservado, es la diferencia de rendimiento en comparación al semen fresco y/o refrigerado. Mientras que con la utilización de semen refrigerado se maneja un porcentaje de fertilidad alrededor del 80% de partos y una prolificidad de 10-11 lechones por camada (Johnson *et al.*, 2000), en el caso del semen descongelado el porcentaje de partos es en torno al 50% y alrededor de 7 lechones por camada en las mismas condiciones de campo (Johnson, 1998).

Reed (1985) indicó otros factores muy importantes por los cuales la utilización del semen fresco se ha impuesto al semen criopreservado, estos son; efecto del verraco en la variación de la congelabilidad, mayor coste del procedimiento y lo crítico que es el momento de la inseminación.

Las ventajas que presenta el semen congelado sobre el semen fresco o refrigerado, se basan en el tiempo de conservación. Mientras que el semen refrigerado no puede ser almacenado por más de 5 días (Hernández *et al.*, 2006), ya que pierde significativamente su capacidad fecundante, en cambio en el caso del semen criopreservado puede permanecer por tiempo indefinido sumergido en nitrógeno líquido (Córdova *et al.*, 2004); por lo tanto, el semen congelado permite la importación y exportación de dosis seminales sin el riesgo zoonosario que implica el transporte de animales vivos, fomentando el comercio internacional, de esta manera se consigue la introducción de material genético de alto valor.

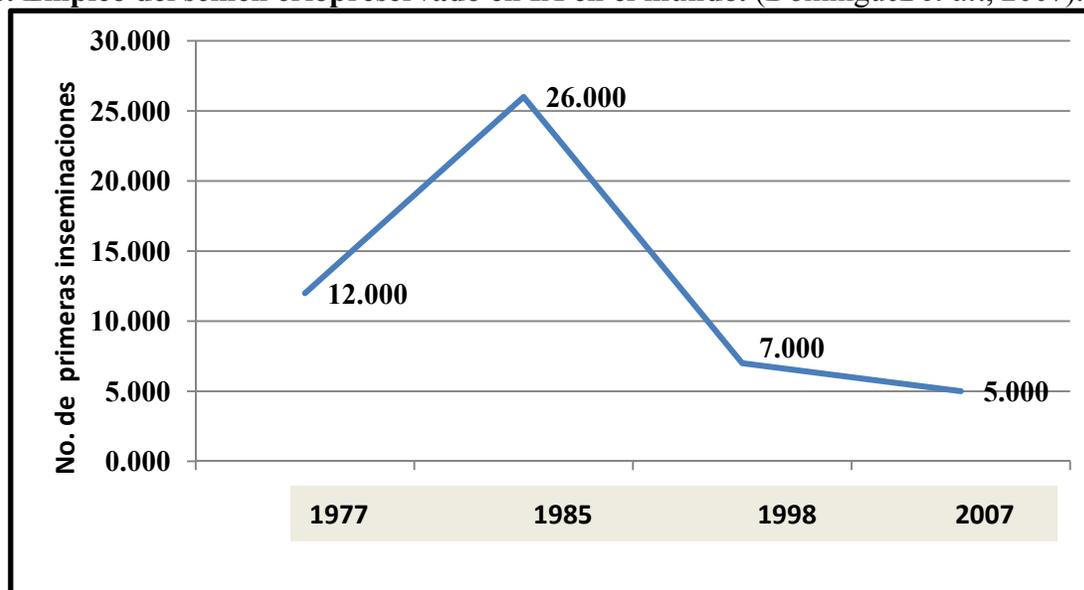
Con la técnica de criopreservación del semen de verraco, se logra crear bancos de semen, como para conservar líneas géticas de gran valor. Otra de las ventajas del semen congelado sobre el semen fresco es que permite contar con dosis seminales con calidad uniforme a lo largo de todo el año (Córdova *et al.*, 2003; Stornelli *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006).

El 60% de las dosis seminales de semen descongelado se producen en Norteamérica, y el resto en Europa, muchas de esas dosis son exportadas a muchos otros países (Wagner *et al.*, 2000). No más del 1% de las inseminaciones realizadas a nivel mundial usan este tipo de semen y el 99% de inseminaciones restantes, son realizadas con semen preservado en forma líquida refrigerada (Saravia *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2008).

Desde ya hace algunos años y en la actualidad, se está trabajando en estrategias para mejorar la viabilidad, fertilidad y prolificidad de las cerdas inseminadas con semen descongelado; sin embargo, los resultados a nivel de campo, aún presentan ciertas limitantes. Por lo cual, es necesario seguir trabajando al respecto para mejorar los resultados a nivel de Unidad de Producción Animal (Hammit y Martin, 1989; Fiser y Fairful, 1990; Bwanga, 1991; Berger y Fischerleitner 1992; Fiser *et al.*, 1993; Rodríguez-Martínez, 2003a; b; Roca *et al.*, 2002; Córdova *et al.*, 2003)

Entre los últimos avances logrados para tratar de hacer más rentable la utilización del semen criopreservado, destaca el empleo de un catéter especial que permite depositar durante la IA las células espermáticas más allá del cuello uterino (Vázquez *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2001), con lo que se incrementan los porcentajes de fertilidad (76-80 %) y prolificidad (9,3-9,5 lechones por camada), además permite reducir el número de espermatozoides necesarios para llevar a cabo la inseminación, así, Bolarin *et al.* (2006) utilizando este método y con sólo 1000 millones de espermatozoides descongelados por dosis, obtuvieron notables resultados tanto en fertilidad (70 %) como en prolificidad (9 lechones nacidos vivos). También se han realizado trabajos en líneas de investigación, donde se trata de mejorar la sincronización del momento de la ovulación con la llegada de los espermatozoides al oviducto, motivados por la corta vida fértil que presentan las células espermáticas (Abad *et al.*, 2006).

Figura 6. Empleo del semen criopreservado en IA en el mundo. (Domínguez *et al.*, 2007).



2.3.3. Proceso de criopreservación.

El proceso de criopreservación de células espermáticas comprende diferentes pasos; adición de un diluyente y enfriamiento del semen diluido, adición de un agente crioprotector y su envasado, congelación, inmersión y almacenamiento en nitrógeno líquido (N_2), descongelación e utilización *in vivo* o *in vitro* (Peláez, 2003).

2.3.4. Efectos de la congelación y descongelación sobre el espermatozoide.

La primera vez que se conoció el efecto dañino que ejerce la disminución de temperatura a la que son sometidas las células espermáticas en el proceso de criopreservación, fue por el investigador Milovanov en 1932, quien observó que disminuir la temperatura del semen de toro a temperaturas cercanas a $0^{\circ}C$ provocaba una pérdida irreversible de la movilidad, fenómeno que nombró “Shock por temperatura” término que en la actualidad es mejor conocido como “Shock por frío” (Peláez, 2003). Otro término que se maneja, es el conocido como “daño por enfriamiento extremo” (Watson 1995), provocado cuando se alcanza la temperatura final de congelación a $-196^{\circ}C$. La célula espermática pierde integridad en la membrana y funciones celulares al ser enfriados de manera rápida de un rango de temperatura de $20^{\circ}C$ hasta $0^{\circ}C$, aunque generalmente el daño más severo se aprecia entre 15 y $2^{\circ}C$ (Watson, 1995).

Se han obtenido resultados en trabajos que muestran que el mayor detrimento de las funciones espermáticas se lleva a cabo, al momento de reducir la temperatura desde niveles fisiológicos hasta $5^{\circ}C$, en dicha temperatura se presentan más cambios en la membrana del espermatozoide en comparación a si la célula espermática se mantiene a $15^{\circ}C$, inclusive más daños aun que en el proceso de congelación y descongelación (Maxwell y Johnson, 1997), lo cual hace evidente la importancia del uso de un diluyente que proteja a la célula durante el proceso de enfriamiento previo a la congelación; debido a este efecto adverso, es que solo el 40-50% de los espermatozoides sobreviven al proceso de congelación y descongelación (Almlid y Hofmo, 1996).

La sensibilidad que manifiestan las células espermáticas a la disminución de temperatura varía dependiendo la especie, en el caso de los mamíferos el hombre presenta una alta resistencia, seguido por el perro y el gato y presentando menor gradiente de resistencia se encuentra el toro, el

morueco, el caballo y por el último el verraco, el cual manifiesta una alta susceptibilidad a las bajas temperaturas (Parks, 1997). Estas diferencias van muy ligadas a las diferencias en la composición lipídica de las membranas plasmáticas entre las especies mencionadas (De Leeuw *et al.*, 1990a; Parks y Lynch, 1992; White, 1993). La membrana plasmática del verraco contiene características estructurales que provocan su alta sensibilidad al proceso de congelación, una es su alto contenido de fosfolípidos, su relativa abundancia de colesterol y la alta presencia de ácidos grasos insaturados (Alberts *et al.*, 1989).

Al momento de realizar la congelación de células espermáticas, Mazur (1985) indicó un proceso que se lleva a cabo si la temperatura a la que se encuentra la célula es de -5°C , debido a la adición de crioprotectores que modifican el punto de fusión, ni el medio extracelular ni el intracelular presentan indicios de congelación, este fenómeno se conoce con el nombre de “súper enfriamiento”, que se define como una condición inestable en la que hay presencia de agua en estado líquido a temperaturas inferiores a -5°C . A partir de esta temperatura, al seguir disminuyendo y hasta llegar a -15°C , es cuando se comienzan a formar cristales de hielo en el medio extracelular, dicho proceso provoca deshidratación de la célula, ya que la cristalización parcial extracelular disminuye la cantidad de agua para solubilizar los solutos, la concentración de éstos aumentará y el agua intracelular, que se encuentra aun en superenfriamiento fluirá hacia el exterior para estabilizar las presiones osmóticas (Watson, 1995; Tejerina, 2007). La temperatura juega un papel muy importante ya que en función de la rapidez con la que la célula sea congelada condicionará la permeabilidad de la membrana plasmática. Se ha visto que velocidades lentas en el proceso de congelación a razón de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y hasta 4°C pueden minimizar las alteraciones provocadas a la membrana (Parks, 1997).

Una velocidad de congelación lenta, retarda el tiempo en que se alcanza la temperatura de congelación deseada y por lo tanto la célula tendrá más tiempo para deshidratarse. El proceso de deshidratación que tiene lugar durante una velocidad de congelación lenta, se asocia potencialmente con baja supervivencia celular (Watson, 1995).

Si la temperatura desciende de manera rápida, la célula se hace relativamente impermeable al agua en poco tiempo, lo que va a impedir el intercambio de fluidos entre el espacio extracelular e intracelular, por lo tanto en el interior de la célula existirá un exceso de líquido que mantiene el

estado de superenfriamiento, posteriormente este líquido dará lugar a la formación de hielo intracelular como solución final para lograr el equilibrio osmótico (Tejerina, 2007). Los cristales de hielo formados durante el proceso anteriormente mencionado, van a variar de tamaño en función a la velocidad de congelación, si la velocidad es lenta se formaran cristales de un tamaño voluminoso, causando la muerte de la célula o daños severos, por lo contrario si la velocidad es muy rápida aparecerán cristales de hielo de tamaño pequeño o microcristales, los cuales por lo general no se consideran perjudiciales (De Leeuw *et al.*, 1990b).

Sobre el tema de velocidades de congelación, Mazur (1985) propuso dos factores relacionados con las dos tendencias que muestran las células en relación a la velocidad de enfriamiento, los llamó “teoría de los dos factores”, que explica que a velocidades lentas por debajo de la óptima, la célula esta por más tiempo expuesta a todos los cambios que produce la sucesiva formación de hielo en el espacio extracelular (“efecto solución”), dentro de estos cambios destacan, el aumento de la concentración salina, aumento de la osmolaridad, alteraciones del pH, alteraciones en la composición de la solución. También explica que a temperaturas por encima de la óptima la célula es incapaz de expulsar el líquido intracelular lo que aumenta considerablemente las posibilidades de formación de cristales intracelulares, que como ya hemos dicho antes son letales para la supervivencia de la célula. Pese a todo lo que se ha mencionado a cerca de la gran importancia del daño que los cristales intracelulares causan a la célula, hay autores que han indicado que provoca más daño la rapidez con la que el agua sale de la célula en este rango de temperatura, al provocar el desequilibrio de la presión a ambos lados de la membrana, que tiene como consecuencia cambios bruscos de forma, tamaño y ultraestructura (Woelders, 1997).

La velocidad óptima de congelación de células espermáticas va a depender de factores como, el tipo de célula y la especie, oscilando la velocidad de enfriamiento idónea de manera general entre 10-80°C/min (Watson, 1995), en el caso específico del verraco ésta se encuentra entre 30-50°C/min, para el morueco 50-60°C/min y entre 20-50°C/min para el caso del toro (Woelders, 1997).

Por lo antes mencionado, el estrés que se provoca a la estructura de la célula en el proceso de congelación está relacionada con el intercambio de líquido en los espacios celulares y la deshidratación, también con la posibilidad que existe de formación de hielo en el espacio

intracelular si el proceso de disminución de la temperatura es muy rápido o muy lento (Watson, 1995). Por lo tanto, la reducción de la temperatura, deberá evitar la deshidratación de los espermatozoides, cristalización intracelular letal, y ser lo suficientemente rápida para evitar daños osmóticos al exponerlos a un medio hipertónico durante la congelación.

Durante el proceso de descongelación la célula también sufre daños letales, por lo que el realizar de manera adecuada este proceso tiene mucha importancia ya que si se efectúa de manera incorrecta, el proceso de congelación queda anulado, existe una franja crítica de temperatura en el proceso de criopreservación que va de -15 a -60°C , y por la que las células pasan dos veces durante la criopreservación (Mazur, 1985).

Se ha hecho mención a dos mecanismos en el proceso de descongelación que provocan daño a la célula, la primera se refiere a si en el proceso de congelación la célula fue sometida a una disminución de temperatura muy rápida y a una descongelación lenta, en este caso se produce un proceso de “recristalización” donde los microcristales tienden a agruparse y a formar cristales de mayor tamaño en el espacio intracelular, lo que tiene consecuencias letales como ya se ha mencionado (Mazur, 1985). El segundo mecanismo, se refiere a si la velocidad de congelación fue lenta, en presencia de un crioprotector penetrante, se produce daño si se somete a la célula a una descongelación rápida, este mecanismo provoca lesiones debido a estrés osmótico pues no se da tiempo a que el agente crioprotector abandone el interior de la célula lo suficientemente rápido para lograr un equilibrio osmótico, lo que provoca un aumento considerable en el volumen de la célula debido a la entrada de agua al citoplasma (Watson, 1990). Por lo tanto, la velocidad óptima de congelación debe ser una situación intermedia entre los dos casos anteriormente mencionados, se tiene que tener muy en cuenta a la hora de realizar la descongelación; las pautas que se han seguido durante la congelación, ya que ésta, depende de ellas, de esta manera se conseguirá un correcto intercambio de agua y solutos a través de la membrana para minimizar los daños por el agrupamiento de los microcristales de hielo en el espacio intracelular (Hammerstedt *et al.*, 1990).

Se han constatado alteraciones en las células espermáticas o una corta supervivencia de ellas por efectos compatibles con ambos mecanismos durante el proceso. Se han comprobado lesiones en la membrana que aparecen solo durante la etapa de descongelación para la cual se ha explicado el mecanismo causal, basado en el fenómeno de transición de fases de los lípidos de la membrana lo

que destaca la importancia del proceso de descongelación en el mismo. Se ha mencionado que las membranas se desestabilizan durante el proceso de congelación debido a la exposición a temperaturas muy bajas y a las altas concentraciones salinas, lo que provoca una degeneración al combinarse nuevamente efectos letales por cambio de temperatura y presión osmótica (Holt *et al.*, 1992; Holt y North, 1994).

2.3.5 Efectos sobre la Estructura y Funcionalidad espermática.

El proceso de criopreservación de células espermáticas, ejerce en dichas células efectos perjudiciales provocados por verse sometidas a estrés de carácter térmico, mecánico y osmótico, de este modo se han podido identificar los efectos dañinos que estos ejercen sobre la membrana plasmática, citoesqueleto, movilidad y el núcleo (Watson, 1995).

2.3.6 Efecto sobre la Membrana.

Es la estructura que resulta con lesiones más severas, por lo cual el daño a la membrana representa la primera causa de daño celular (Parks y Graham, 1992; Parks, 1997).

Las principales alteraciones sobre la membrana plasmática se refieren, al daño en su estructura, al cambio de su composición lipídica y organización molecular. Estos sucesos provocan una pérdida en la permeabilidad selectiva del plasmalema, debido a la pérdida de enzimas intracelulares y trastornos en el balance iónico y a las lesiones que se presentan en el acrosoma y las mitocondrias, provocando también lesiones en mecanismo aerobio afectando directamente la respiración celular; dicho daño en la permeabilidad de la membrana, provoca pérdida de moléculas como ATP, ácidos nucleídos y enzimas así como de iones de potasio y magnesio, aparte de afectar la salida de moléculas también evita la entrada de iones de calcio y sodio. Al comprometer las rutas metabólicas, se limitan las posibilidades de la célula para la creación de moléculas de ATP, lo que pone en riesgo todas aquellas funciones celulares dependientes de energía como la movilidad (De Leeuw *et al.*, 1990a; Bwanga, 1991; White, 1993).

Dentro de las enzimas que se pierden debido a la pérdida de permeabilidad de la membrana plasmática, se encuentran las responsables de la metabolización de los ROS, como la superóxido

dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, a las que hay que sumar otros compuestos que cumplen funciones antioxidantes como el α -tocoferol, ácido ascórbico, taurina, hipotaurina entre otros. La pérdida de los compuestos antioxidantes también se presenta durante la centrifugación que se realiza en el proceso de congelación en la mayoría de los protocolos (Álvarez y Storey, 1992; Lasso *et al.*, 1994; Brouwers *et al.*, 2005). Se ha observado en trabajos realizados (Cerolini *et al.*, 2001, Maldjian *et al.*, 2005), el incremento de la cantidad de ROS durante el proceso de criopreservación en diferentes especies, siendo la especie porcina la más sensible a esta situación debido a la cantidad de ácidos grasos insaturados en sus lípidos presentes en la membrana espermática y que cuentan con poca capacidad antioxidante (Breininger *et al.*, 2005). La acción de los ROS sobre los ácidos grasos, los cuales ejercen una fuerte atracción sobre ellos, provocan una alteración en la funcionalidad de la membrana al producir fallas en la fluidez de la misma y por lo tanto disminuye su sobrevivencia (Sanocka y Kurpisz, 2004).

En cuanto al daño que la membrana mitocondrial sufre durante el proceso de criopreservación es relativo, pudiendo ser severas en su organización interna, lo que provoca una fuga en su contenido o no sufrir ningún daño, por lo tanto la membrana plasmática de la pieza intermedia presenta más resistencia a los cambios de temperatura, las lesiones presentadas tienden a ser progresivas en función de la intensidad del estrés térmico, desde el punto de vista estructural el proceso de criopreservación produce en los espermatozoides de verraco ruptura del plasmalema, así como también pérdida de sustancia de la matriz acrosomal con desprendimiento de la membrana acrosomal externa (Watson y Plummer, 1985).

Las alteraciones que se provocan en la membrana plasmática comprometiendo así su permeabilidad, causan perturbaciones en el equilibrio de las concentraciones de sodio, zinc y calcio en el espacio intracelular y las de potasio y magnesio que abandonan descontroladamente la célula. En el caso de la especie porcina, es muy significativa la acumulación de calcio en el espacio intracelular, en el caso de este compuesto la alteración en su concentración puede ser provocada por la alteración de la bomba que lo regula (Watson y Plummer, 1985; White, 1993; Bailey and Buhr, 1995), ya que la disminución de la temperatura provoca perturbaciones en la actividad de las proteínas de la membrana que estas a su vez funcionan como bomba de iones. Se ha sugerido que la pérdida de vesiculación y continuidad de la membrana que se presenta en la región anterior de la cabeza, es consecuencia de la pérdida de dichos iones (Parks, 1997).

Otra consecuencia que traen consigo las alteraciones de la membrana plasmática de los espermatozoides durante la criopreservación, es la pérdida de la movilidad, que es consecuencia del fallo en la permeabilidad del plasmalema y del fracaso en la aportación de energía (Watson, 1995), como ya se ha mencionado antes, debido a la composición de la membrana plasmática del espermatozoide porcino, éste es especialmente sensible al ataque de los radicales libres de oxígeno generados por el propio espermatozoide, los cuales provocan PL, para los cuales la célula ha perdido su capacidad defensiva debido al aumento de la permeabilidad de la membrana, dicho fenómeno se ha correlacionado con daños morfológicos de la pieza intermedia y con el descenso de la movilidad espermática, por lo que representa una de las causas consideradas de la característica disminución de movilidad de los espermatozoides de verraco criopreservados (Bell *et al.*, 1993; Karov, 1997).

El cambio en la movilidad de los espermatozoides durante el proceso de criopreservación, no solo es de tipo cuantitativo sino que también se presentan cambios cualitativos en los patrones de movimiento espermático, durante la etapa en la que se elimina el plasma seminal del eyaculado y en la posterior adición del diluyente de refrigeración donde se produce aumento en la presencia de espermatozoides con una elevada velocidad curvilínea (VCL), amplitud media de desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y reducido índice de linealidad (LIN) (Cremades *et al.*, 2005) las mismas características presentan los espermatozoides hiperactivados a consecuencia de la capacitación previa a la fecundación (Schmidt y Kamp, 2004). Las alteraciones en la movilidad reflejan el proceso similar a la capacitación que sufren los espermatozoides debido tanto a la pérdida de factores decapacitantes como a la eliminación de plasma seminal durante la centrifugación (Mortimer *et al.*, 1998) y a los cambios en la membrana plasmática similares a la capacitación descritos por Maxwell y Johnson (1997); y Green y Watson (2001). Dicha población de espermatozoides hiperactivados no aparece tras la descongelación, con lo que se cree que los procesos de deterioro en la membrana progresan hasta causar la muerte celular; por lo tanto, este fenómeno es otro factor culpable de la caída drástica en la movilidad espermática (Tejerina, 2007).

2.3.7 Efectos sobre el citoesqueleto.

Se sabe que en el citoesqueleto existen proteínas que cumplen una función estabilizante en la membrana espermática, muchas de las proteínas del citoesqueleto, dependiendo de la temperatura presentan una actividad de despolimerización y repolimerización (Holt y North, 1991; Watson, 1995), la utilización de crioprotectores como el glicerol afectan dicha actividad de los microtúbulos lo que puede afectar indirectamente a la membrana, la alteración de los microtúbulos trae consigo consecuencias como el fallo en la transducción de señales, o desorganización de los dominios, esto debido a que se ve alterada la interacción entre los microtúbulos del citoesqueleto con las proteínas de la membrana (Parks y Graham, 1992). Por otro lado, los rápidos cambios en el volumen celular también tendrían efectos sobre el citoesqueleto de la membrana plasmática y acrosomal, aunque aún no se sabe mucho al respecto (Watson, 1995).

Es importante saber que el tamaño y forma de la cabeza se relaciona con la alteración estructural de la membrana y la resistencia que pueden llegar a tener los espermatozoides al enfriamiento, pues así lo muestra el hecho de que el espermatozoide de las especies más sensible presenten una cabeza alargada y plana, distinta de la más pequeña y convexa de las especies más resistentes, puede ser debido a que el componente citoesquelético parece no estar presente en la porción anterior a la cabeza, por lo que las consecuencias de la exposición al frío serían más susceptibles las especies con espermatozoides con cabeza plana y alargada, en los que esta región, generalmente, presentan mayor superficie (Watson y Plummer, 1985).

2.3.8 Efectos sobre el núcleo.

Se ha comprobado que en la especie humana, se producen alteraciones en la condensación de la cromatina nuclear por efecto de proceso de criopreservación del semen, se dice que se produce una supercondensación (Royère *et al.*, 1991). De igual forma, se ha probado que existe una relación entre el fenómeno de la alteración en la condensación con el retraso en la aparición de los pronúcleos en ovocitos fecundados *in vitro*, con respecto a los que son fecundados con semen fresco en los cuales este fenómeno es menor, lo que tendría importantes repercusiones sobre la capacidad fecundante del espermatozoide y probablemente también sobre las primeras etapas de desarrollo embrionario. Lo antes mencionado, puede estar causado por la pérdida en la relación del ADN con

las proteínas nucleares provocada por movimientos de iones de zinc o alteraciones en el equilibrio de los puentes disulfuro o de los grupos tioles (Royère *et al.*, 1991).

Un proceso similar de supercondensación se ha constatado también en la especie porcina, durante el proceso de criopreservación de espermatozoides, algunos estudios prueban su relación con la capacidad fecundante y el desarrollo embrionario, los trastornos en el desarrollo embrionario han sido asociados a alteraciones en la organización de la cromatina nuclear, pues se ha encontrado una mayor presencia de embriones en estadios de desarrollo menos avanzados y también embriones degenerados cuando se utilizó en la inseminación semen congelado-descongelado si se comparan con las cerdas que fueron inseminadas con semen refrigerado, en el que los casos de alteraciones en la condensación de la cromatina nuclear fueron menores, dichas alteraciones; sin embargo, no alteraban la capacidad fecundante de los espermatozoides (Hamamah *et al.*, 1990; Martín-Rillo *et al.* 1999)

En otros estudios realizados por Evenson *et al.*, en 1994, se comprueba que un proceso de congelación agresivo, es decir, dilución e inmersión directa en nitrógeno líquido, o dilución y congelación sobre nieve carbónica sin incubación previa, no modifica la estructura de la cromatina nuclear, pero si existe una relación entre el estatus en que se encuentra esta estructura y la capacidad fecundante.

Fraser y Strzezek en 2007, realizaron un estudio, en el cual describieron que la doble hélice de ADN de los espermatozoides porcinos sufre un aumento de la fragmentación de la misma tras el proceso de congelación y descongelación, dicho aumento era independiente tanto del método como del medio de congelación empleado. En dicho estudio, se pone de manifiesto la acción protectora que tiene el plasma seminal como las sustancias crioprotectoras a la hora de reducir la fragmentación de ADN. Las causas de este daño no parecen claras, se ha especulado con la participación de las ROS como desencadenante de este proceso, pero Van der Schans *et al.* (2000) en un estudio comprobaron con ayuda de un test ELISA, que mide el daño oxidativo en la doble hélice de ADN de espermatozoides de toro, que éste no aumentaba tras el proceso de criopreservación.

2.3.9 Efectos sobre la capacidad fecundante.

Debido a las múltiples alteraciones que hemos descrito como consecuencia de la criopreservación, un cierto porcentaje de espermatozoides no sobreviven al proceso, por lo general se trata de un 40-50% del total de ellos, aún utilizando protocolos optimizados y sin apenas diferencias entre especies (Watson, 1995; Watson, 2000; Curry, 2000), y los espermatozoides que logran sobrevivir al proceso de criopreservación no conservan las mismas características que tenían antes de la congelación, lo cual se manifiesta en su capacidad fecundante (Watson, 1995). Cuando se preparan dosis de inseminación con semen descongelado, en dichas dosis hay una menor cantidad de espermatozoides viables debido a las alteraciones que provoca el cambio de temperatura, la formación y disolución de hielo durante el proceso de criopreservación, haciendo inestables a las células espermáticas sobrevivientes, presentando anomalías en su capacidad de movimiento, alterando de igual forma el sostenimiento del desarrollo embrionario y a la alta sensibilidad al daño oxidativo de los lípidos de la membrana, todo lo mencionado anteriormente va ocasionar un efecto adverso sobre la capacidad fecundante de los espermatozoides (Watson, 2000). Se sabe que el proceso de congelación de espermatozoides altera los sucesos característicos que deben de ocurrir en la membrana para darle a los espermatozoides la capacidad fecundante.

Las lesiones que sufren la membrana plasmática y acrosomal externa tienen repercusiones sobre la funcionalidad, más o menos graves, durante la reacción acrosomal (Hofmo y Andersen, 1989). El proceso de dilución, congelación y descongelación, ejercen un efecto sobre la fluidez de la membrana de la cabeza de los espermatozoides, se sugiere que este efecto interfiere con los procesos propios de la fecundación (Buhr *et al.*, 1989).

Durante la inseminación, los espermatozoides deben de tener la capacidad de poder sobrevivir en el tracto genital de la hembra durante varios días y estar presente en el oviducto al momento de la ovulación y también estar en un estado de competencia funcional para poder llevar a cabo la fecundación, que se consigue después de que los espermatozoides experimentan el proceso de capacitación y reacción acrosomal. La capacitación, es un proceso progresivo donde el plasmalema sufre desestabilización lo que compromete las posibilidades de supervivencia espermática, cuando se alcanza un umbral de dicha desestabilización el espermatozoide experimenta un estado de hiperactividad motora y sus membrana acrosomal externa y plasmática se

fusionan como respuesta a estímulos concretos, permitiendo de esta forma la liberación de las enzimas necesarias para perforar las cubiertas del ovocito y permitir la entrada del espermatozoide al interior de su citoplasma, este fenómeno se conoce como reacción acrosomal, el resto de los espermatozoides que no han conseguido realizar la fecundación superan el umbral de desestabilización lo que produce una degeneración progresiva de la funcionalidad de la membrana, hasta que el espermatozoide es incapaz de mantener la integridad celular, así pues, el proceso de capacitación genera un estado de reactividad inmediata para la fecundación, pero conduce inevitablemente a la muerte a todos aquellos espermatozoides que la experimentan y no consiguen penetrar el ovocito (Peláez, 2003).

Durante el proceso de criopreservación, el espermatozoide experimenta un proceso de reactividad, que es similar al proceso de capacitación acrosomal, es decir, tienen un comportamiento muy similar como si estuvieran capacitados (Watson, 1995, 2000; Curry, 2000); esto tiene repercusiones directas sobre la fecundación, debido a que los espermatozoides adquieren antes las cualidades para realizarla, de lo que lo hace el semen fresco (Wheeler y Seidel, 1986; Garde *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 1996; Cormier *et al.*, 1997; Rota *et al.*, 1999), por lo cual disminuye la fertilidad del semen criopreservado si tras la inseminación no se produce un pronto encuentro con el ovocito, lo que hace muy importante el buen manejo de este evento, ya que puede ser éste, el causante de la baja fertilidad del semen criopreservado, así lo muestra en el caso de la especie porcina los experimentos en instantes más próximos de lo habitual a la ovulación (Schwarz, 1993; 1994; Waberski *et al.*, 1994; Dos Reis *et al.*, 1995). En la etapa de enfriamiento por encima de 0°C, es suficiente para que se presente dicho fenómeno en el espermatozoide y en consecuencia comienza a observarse, incluso desde la etapa de dilución y enfriamiento, no solo tras haber completado el proceso completo de congelación (Watson, 1996; Cormier *et al.*, 1997; Rota *et al.*, 1999). No se sabe con claridad si los espermatozoides experimentan propiamente el proceso de capacitación o simplemente sortean dicho estado y proceden directamente al estado de reacción acrosómica, ya que se ha observado a través de la coloración fluorescente con clortetraciclina, que manifiestan una coloración típica presente en los espermatozoides capacitados, así como el aumento intracelular de iones de calcio igualmente característico en dichos espermatozoides, pero la actividad de algunas enzimas que participan en el proceso es distinta (Watson, 2000). Por lo anteriormente mencionado, se tiende a hablar más bien de que experimentan cambios similares a los ocurridos en la capacitación.

Las etapas de enfriamiento en el caso de la especie porcina son más críticas, para la estabilidad de la membrana, debido a la alta sensibilidad que tienen los espermatozoides de esta especie a dichos cambios, incluso más aun que el proceso propio de congelación, (Ortman y Rodríguez-Martínez, 1994; Maxwell y Johnson, 1997).

Por lo tanto, el proceso de criopreservación, provoca en el semen un estado similar al de capacitación por mecanismos más rápidos de lo habitual, lo que conduce a pérdida de capacidad fecundante *in vitro* o *in vivo*, que ocurre de manera rápida, al contrario del semen fresco el cual la adquiere de forma más paulatina y la mantiene durante más tiempo.

2.3.10 Efectos del Crioprotector.

Teóricamente, se podría hacer más resistente a un espermatozoide reduciéndole el número de poros en la membrana y reduciéndole las funciones ATP-dependientes, así como la agregación proteínica y formación de bloques lipídicos. Presumiblemente esta es la acción de las lipoproteínas de la yema de huevo o de la leche en los diluyentes, que se emplean con crioprotectores como por ejemplo el dimetil sulfóxido, la betaina y el glicerol. Existen evidencias de que la presencia de un aditivo crioprotector reduce la concentración de sales intracelulares a una temperatura dada, debido a que aumenta la fracción no congelada en el exterior de la célula.

Los agentes crioprotectores causan un efecto perjudicial sobre los espermatozoides debido a que ejercen una acción toxica y estrés osmótico, se considera que la adición de agentes crioprotectores es una de los principales fuentes de daño sobre las células, junto con el enfriamiento, congelación y descongelación en el conjunto del proceso (Watson, 1990; 2000).

El crioprotector que se ha empleado con mayor frecuencia es el glicerol, salvo en algunas especies (Watson, 1990, 1995; Holt, 2000), dicho agente, se recomienda utilizarlo en concentraciones de 1-2 M, aunque algunos estudios experimentales revelan que utilizarlo por encima de 0.5 M provoca un efecto perjudicial, dicho efecto parece ser más por su carácter toxico que por el estrés osmótico al que somete a la célula (Watson, 1995).

La tolerancia al glicerol cambia drásticamente, dependiendo de la especie; por ejemplo, en el caso del toro, morueco y el caballo se utilizan concentraciones que van desde 4 al 9% (Watson, 1990), en el caso del verraco no se recomienda utilizar más allá de una concentración del 3% (Watson, 1990, 1995; Holt, 2000), el glicerol está catalogado como agente penetrante, ya que entra a la célula, lo que depende del grado de permeabilidad de la membrana a esta sustancia, ésta acción provoca estrés osmótico (Watson, 1995), el daño provocado por el glicerol está relacionado con la temperatura en la que se añade, por lo que para minimizar los daños, se recomienda incorporarle en etapas sucesivas durante el proceso de congelación, siendo el mejor momento cuando la curva de enfriamiento alcance los 5°C (Watson, 1995); de tal manera, que en la congelación de semen de verraco, se utiliza el glicerol como crioprotector en una concentración final que va del 1 al 3%, adicionándolo en la etapa previa a la congelación (5°C). El glicerol se agrega en la segunda fracción de diluyente. El semen diluido y ya glicerinado se mantiene a 5°C durante 2 horas, llamado período o tiempo de equilibrio.

2.3.11 Diluyentes.

Después de ser eyaculados, los espermatozoides solo pueden vivir pocas horas; por lo que deben ser diluidos en un buen diluyente, lo más pronto posible. Las características que debe tener un buen diluyente son:

- Aportar nutrientes como fuente de energía.
 - Proteger contra el efecto nocivo del enfriamiento rápido.
 - Amortiguar los cambios perjudiciales en el pH, al formarse ácido láctico.
 - Mantener la presión osmótica apropiada, de 280 a 340 mOsm/Kg. de agua y el balance electrolítico.
 - Inhibir la proliferación bacteriana, para lo cual debe contener un antibiótico.
 - Aumentar el rendimiento del eyaculado, a fin de poder realizar más inseminaciones.
 - Proteger a los espermatozoides durante el proceso de criopreservación.
- (Hafez, 2002).

2.3.12 Componentes de los diluyentes.

La mayoría de los diluyentes, generalmente están compuestos por glucosa, citrato de sodio y bicarbonato de sodio con o sin potasio y ácido etileno diaminetetra-acético (EDTA), y tiene una vida promedio de 3 días (Revell y Glossop, 1989).

Tabla 2. Composición de los diluyentes empleados en la congelación de semen de verraco. (Hammit y Martín, 1989).

<i>Pre-diluyente*</i>	<i>Cantidad</i>
Glucosa	60, 044 g
Citrato de Sodio	3, 703 g
Ácido etileno diaminetetra-acético	3, 702 g
Bicarbonato de sodio	1, 201 g
<i>Diluyente de enfriamiento</i>	
Solución al 11% lactosa	100, 0 ml
Yema de huevo	25, 0 ml
<i>Diluyente de congelación</i>	
Solución al 11% lactosa	100, 0 ml
Yema de huevo	25, 0 ml
Glicerol	9, 0 ml
Pasta Orvus-Es	2, 0 ml

* Diluido en 1000 ml de agua destilada o bidestilada

En el diluyente, debe agregarse como mínimo la siguiente cantidad de alguno de los antibióticos que se indican:

- Espectomicina 300 mg/l
- Gentamicina 250 µg/ml
- Lincomicina 150 mg/l
- Penicilina G sódica 300 mg/l

2.3.13 Envases o geometría de almacenamiento.

Durante los comienzos en el uso de la técnica de criopreservación de semen, el procedimiento consistía en la utilización de ampolletas de vidrio que podían contener 1 ml. de semen, las cuales eran congeladas en un baño de alcohol enfriado a baja velocidad con nieve carbónica en varias etapas (Watson, 1990). Dicho procesamiento del semen en ampollas de vidrio y la utilización de nieve carbónica para la congelación fue la primera metodología utilizada con el semen de verraco, los mejores resultados se obtenían cuando se añadía un 5% de glicerol (Bwanga, 1991). Por lo tanto, la utilización de pastillas y pajuelas en 1964, significó un avance importante para las técnicas utilizadas hasta esa época.

De los cuatro protocolos existentes para la criopreservación de semen de verraco, tres de ellos optaron por la congelación utilizando la pastilla (Pursel y Johnson, 1975; Paquignon y Courot, 1976; Larsson *et al.*, 1977). Por otro lado, Westendorf *et al.* (1975) propusieron el envasado de un mayor volumen de semen en grandes pajuelas conocidas como maxipajuelas o macrotubos, congelados sobre la superficie de nitrógeno líquido, esto es en la fase de vapores del nitrógeno líquido (Bwanga, 1991).

Se consideró que la combinación de bajas concentraciones de glicerol con velocidades rápidas de enfriamiento que proporcionaba el método de congelación en pastilla resultaba mucho más idónea para la conservación de semen de verraco (Pursel y Park, 1985). Éstas rápidas velocidades de enfriamiento eran consecuencia de la forma de la pastilla, que con un elevado ratio superficie/volumen, la transferencia de temperatura en ella es muy eficiente (Watson, 1990), el inconveniente que presenta esta modalidad de envase es la necesidad de manipular una cantidad considerable de ellas para alcanzar la concentración de espermatozoides necesarios para la dosis seminal (Holt, 2000), ya que la congelación de semen de verraco se recomienda realizar en mayores volúmenes por razones prácticas, que está relacionada directamente con la anatomía del tracto reproductivo de la hembra (Bwanga, 1991).

En el caso de la maxipajuela o macrotubo, que pueden contener 5 ml. lo que permite congelar y descongelar un único envase, pero debido sus características geométricas la disipación o transferencia de calor se afecta notablemente, ya que durante el proceso de congelación y

descongelación existen diferencias de temperatura entre la zona más externa de la maxipajuela y el centro de ella (Watson, 1990; Córdova *et al.*, 2002). Ha llegado a determinarse; por ejemplo, que la velocidad de descongelación en esta región periférica es 3,75 veces más rápida que la del centro de la pajuela (Hofmo y Almlid, 1991), pudiendo existir, en consecuencia, hasta 15°C de diferencia entre el centro y la superficie de una maxipajuela descongelada (Bwanga *et al.*, 1990).

Se han realizado avances en el campo de los envases utilizados en la congelación de semen de verraco, concretamente en el procedimiento de congelación utilizando pajuelas, fundamentalmente en la modificación del valor de la relación superficie/volumen y en la utilización de biocongeladores programables, con los que el descenso de temperatura durante la congelación se produce según las indicaciones que establece el usuario. Bwanga *et al.* (1990) comprobaron que con la congelación en minipajuelas de 0.25 ml, se obtiene una buena disipación de “calor latente de fusión”, término que define el proceso por el cual durante la congelación y justo en el momento de producirse la cristalización tras la situación de superenfriamiento aparece un efecto rebote en la temperatura que genera calor, la temperatura aumenta bruscamente hasta el punto de congelación (Watson, 1995; Holt, 2000), dicho aumento brusco implica que la temperatura deje de descender en paralelo con la cámara de congelación, por lo tanto el tiempo que tarda en disiparse ese calor es crucial, dicho tiempo puede ser de dos o tres minutos en el cual la temperatura permanece estática para después reiniciar el enfriamiento, tal espacio de tiempo se conoce como “meseta del punto de congelación”, si tarda demasiado tiempo puede resultar perjudicial.

El volumen que brinda la pajuela para la criopreservación tiene repercusiones notables sobre la calidad poscongelación del semen, pues si se compara con las maxipajuelas, se obtienen mayores porcentajes de movilidad en los espermatozoides y acrosomas normales si la congelación se realiza en envases cuya relación superficie volumen resulta más favorable (Weitze *et al.*, 1988; Bwanga *et al.*, 1990).

Con la introducción de sistemas computarizados de congelación aplicados para el semen de verraco (Hammitt y Martin, 1989), que supone una ventaja con respecto al método de congelación clásico de los vapores estáticos de nitrógeno líquido, ya que permite congelar un número elevado de muestras (Holt, 2000), se consigue una calidad homogénea de congelación, pues los vapores de nitrógeno son bombeados a una velocidad controlada hacia el interior de la cámara de congelación y

un ventilador los hace circular uniformemente entre todas las pajuelas (Hammit y Martin, 1989), es posible también con la utilización de un biocongelador, programar distintas velocidades de enfriamiento dependiendo la etapa del proceso; es decir, se ha comprobado que es beneficioso aplicar velocidades lentas de enfriamiento durante la etapa previa a la cristalización (Hofmo y Almlid, 1991).

Por lo tanto, según el trabajo de algunos autores (Berger y Fischerleitner, 1992), la combinación del uso de biocongeladores y minipajuelas se ha revelado como la mejor opción para optimizar la calidad del semen, cuando el semen fue utilizado en una prueba de campo donde se obtuvieron muy buenos resultados, partos del 75% de las cerdas inseminadas y 9 lechones de media por camada, pero no se realizaron estudios de comparación con otros métodos practicados en el estudio de la calidad seminal, lo cual sí se realizó en un estudio de Simmet (1993), quien obtiene los mejores resultados en cuanto a calidad y fertilidad, con semen congelado en tubos aplanados de 2 ml; Córdova *et al.* (2001), por su parte, no encuentran influencia del volumen de la pajuela de 0,5 ml vs 5 ml ni en la calidad seminal ni en la capacidad fecundante *in vitro*, habiendo utilizado un procedimiento de congelación con vapores estáticos de nitrógeno.

Las características en cuanto a relación superficie/volumen de la pajuela, no presenta realmente gran ventaja para la técnica de inseminación artificial, la modificación de los macrotubos a pajuelas aplanadas (Weitze *et al.*, 1988), redujo su capacidad de 5 ml a 1,7 ml y la utilización de minipajuelas de 1, 0,5, ó 0,25 ml, probada por otros autores, plantea aun más el problema de poder conservar en un solo envase la cantidad necesaria de semen para la inseminación artificial (Bwanga *et al.*, 1990; Fiser y Fairfull, 1990; Berger y Fischerleitner, 1992); por lo tanto, la maxipajuela es el envase más adecuado si se ve desde este punto de vista, aunque presenta problemas criobiológicos, así pues se ha venido introduciendo las bolsas de plástico planas como nuevo envase (Bwanga *et al.*, 1991a), que resultan ser una buena alternativa a las maxipajuelas en la conservación del semen de verraco, en volúmenes de 5 ml. La utilización de las bolsas de plástico en la congelación de semen de verraco ya se había probado en los años 70' pero los resultados no fueron favorables, los malos resultados se atribuyeron al método de congelación, el cual era mediante vapores de nitrógeno líquido (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1996). Lo que cambió en los años 80' cuando se comunicó que la utilización de los biocongeladores mejora la calidad de la congelación.

Debido a las dimensiones de la bolsa de plástico planas, se pueden conservar volúmenes de 5 ml, en un grosor aproximado de 1 mm, lo que representa un grosor menor al de las minipajuelas de 0.25 ml, lo que hace que la disipación de calor se eficiente durante la congelación y descongelación, y sin que su manejo, ni almacenamiento representen mayor problema (Bwanga *et al.*, 1991a); ello se comprueba con los resultados que se han obtenido y que muestran que los mejores resultados de calidad seminal se han correspondido con un incremento significativo en la capacidad fecundante (Bwanga *et al.*, 1991b). El inconveniente de este nuevo envase es el material y tamaño de su fabricación (Rodríguez-Martínez *et al.*, 1996). Estudios realizados en este sentido, han conducido a una situación en las que las limitaciones de este envase han quedado superadas, pues se han reportado resultados en experiencias de congelación que han utilizado un material plástico diferente al PVC o teflón que se utilizaba anteriormente, este material es tereftalato de polietileno (PET) y con dimensiones de 0.2 mm de grosor; 30 x 2.2 cm², con el que no se han detectados efectos perjudiciales sobre el plasmalema de los espermatozoides (Bwanga *et al.*, 1991a; Eriksson y Rodríguez-Martínez, 1999), así estudios comparativos realizados entre las maxipajuelas y las bolsas planas, variando la velocidad de congelación y descongelación han revelado diferencias en la calidad seminal a favor de las bolsas planas, los autores del estudio sugieren que la diferencia no se debe a las diferentes curvas de congelación que ocurren en los dos tipos de envases, en la cual la meseta del punto de congelación es más prolongada en las maxipajuelas, como en un principio se creía (Bwanga *et al.*, 1991a), sino más bien a la rápida descongelación que ocurre en el caso de las bolsas planas entre los -20 y los 0°C (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000).

Dos hechos respaldan la superioridad técnica de este envase conocido como *Flatpack*, pues proporciona resultados óptimos en cuanto a supervivencia espermática en un alto número de verracos, encontrando movilidad de 52%, integridad de la membrana de 61%, consiguiéndose excelentes rendimientos reproductivos, aunque obteniendo resultados variables entre granjas, aplicando la técnica más habitual de inseminación artificial, consiguiendo un porcentaje de fertilidad de 70% (rango: 52-80%), una prolificidad de 10.3 lechones por camada (rango: 9,7-11,9) (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 1999). Lo que satisface dos exigencias en la congelación de semen de verraco: disminuir las variaciones de congelabilidad entre individuos y conseguir al menos 65-70% de partos de forma consistente en condiciones de campo (Reed, 1985).

2.5 SUSTANCIAS REACTIVAS DE OXIGENO.

Todas las células vivas producen bajo condiciones aeróbicas sustancias reactivas de oxígeno, las cuales se originan principalmente de funciones metabólicas normales de la misma célula (Brouwers *et al.*, 2005). Son sustancias químicas, que tienen un electrón no apareado, lo que les convierte en altamente reactiva (Hicks, 2001). Para poder alcanzar la estabilidad estas moléculas sustraen electrones de otras, este proceso provoca daño en las biomoléculas con las que reaccionan, las moléculas por las que sienten afinidad son sobre todo los ácidos poliinsaturados de las membranas plasmáticas, colesterol, carbohidratos, nucleótidos en el ADN y proteínas (Beckman y Ames, 1998; Brouwers *et al.*, 2005).

Dentro de las ROS (Beckman y Ames, 1998), destacan principalmente el anión superóxido (O_2^-), el hidroxilo ($\cdot OH$), y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2). El radical hidroxilo es altamente reactivo y es capaz de reaccionar con casi cualquier componente celular aunque tienen gran afinidad por la alta cantidad de ácidos poliinsaturados que contiene la membrana de los espermatozoides sobre todo en la especie porcina.

Una vez formadas dan lugar a una serie de reacciones en cadena como la PL, que causa daño a moléculas de importancia biológica, ya sea por una alteración en su estructura y función, por aceleración de la proteólisis endógena selectiva o por el incremento en la función enzimática (Zorrilla y Fernández, 1999; Zorrilla, 2002).

2.5.1 Peroxidación lipídica.

Se define como el desequilibrio en el balance oxidorreductor celular hacia la reducción. Es la incapacidad de las defensas antioxidantes del organismo para compensar la cantidad de radicales libres lo que resulta en una proliferación de ROS, en esta situación es en la que se presentan las lesiones celulares. Como hemos mencionado antes los radicales libres reaccionan preferentemente con los lípidos de la membrana, también reaccionan con proteínas, carbohidratos y ADN, por lo que pueden desencadenar una serie de problemas como disfunción mitocondrial excitotoxicidad y apoptosis si el daño es muy extenso (Hicks *et al.*, 2006).

La iniciación de la PL es favorecida por algún tipo de iniciador, este puede ser cualquier molécula con la capacidad de extraer un átomo de hidrogeno de un radical metileno (-CH₂-), esta manera se produce la formación de un radical orgánico y que puede ocurrir en cualquier parte de la cadena de AGP (Minotti y Aust, 1992; Ryan y Aust, 1992). Se ha considerado como uno de los principales iniciadores de esta cadena al radical hidroxilo que es el más reactivo, que se genera a partir de la reacción de Haber-Weiss, en la que participan el O₂⁻ y el Fe⁺³ (Minotti y Aust, 1987).

La segunda parte en esta cadena se conoce como la fase de propagación, en la que en primer lugar el radical orgánico sufre reacciones de combinaciones y adición con el oxígeno generando radicales peroxilo orgánicos (ROO). La propagación se produce debido a la capacidad que de los ROO poseen para captar un átomo de hidrogeno desde un enlace alílico de una molécula lipídica vecina, formando así hidroperóxidos (ROOH).

A la fase de propagación se le sucede la fase de terminación, en dicha fase se combinan los productos iniciales de la peroxidación (radicales lipídicos) para dar origen a compuestos no radicales como en el Malondialdehído (Minotti y Aust, 1987).

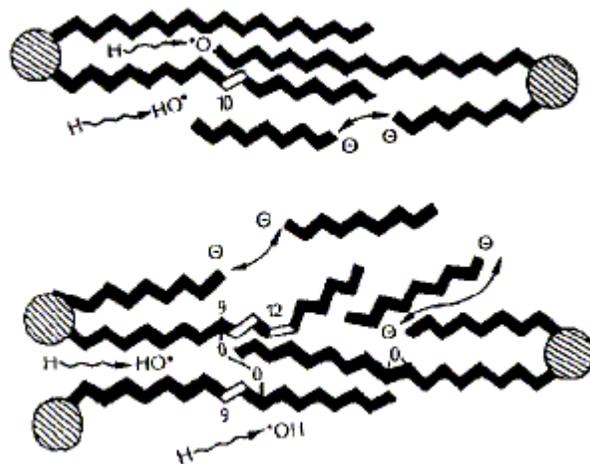
2.5.2 Efecto sobre los lípidos.

Se ha mencionado que es en los lípidos donde se provoca el mayor daño, por lo tanto las estructuras de la membrana del espermatozoide porcino son muy susceptibles de sufrirla, por tener mayor presencia de dichas moléculas en su estructura en comparación a otras especies (Hyang *et al.*, 2000; Venereo 2002; Peláez, 2003; Córdova *et al.*, 2009). La PL se inicia cuando los ROS atacan un ácido graso poliinsaturados quitándole un átomo de hidrogeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para poder formar un radical libre ácido graso, esta molécula incorpora rápidamente oxígeno y se transforma en radical libre (peroxilo ácido graso), que actúa como transportador de la reacción en cadena ya que ataca a otros AGP lo que inicia nuevas reacciones. Este mecanismo se facilita si existe presencia de iones de metales en transición y por la presencia de los dobles enlaces existentes en los AGP. Así pues los productos finales de la PL son lípidos peroxidados, que al degradarse forman nuevos radicales libres y una serie de compuestos que son tóxicos para la célula, como son por ejemplo los aldehídos, entre ellos 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y el de principal interés para este trabajo, el MDA. Cuando los AGP forman parte de las membranas

celulares o intracelulares el daño en su estructura es más severo, puesto que se altera su fluidez, permeabilidad y metabolismo, lo que puede provocar la muerte celular (Cerolini *et al.*, 2001; Chihuailaf *et al.*, 2002; Blokhina *et al.*, 2003; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Los factores que intervienen en la intensidad con la que se presenta la PL son variados, por un lado la naturaleza del agente inicializador, la cantidad de AGP contenidos en la membrana celular y su accesibilidad, la tensión de oxígeno, la presencia de hierro, el contenido celular de antioxidantes como alfatocoferoles y glutatión entre otros y la activación de enzimas que pueden terminar la cadena de reacción como es el caso de la glutatión peroxidasa (GSH-Prx) (Cerolini *et al.*, 2001; Sellés, 2001; Venereo, 2002).

Figura 7. Representación esquemática del daño producido por los radicales libres en los fosfolípidos de las membranas celulares. (Lopez *et al.*, 1997).



2.5.3 Efecto sobre las proteínas.

Debido a que las reacciones en el caso de las proteínas son mucho más lentas, el daño provocado por los ROS no es tan severo como en el caso de los lípidos. Cárdenas y Pedraza, (2006) mencionaron que los ROS causan la oxidación de los residuos de los aminoácidos, el rompimiento de los enlaces peptídicos y la agregación entre proteínas, lo que puede provocar la pérdida de las funciones enzimáticas, daños en la integridad de proteínas estructurales o alterar la regulación de las vías metabólicas. Las proteínas sufren daños localizados en los sitios ligados a metales de transición, dichos sitios son especialmente sensibles debido a la facilidad con la que los metales reaccionan con el peróxido de hidrogeno para formar iones de hidroxilo, los que, posteriormente atacan a los aminoácidos adyacentes, dicha oxidación de las proteínas tiene como resultado la formación de peróxidos y carbonilos (Venereo, 2002; Córdova *et al.*, 2009).

Kirchhoff (1998); Blokhina *et al.* (2003); Cárdenas y Pedraza (2006) indicaron que la reparación de las proteínas solo se limita a los residuos de la metionina, por lo tanto, las proteínas oxidadas deben ser hidrolizadas, evitando así su difusión en la red metabólica o su interacción con otras proteínas.

2.5.4 Efecto sobre el ADN.

El ADN también es un blanco para los ROS, sobre todo el mitocondrial, debido a su localización se encuentra expuesto a un número elevado de ROS que proceden de la cadena respiratoria, además de tener poca estabilidad debido a la falta de histonas en su estructura (Venereo, 2002; Tamer *et al.*, 2005; Tejerina *et al.*, 2008) el daño es provocado al reaccionar los ROS con las bases nitrogenadas y con la desoxirribosa. Básicamente el daño se refiere a que se provoca una fragmentación del ADN, ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento del ADN dentro de la cromatina, por lo que se altera la regulación de la transcripción genética (Trisini *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Chihuailaf *et al.* (2002) mencionan que los mecanismos de reparación en este caso son menos eficientes, en contradicción a otros autores que afirman que cuando los ROS llegan al núcleo o se producen dentro de él, existen mecanismos de reparación que funcionan de manera eficiente,

haciendo una revisión de la secuencia de bases lo que permite localizar los daños ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases, o en el caso de que el daño sea en un área más grande se realiza la total sustitución del segmento dañado por medio de la nucleasa, para ser reemplazados por la ADN polimerasa I y la ligasa.

Por último mencionar que Blokhina *et al.* (2003) indicó que la glucosa y otros monosacáridos relacionados, sufren peroxidación bajo ciertas circunstancias, que forma compuestos dicarbinílicos y peróxido de hidrogeno, lo más importante de este hecho es que estas biomoléculas una vez activadas pueden interactuar con otras y formar nuevas asociaciones moleculares.

2.5.5 Daño oxidativo sobre los espermatozoides.

Los espermatozoides producen y liberan ROS al medio extracelular, que son en su mayoría producidos por las mitocondrias, y son el producto de la reducción monovalente del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa (Kirchhoff 1998; Álvarez 2006).

La alta concentración de AGP la membrana plasmática de los espermatozoides y el pequeño tamaño de su citoplasma favorecen la producción de ROS, las cuales como hemos mencionado antes perjudican el correcto funcionamiento de la célula espermática, funciones de gran importancia desde el punto de vista reproductivo, tales como movilidad y vitalidad, con su consecuente pérdida de la capacidad de fusión esperma-ovocito (Saezet *et al.*, 1998; Castillo *et al.* 2001; Álvarez 2006) demostraron que los ROS inducen peroxidación de AGP eterificados a fosfolípidos de membrana, lo cual produce alteraciones en la permeabilidad de la membrana, es decir, provoca la aparición de puntos (orificios), lo que conduce a una pérdida de la vitalidad, movilidad y capacidad fecundante del espermatozoide. La producción de energía (ATP) también se ve afectada por los ROS, al inactivar algunas enzimas glucolíticas que tienen como consecuencia la pérdida de movilidad por la falta de combustible para que la contracción de los microtúbulos flagelares del espermatozoide sea posible.

La disminución de las funciones del espermatozoide durante su conservación se ha relacionado con el aumento en la formación de ROS durante el proceso, el daño provocado en la estructura de la membrana de la mitocondria puede ser uno de los factores de mayor importancia

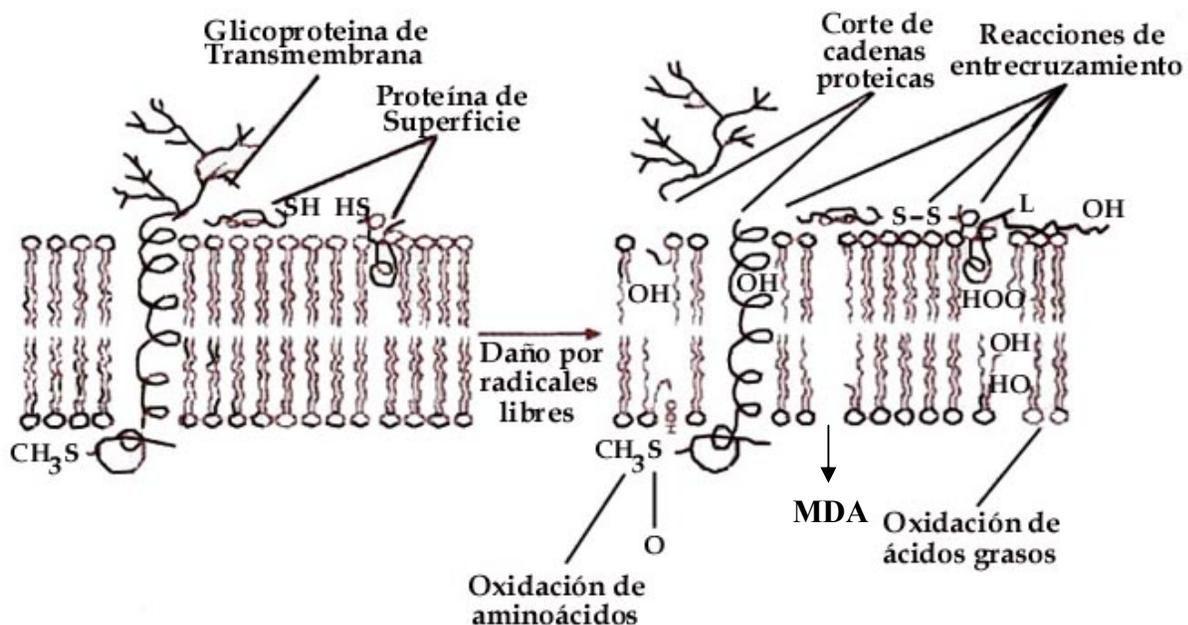
para explicar la pérdida de la fertilidad en semen criopreservado (Cummings *et al.*, 1994; Kumaresan *et al.*, 2009).

Saezet *et al.* (1998) indicaron que paradójicamente, los espermatozoides requieren una ligera producción intracelular de anión superóxido (O_2^-) para mejorar el proceso de formación y la reacción acrosomal.

El daño que se produce sobre el acrosoma por efecto del estrés oxidativo es causado durante el transporte de los mismos a través del epidídimo, básicamente, por el peróxido de hidrogeno, el daño provocado inhibe la inducción de la reacción acrosomal, también se ha comentado que el peróxido de hidrogeno daña la integridad del acrosoma pero no afecta el correcto funcionamiento de la capacidad de movimiento del espermatozoide (Castillo *et al.*, 2001; Álvarez 2006).

Se ha señalado que el daño sobre el ADN de los espermatozoides se produce después de la espermiación, durante el viaje de las células maduras junto con las inmaduras desde los túbulos seminíferos, debido a que los espermatozoides inmaduros producen una mayor cantidad de ROS.

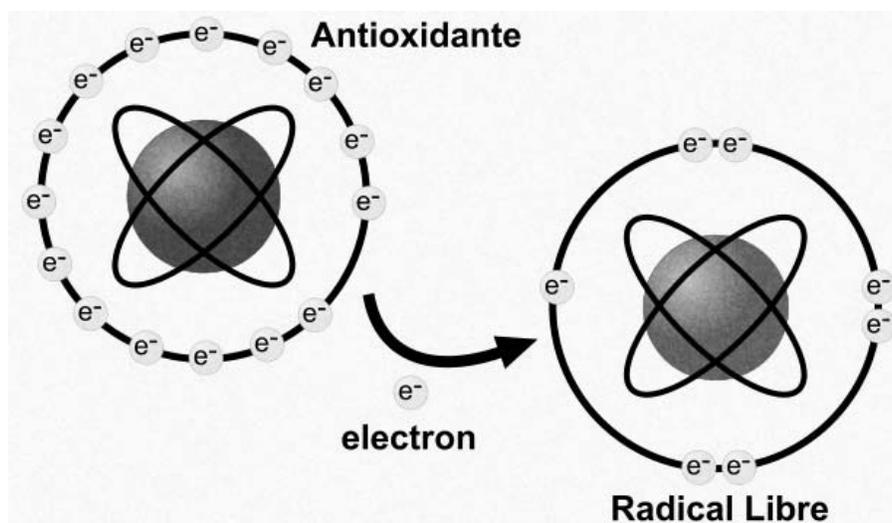
Figura 8. Representación de los daños producidos por la peroxidación lipídica a la célula y producción de MDA. (Academia Biomédica Digital)



2.6 ANTIOXIDANTES.

Los espermatozoides están equipados con sistemas de protección contra los efectos tóxicos de los ROS, por lo que la función de un antioxidante es ser donador de electrones para evitar una reacción en cadena de oxido-reducción (Hicks *et al.* 2006) (figura 9), ejercen funciones como, evitar alteraciones de moléculas tales como lípidos, proteínas, ADN, etc. Su acción se realiza ya sea en un medio hidrofílico como hidrofóbico, mantienen el equilibrio prooxidante-antioxidante obviamente favoreciendo este último, o simplemente como le mencionan algunos autores (Chihuailaf *et al.* 2002; Membrillo *et al.* 2003) son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones.

Figura 9. Acción del antioxidante frente a los radicales libres. Se muestra la acción que ejercen los antioxidantes, cediendo electrones para estabilizar al radical libre y evitar su reacción con otras moléculas.



Chihuailaf *et al.* (2002); Aitken y Krausz (2001) y Castillo *et al.* (2001) coinciden en mencionar que, para que la protección contra los radicales libres sea lo más eficiente posible, la acción de los antioxidantes plasmáticos e intracelulares debe ser integrados armónicamente. Los radicales libres se distribuyen preferentemente en organelos que, por la intensidad de su actividad metabólica generan un número mayor de radicales libres localizados tanto en membranas como en el citoplasma de las células.

La protección que los antioxidantes proveen a los organismos aerobios, involucran antioxidantes con función:

Preventiva. Diversas proteínas con núcleos enlazados o coordinados a metales (albumina, metalotioneína y ceruloplasmina, cobre); ferritina, transferrina y mioglobina, así como hierro, que previenen la formación de ROS por encima de los niveles normales del organismo (Chihuailaf *et al.*, 2002; Aitken y Krausz 2001; Castillo *et al.*, 2001).

Reparadora. Como el nombre lo indica son enzimas que reparan o eliminan las biomoléculas que ya han sido dañadas por causa de los radicales libres, como son superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GP), glutatión reductasa y catalasa (Chihuailaf *et al.* 2002; Aitken y Krausz, 2001 y Castillo *et al.*, 2001).

Secuestradora. Su acción se basa en atrapar para limitar la exposición de las biomoléculas los iones Fe^{+3} y Cu^{+2} , ya que cuando se encuentran en exceso promueven la generación de radicales libres, las proteínas que ejercen esta función son ferritina, transferrina, lactoferrina, ceruloplasmina, haptoglobina, metalotioneína, hemopexina y carnosina, también se pueden incluir otros como tocoferol, betacaroteno, ácido ascórbico y flavonoides (Chihuailaf *et al.*, 2002; Castillo *et al.*, 2001; Aitken y Krausz, 2001).

Un componente adicional de la red de antioxidantes, son las proteínas de almacén y transporte de iones metálicos (Chihuailaf *et al.*, 2002).

2.6.1 Clasificación de los antioxidantes.

De acuerdo a su sitio de acción se puede realizar una clasificación de los antioxidantes según Venereo, (2002).

Tabla 3. Clasificación de los antioxidantes según su sitio de acción. (Córdova *et al.*, 2009)

INTRACELULAR	MEMBRANA	EXTRACELULAR
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferrinas
Peroxidasa	Ubiquinol-10	Lactoferrinas
DT-deafanasa		Albúminas
Glutatión reducido		Haptoglobinas
Proteínas que ligan metales		Vitamina C
Sistemas proteolíticos		Ácido úrico
Vitamina C		Vitamina E

Tabla 4. Clasificación de los antioxidantes según su origen. (Reylli y Burkley, 1990).

ORIGEN	ACCIÓN
1. EXÓGENOS	
Vitamina E	Neutraliza al oxígeno singlete.
	Captura radicales libres de hidroxilo.
	Captura O ₂ .
	Neutraliza peróxidos.
Vitamina C	Neutraliza al oxígeno singlete.
	Captura radicales libres de hidroxilo.
	Captura O ₂ .
	Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
Betacarotenos	Neutraliza al oxígeno singlete.
Flavonoides, licopenos	
2. ENDÓGENOS	
Enzimáticos	Cofactor.
Superóxido dismutasa (SOD)	Cobre, sodio, magnesio.
Catalasa (CAT)	Hierro.
Glutación Peroxidasa (GPx)	Selenio.
3. NO ENZIMÁTICOS	
Glutación (GSH)	Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.
Coenzima Q	
Ácido tioctico	Transportadores de metales (transferían y ceruloplasmina).

Según Hicks *et al.*, (2006), la clasificación de los antioxidantes más utilizadas establecen las diferencias de acuerdo a su estructura química y función biológica, así pues se dividen en naturales enzimáticos y no enzimáticos.

2.6.2 Antioxidantes naturales.

2.6.2.1 Antioxidantes enzimáticos.

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos, que son regulados de acuerdo a los requerimientos celulares; pueden ser inducidas, inhibidas o activadas por efectos endógenos (Hicks *et al.*, 2006). En el caso de los espermatozoides del epidídimo estos son protegidos básicamente por 5 enzimas (Membrillo *et al.*, 2003):

- glutatión peroxidasa (GPx)
- fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx)
- glutatión reductasa (GR)
- superóxido dismutasa (SOD)
- catalasa (CAT)

Los antioxidantes enzimáticos, catalizan la transferencia de electrones desde un sustrato hasta los radicales libres, así pues los sustratos o agentes reductores empleados en estas reacciones se regeneran para poder ejercer nuevamente su función, este proceso se lleva a cabo sirviéndose del NADPH producidas en las diferentes rutas metabólicas. El NADPH, que es muy importante para procesos fisiológicos tiende a disminuir en presencia prolongada de ROS, pese a que algunos antioxidantes enzimáticos no consumen cofactores (Chihuilaf *et al.*, 2002).

El GPx es una selenoproteína, en las células animales se ubica en la matriz mitocondrial y en el citoplasma de los eritrocitos, lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune, cataliza la reducción del peróxido de hidrogeno a lipoperoxido (L-OOH), esta enzima utiliza como agente reductor el GHS, los productos de esta reacción son el glutatión oxidado (GSSG) y el agua (Cárdenas y Pedraza, 2006). Esta enzima se ha encontrado en tejido testicular y en espermatozoides de mamíferos (Ursini *et al.*, 1999) y como enzima que desempeña un papel estructural en la capsula mitocondrial de la parte media y en el flagelo de los espermatozoides (Kirchhoff, 1998; Marín-Guzmán *et al.*, 2000b), cumpliendo de esta forma una función metabólica importante como antioxidante (Verma y Kanwar, 1999). Según Venereo (2002) y Cárdenas y

Pedraza (2006), existe tres formas distintas de esta enzima tanto en su ubicación como en la afinidad hacia su sustrato; GPx-c clásica o forma celular, que se encuentra en casi todas las células y tiene una mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno. GPx -p plasmática o forma extracelular: muestra afinidad por el lipoperoxido y el peróxido de hidrógeno se sintetiza en las células tubulares del riñón. GPx-PH fosfolípido hidroperóxido: muestra una afinidad específica por los lipoperoxidos, cuya función principal es proteger contra la lipoperoxidación reduciendo hidroperóxidos de ácidos grasos en las membranas celulares y previniendo la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (Marín-Guzmán *et al.*, 2000b; Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Chihuailaf *et al.* (2002) indicaron una cuarta forma de la GPx, que es la gastrointestinal y representa la principal peroxidasa dependiente de GSH en el tracto gastrointestinal.

La catalasa (CAT) es una proteína que cuenta con 4 grupos hemo, se localiza a nivel celular (mitocondrias, peroxisomas, citosol y eritrocitos), bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan las funciones de las peroxidases, mientras que las altas concentraciones de peróxido son catalizadas por esta enzima (Chihuailaf *et al.* 2002; Venereo, 2002; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Chihuailaf *et al.* (2002) menciona que la enzima superóxido dismutasa (SOD), que se encuentra presente en células aerobias y fluidos extracelulares y que tiene como función principal la protección contra el anión superóxido, debe su biosíntesis en gran medida a la concentración del sustrato sobre el que actúa (Blokhina *et al.*, 2003).

Blokhina *et al.* (2003); Cárdenas y Pedraza (2006) mencionan dos isoformas citosólicas de la enzima glutatión S-transferasa (GST), su función principal es catalizar la conjugación de GSH con una gran variedad de compuestos orgánicos, las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente del selenio, y además tiene la capacidad de detoxificar al 4-hidroxinonal que es un producto de la peroxidación de los lípidos.

La enzima CAT ejerce dos funciones, la primera como catalizadora en la descomposición del peróxido de hidrógeno (proveniente de la disminución del superóxido) en agua y oxígeno, esta función la comparte con la glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores, la segunda función

es peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante catalasa/superóxido dismutasa (CAT/SOD) que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrogeno (Venereo, 2002).

2.6.2.2 Antioxidantes no enzimáticos.

Este grupo de antioxidantes está compuesto por moléculas hidrófobas e hidrófilas que tienen la capacidad de capturar radicales libres y que origina especies químicas que tienen un menor efecto dañino para la integridad celular, el mecanismo de acción de estas moléculas se basa en la donación de un electrón a un radical libre con la finalidad de estabilizarlo, las moléculas hidrófilas se localizan principalmente en el citoplasma, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares (Chihuailaf *et al.*, 2002).

Vitamina A. Por su conformación estructural son excelentes capturando radicales libres, ejercen su protección contra la lipoperoxidación, sobre todo, por la inducida por el sistema de la xantina oxidasa, también elimina el ión superóxido y radicales peroxilos, de la misma forma que la vitamina C, se puede comportar como prooxidante, pueden causar estrés oxidativo mediante el incremento de los radicales libres, aparentemente cuando la presión del oxígeno es parcialmente alta, esta acción en parte depende de la presencia de otros carotenoides y de la interacción con otros antioxidantes como la vitamina E (Olguin *et al.*, 2004).

Vitamina C. Representa el oxidante más importante en los líquidos extracelulares, es una sustancia hidrosoluble, reacciona de forma directa en contra de los radicales libres superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos (Chihuailaf *et al.*, 2002). Esta vitamina protege contra el daño oxidativo al ADN, proteínas y contra la peroxidación de los espermatozoides, la vitamina C ha tenido efectos protectores sobre la integridad de la membrana de espermatozoides almacenados a 5°C; sin embargo, no mejora significativamente el mantenimiento de la vitalidad espermática (Membrillo *et al.*, 2003).

Vitamina E. El nombre genérico de esta vitamina hace referencia a sus 8 isómeros. Estructuras de tocoferol de los cuales el α - es una vitamina hidrosoluble, principal antioxidante en las membranas celulares junto al γ -tocopherol se le considera esencial para la protección celular. El α -tocopherol posee un grupo OH unido a su porción hidrofóbica, cuyo H se puede remover con facilidad para funcionar

como donador de electrones (Oldfield, 2003). La captura de los radicales superóxido, hidroxilo y peroxilos lipídicos la desarrolla en membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y detiene la propagación de la lipoperoxidación. Los radicales peroxilos generados durante la PL extraen el H de la molécula del tocoferol, el radical tocoferol resultante es poco reactivo por lo que detiene la reacción en cadena, dicho radical migra hacia la superficie de la membrana y se convierte en un radical libre tocoferoxilo, este se regenera a alfa tocoferol por reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A (Blokhina *et al.*, 2003; Córdova *et al.*, 2009). La vitamina E además de proteger contra la oxidación de los lípidos, protege el ADN, y reduce el nivel de mutación cromosómica en las células espermáticas (Fenech *et al.*, 1997 Córdova *et al.*, 2009).

Glutación. Es un compuesto antioxidante que se encuentra presente en el ambiente que rodea al espermatozoide. Blokhina *et al.* (2003) comunicaron que es un agente de bajo peso molecular que atrapa ROS. Su forma reducida (GSH) es un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y constituye el compuesto tiólico de bajo peso molecular más abundante en las células de los mamíferos. Sus propiedades químicas le permiten ejercer su acción frente a diversos compuestos oxidantes, tales como peróxido de hidrogeno, superóxido, hidroxilo y especies reactivas del carbono, también realiza la función de reducir el radical libre tocoferoxilo y deshidroascorbato y los reconvierte a su forma original (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004).

Acido Úrico. Aunque siempre se le ha considerado como producto final del metabolismo de las purinas, posee funciones antioxidantes tanto intracelularmente como extracelularmente, dicha función se ha comenzado a valorar. Previene la oxidación de la vitamina C y forma complejos con los metales Fe y Cu (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

2.6.2.3 Función antioxidante de los metales.

Algunos minerales están relacionados con la protección contra el daño oxidativo, como es el caso de Zn, Se, Mn, Fe y Cu, a pesar que su mecanismo de acción es a través de su participación en mecanismos enzimáticos, ya sea como componentes estructurales o activadores, también son capaces de ejercer actividad antioxidante por si solos (Chihuailaf *et al.*, 2002).

En este sentido el Zinc ejerce su actividad de dos maneras, la primera requiere una exposición prolongada a este mineral lo que desencadena de metalotioneínas, que en último término, son las que ejercen la acción antioxidante. La otra forma se refiere a un efecto inmediato la cual se desarrolla a través de dos vías, reduciendo la formación de radicales hidroxilos a partir del peróxido de hidrogeno mediante la competencia con los iones Fe^{+2} y Cu^{+} que participan en la reacción de Fenton, o bien disminuyendo la susceptibilidad de los grupos sulfidrilos de las proteínas a la oxidación (Chihuailaf *et al.*, 2002; Córdova *et al.*, 2009).

La deficiencia del Se, se traduce en la disminución de la actividad de la GSH-Px y otras selenoenzimas, dicha falta de actividad deja a la célula expuesta al daño oxidativo de los ROS (Córdova *et al.*, 2009), de igual forma las deficiencias de este mineral se han relacionado con problemas de fertilidad, donde se ha implicado al estrés oxidativo como un factor y un causante mayor que provoca la alteración de la calidad y viabilidad espermática (Tamer *et al.*, 2005). Se sabe que una dieta suplementada con selenio y vitamina E mejora la calidad espermática, sobre todo en el caso de la especie porcina, ya que la membrana de los espermatozoides de esta especie contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, lo que los predispone a la PL, daño oxidativo a la mitocondria y daño nuclear al ADN (Hyang Song *et al.*, 2000; Sellés, 2001; Cerolini *et al.*, 2001; Córdova *et al.*, 2009).

En el caso del Mg aún no es claro del todo la función que desempeña, estudios realizados le otorgan propiedades protectoras contra la lipoperoxidación en algunos tejidos, se presume que funciona como un capturador de radicales hidroxilo y superóxido, también como promotor de la síntesis de metalotioneínas (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olguín *et al.*, 2004; Cádenas y Pedraza, 2006).

Si bien los minerales Fe y Cu desarrollan importantes funciones antioxidantes, ya sea como constituyente de enzimas y/o proteínas, también pueden ser grandes formadores de radicales libres cuando se encuentra en su forma $Fe^{2/+3}$ y $Cu^{+/+2}$ siendo la más reactiva la forma reducida, que promueven la descomposición del peróxido de hidrógeno cuyo producto final más importante es el radical hidroxilo. Esta es una de las principales vías de producción del radical hidroxilo en el medio celular y se conoce como reacción de Fenton (Chihuailaf *et al.*, 2002; Olgún *et al.*, 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006; Córdova *et al.*, 2009).

2.6.3 Antioxidantes sintéticos.

La necesidad de obtener protección contra el daño oxidativo, la cual fuera más efectiva y económicamente más asequible, impulsó la creación de estos antioxidantes, dentro de los cuales destacan BHT, BHA, Galato de Propilo y TBHQ, que se han utilizado en la industria alimenticia y ahora también en la conservación espermática (Córdova *et al.*, 2009).

El BHT (*butil hidroxitolueno*) posee una gran solubilidad en varios aceites y grasas, pero para que su acción sea más eficiente ya que no es tan eficiente en comparación a otros antioxidantes, por lo tanto se debe utilizar en combinación con otro antioxidante, es uno de los productos más antiguos del mercado. Membrillo *et al.*, (2003) mencionaron que el BHT en espermatozoides durante almacenamiento líquido, logra un mejoramiento en la integridad de la membrana, en la movilidad y en la supervivencia espermática. El BHA (*butil hidroxianisol*) a diferencia del BHT es más eficiente en aceites vegetales, pero posee su misma volatilidad por lo que su manejo debe ser cuidadoso, en el semen conservado tiene un efecto positivo en el mantenimiento de la movilidad (Membrillo *et al.*, 2003; Córdova *et al.*, 2009).

El Galato de Propilo, en comparación con los dos anteriores, es el antioxidante más eficiente en cuanto a conservación de grasa de origen animal, su efecto sobre la movilidad es positiva, aunque su acción puede quedar anulada dependiendo del diluyente específico utilizado. Por último El TBHQ (*terc-butilhidroquinona*), que muestra más eficacia que los anteriores mencionados, cumpliendo las mismas funciones pero de una manera más efectiva en cuanto a la protección contra el daño oxidativo (Córdova *et al.*, 2009).

2.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS SEMINAL.

La calidad del semen, ha sido tradicionalmente evaluada con el espermiograma clásico, que se basa en la aplicación de pruebas de ejecución simple, en el que se incluyen pruebas de carácter macroscópico y microscópico, en las que se mide el volumen, concentración, movilidad de los espermatozoides, estado del acrosoma y morfoanomalías espermáticas (Gadea, 2001)

En los centros de inseminación artificial, se detectan machos con una fertilidad reducida y que en su análisis rutinario presentan un espermiograma anormal; sin embargo, en otras ocasiones se presentan espermiogramas normales pertenecientes a machos subfértiles (Gadea, 2001). La manifiesta incapacidad de las técnicas de análisis seminal en el establecimiento de una correcta predicción de la fertilidad, principalmente debida a la complejidad que representa el proceso reproductivo, en el que el resultado final depende de muchos factores como los parámetros de calidad seminal, también por las condiciones propias de la hembra, la interacción de la hembra con el macho y la intervención humana en el proceso (Amann, 1989; Colebrander *et al.*, 2003; Tejerina, 2007).

Según Colebrander *et al.* (1992) y González-Urdiales *et al.* (2006), la estimación de la capacidad fecundante de un macho destinado a la cría, parte de la estimación de datos obtenidos en la valoración de los siguientes aspectos: el análisis clínico del aparato reproductor, evaluación de la libido y capacidad copulatoria, datos de los índices de preñez de montas o inseminaciones pasadas y de los resultados del análisis de los parámetros de calidad seminal, este procedimiento nos permite comprobar el correcto funcionamiento del aparato reproductor del macho, y así identificar los caso claros de infertilidad y subfertilidad (Graham 2001; Rodríguez-Martínez, 2003b; 2006).

Los aspectos que se pueden valorar en el espermatozoide son de carácter físico, tales como concentración espermática por ml de eyaculado, movilidad, integridad de la membrana acrosómica, integridad de la membrana plasmática y morfología, y bioquímico como la actividad metabólica en el consumo de oxígeno, utilización de piruvato, fructólisis y reducción del azul de metileno, determinación de enzimas intracelulares como GOT, acrosina, hialuronidasa, entre otras; también, se valora la concentración de ciertos metabolitos, como ATP, ácido siálico, etc; desde el punto de vista funcional, la respuesta al estrés osmótico, sensibilidad al estrés térmico paso a través de una

columna de Sephadex, estado de la cromatina nuclear, penetración del moco cervical, etc. (Pace, 1980; Watson, 1990; Woelders, 1991); existen otras pruebas que evalúan el comportamiento del espermatozoide frente a los mecanismos de fecundación, como son la evolución del estatus de la capacitación, los procesos que ocurren durante la unión del espermatozoide a la zona pelúcida, la inducción de la reacción acrosomal; así como, la penetración de la zona pelúcida del ovocito propiamente (Woelders, 1991; Peláez, 2003).

Por tanto, las pruebas *in vitro* tradicionales evalúan aspectos físicos del eyaculado como ya hemos mencionado, aspectos como el color, volumen y concentración además de la movilidad y la morfología espermática, si un eyaculado será destinado o no a la inseminación artificial dependerá sobre todo de estos dos últimos aspectos, de acuerdo al estudio realizado su correlación con la fertilidad es variable, en cuanto a la movilidad se describen correlaciones entre $r=0.15$ y $r=0.83$, y en cuanto a la morfología la correlación va de $r=0.06$ a $r=0.86$, datos obtenidos por Rodríguez-Martínez (2003b), en cualquier caso no nos va a permitir llegar a una predicción exacta de la fertilidad.

En la actualidad, existen gran número de pruebas que nos permiten llegar a una mejor predicción de la fertilidad, combinando los múltiples aspectos que evalúan cada una de ellas (Rodríguez-Martínez, 2003b). La citometría de flujo, especialmente ha contribuido valiosamente ya que permite el análisis de diferentes parámetros al mismo tiempo (Graham, 2001; Rodríguez-Martínez 2003b; Colebrander *et al*, 2003; Guillan *et al.*, 2005; Tejerina, 2007), así como las pruebas que simulan los procesos que ocurren durante la fecundación; sin embargo, el inconveniente que presentan estas pruebas es su complejidad y la necesidad de una persona capacitada para su realización, además del alto coste que ellas tienen; por lo tanto, han quedado restringidas al ámbito de la investigación, para Rodríguez-Martínez (2003b) y Tejerina (2007) la prueba ideal de análisis seminal quedaría definida por los siguientes criterios técnicos: objetividad, repetibilidad, exactitud, añadiendo que deberían ser test sencillos, baratos y rápidos.

La primera evaluación que se realiza al eyaculado, es la que se realiza de manera macroscópica, donde se observa el volumen, el aspecto general y color del eyaculado, cuando existe un color distinto al blanco nítido, nos indica la presencia de problemas, como patologías en el aparato reproductor del macho, si la coloración observada en el semen es roja indica la presencia de

alguna hemorragia, marronacea posiblemente hay presencia de una infección piógena o cuando la coloración es amarillenta indica contaminación por orina (Martin-Rillo *et al.*, 1996).

2.7.1 Evaluación de la movilidad espermática.

La técnica que se ha utilizado de manera más frecuente, es la valoración subjetiva que consiste en la observación al microscopio la calidad del movimiento que presentan los espermatozoides en el eyaculado, clasificando este movimiento de manera arbitraria en una escala de 0 a 5 (Martín-Rillo *et al.*, 1996), esta manera se pueden hacer una valoración de la movilidad en masa del eyaculado y también una valoración del movimiento individual de los espermatozoides, la cual se realiza con un mayor aumento en el microscopio óptico, en donde se valora también de forma subjetiva el porcentaje de espermatozoides móviles, el porcentaje de ellos con movimiento progresivo y la calidad de movimiento que presentan en base a una escala arbitraria que va desde 0 en donde el movimiento es inexistente y hasta 5 donde el espermatozoide se mueve de manera progresiva, rectilínea y muy rápida (González- Urdiales *et al.*, 2006). Es la movilidad, el parámetro que se ha utilizado con mayor frecuencia en la determinación de la viabilidad espermática y por consecuencia para determinar la calidad e idoneidad del eyaculado, existen diferentes opiniones en cuanto a la relación del movimiento espermático con la fertilidad (Rodríguez-Martínez, 2003b).

En la actualidad, existe la posibilidad de realizar un análisis más profundo del movimiento espermático, la existencia de programas informáticos que ayudan a la valoración, permiten estudiar parámetros cinéticos en el eyaculado, conocidos como sistemas computer-assisted semen analysis (CASA) aportan precisión y exactitud; sin embargo, aún hace falta trabajar sobre la estandarización de los equipos y procedimientos, pero los resultados son objetivos y fiables (Woelders, 1991; Verstegen *et al.*, 2002, Tejerina, 2007).

2.7.2 Parámetros medidos por el sistema CASA.

Para Drobnis *et al.* (1988), los parámetros cinéticos calculados por un sistema CASA, son: “aspectos geométricos de la movilidad, dependientes del tiempo, que se diferencian mediante cálculos de masa y fuerza”; se trata pues de indicadores que nos aportan información de la velocidad del movimiento del espermatozoide, así como de la frecuencia, los cambios de dirección

y la amplitud de la trayectoria descrita por la cabeza espermática (David *et al.*, 1981; Serres *et al.*, 1984).

Debido a la velocidad con la que el espermatozoide bate el flagelo, los sistemas CASA son incapaces de hacer las lecturas de los parámetros directamente de él, por lo tanto se realiza una medición indirecta del movimiento tomando como referencia la cabeza del espermatozoide (Mortimer, 1997; Bernal, 2009).

Los actuales sistemas de análisis de movimiento espermático calculan al menos los siguientes parámetros derivados del movimiento del centroide de la cabeza espermática:

Velocidad Curvilínea (VCL): Velocidad, en $\mu\text{m/s}$, del espermatozoide en su trayectoria curvilínea, siendo esta la proyección bidimensional de la trayectoria tridimensional real del mismo (Mortimer, 1997). Nos indica la distancia cubierta por la cabeza de la célula espermática en el tiempo de observación. Es siempre mayor o igual (este último supuesto solo se verificará en el caso de que la trayectoria real del espermatozoide sea una línea completamente recta) que las otras dos velocidades.

Velocidad Rectilínea (VSL): Velocidad, en $\mu\text{m/s}$, del espermatozoide en su trayectoria rectilínea, siendo esta la resultante de unir el primer y último punto de la trayectoria curvilínea durante el periodo de observación. Indica la ganancia neta de espacio por parte del espermatozoide, siendo, dentro de los 3 parámetros cinéticos el que presenta el valor más bajo (Mortimer, 1997).

Velocidad media (VAP): Velocidad, en $\mu\text{m/s}$, del espermatozoide en su trayectoria media durante el periodo de observación; siendo la trayectoria media un indicativo de la dirección media de desplazamiento de la célula espermática, sus puntos se obtienen a partir del valor promedio de las coordenadas de los puntos de la trayectoria circular adyacente mediante un proceso matemático denominado “*smoothing*”, si bien es posible realizar el trazado manual o geoméricamente (Mortimer, 1997). Hemos de tener en cuenta que cada equipo comercial puede usar distintos métodos algebraicos para llevar a cabo el proceso de “*smoothing*” (Mortimer, 1997), suponiendo un obstáculo en la comparación de resultados obtenidos por equipos de fabricantes distintos (Mortimer y Swam, 1999a; b).

-Índice de Linealidad (LIN): Es la relación porcentual entre la VSL y la VCL $[(VSL/VCL)*100]$; indica cuan próxima es la trayectoria circular del espermatozoide a una línea recta. Los recorridos circulares presentan un bajo LIN, ya que la trayectoria circular será mucho mayor que el espacio neto ganado; mientras que con trayectorias curvilíneas, con una relativamente baja amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y una dirección de movimiento próxima a una línea recta, el LIN es elevado (Mortimer, 1997).

Índice de Rectitud (STR): Es la relación porcentual entre la VSL y la VAP $[(VSL/VAP)*100]$; nos indica cuan próxima es la trayectoria media a una línea recta. Como en el índice anterior presenta valores bajos en trayectorias curvilíneas alejadas de una línea recta (aunque mayores que el LIN); mientras que serán altos cuando los puntos de la trayectoria media estén separados y presenten una baja ALH (Mortimer, 1997).

Índice de Oscilación (WOB): Es la relación porcentual entre la VAP y el VCL $[(VAP/VCL)*100]$; indica el grado de oscilación de la trayectoria real de la cabeza espermática respecto de la trayectoria media (Blanco, 1998); presenta valores bajos cuando la ALH es elevada, y altos cuando la trayectoria descrita por el espermatozoide es circular y la VCL y la VAP presentan valores similares.

Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide (ALH): Se define como el desplazamiento en μm , efectuado por la cabeza espermática en su trayectoria curvilínea de uno a otro lado de la trayectoria media (Quintero - Moreno, 2003). Es usada como una aproximación para describir el batido flagelar, no tratándose de una amplitud *sensu stricto*, al no medirse la distancia entre el pico de la onda y el punto de inflexión de la curva (Mortimer, 2000). Para realizar el cálculo de la misma, es necesario el trazado previo de la trayectoria media del espermatozoide, para a continuación calcular la distancia entre cada punto de la misma con la real, dicha distancia es definida en literatura anglosajona como “*riser*” (Boyers *et al.*, 1989), siendo la ALH en cada punto el doble del *riser*. En una trayectoria regular la distancia es perpendicular a cada punto de seguimiento de la trayectoria media; esto no se verifica si el recorrido del espermatozoide es muy irregular (como ocurre con los espermatozoides hiperactivados) haciendo que los resultados obtenidos para este parámetro tengan menor exactitud (Mortimer, 1997).

Los resultados de ALH se expresan de dos posibles maneras, en función del sistema CASA que estemos utilizando:

- ALH media: es el promedio del conjunto de valores de ALH calculados en todos los puntos de su trayectoria.
- ALH máxima: Es el máximo valor de ALH en la trayectoria considerada.

Frecuencia de batido (BCF): Es el número de veces que la cabeza del espermatozoide cruza la dirección de movimiento; siendo indicativo de la frecuencia de batido del flagelo. La BCF se expresa en Hz y se calcula contando el número de veces que la trayectoria curvilínea cruza la trayectoria media por segundo. La BCF es útil en la valoración de fuertes cambios en los patrones del movimiento del flagelo (Mortimer, 1997).

Además de los anteriores parámetros existen otros derivados de ellos siendo usados con menor asiduidad (Blanco, 1998; Quintero-Moreno, 2003). Por último, Mortimer y Swan (1999a; b) desarrollaron una nueva serie de parámetros derivados de los básicos, a excepción de la VAP y la ALH, con la intención de hacer más fácil la comparación de resultados entre sistemas distintos, y más adecuados para la valoración de espermatozoides hiperactivados.

2.7.3 Evaluación de la morfología espermática.

Con esta prueba, se pueden detectar problemas desde el momento de la espermiogénesis y problemas en la maduración durante el paso de los espermatozoides a través del epidídimo, esto permite la eliminación de reproductores de baja calidad, al indicar estas anomalías problemas genitales mayores, la correlación de esta prueba con la fertilidad, al igual que en la prueba de movilidad subjetiva, varía mucho dependiendo de la prueba utilizada (Rodríguez-Martínez, 2003b; Tejerina, 2007). Las anomalías que puede presentar un espermatozoide, se pueden clasificar dependiendo la causa de dichas anormalidades (González-Urdiales *et al.* 2006), las cuales se mencionan a continuación:

Primarias. Producidas por algún fallo o deficiencia durante la espermiogénesis, pudiendo ser específicas y no específicas, donde las primeras presentan origen genético y las segundas, son de etiología diversa.

Secundarias. Existe una presencia de espermatozoides con alteraciones en la cola, como cola en látigo, enrolladas o simplemente ausencia de ella, provocadas por alteraciones a nivel del epidídimo.

Terciarias. Se refieren al manejo que se le da al semen durante su proceso en el laboratorio, en el cual si no se hace de manera correcta se pueden ocasionar lesiones de tipo mecánicas, como desprendimiento de cabezas cuando se realizan extensiones de manera errónea, también lesiones físicas y/o químicas, por no controlar adecuadamente la temperatura, presión osmótica, pH y composición del diluyente.

Otra alteración que se puede presentar en la célula espermática, es la llamada gota citoplasmática, que se trata de residuos de la espermatogénesis, que se puede localizar ya sea en la porción que conecta la cabeza con la pieza intermedia, recibiendo esta el nombre de gota citoplasmática proximal, pudiendo también presentarse en la porción de conexión entre la pieza intermedia y la porción principal de la cola, lo que le da el nombre de gota citoplasmática distal, a excepción de esta última, se ha encontrado correlación entre esta anomalía y la fertilidad, ya que con más de un 5% de la presencia de gota citoplasmática proximal reduce la fertilidad, no habiendo correlación en el caso de la gota distal; la presencia de gota citoplasmática, significa que el espermatozoides está inmaduro (Tejerina, 2007) (figura 11).

En la actualidad, existen mecanismos para realizar el estudio de la morfología espermática, con la ayuda de sistemas computarizados, como es el caso de sistemas conocidos con el nombre de automated semen morphology analysis (ASMA), que con ayuda de tinciones nos permiten efectuar un estudio de manera optimizada, pero debido al coste del equipo y el tiempo que se tarda en realizar el estudio, su uso ha sido relegado a la investigación (Casey *et al.*, 1997; Tejerina *et al.*, 2005; García-Herreros *et al.*, 2006). Existen tinciones que permiten realizar la lectura de morfoanomalías en las células espermáticas, dentro de las cuales se encuentran tinciones como azul de metileno o rosa de bengala, las cuales proporcionan una buena coloración en el interior de la

celula, provocando un contraste con el fondo del campo de visión idóneo para la visualización del contorno de la célula, hay también tinciones conocidas como tinciones dobles, cuyo objetivo es visualizar partes específicas del espermatozoide (García-Artiga *et al.*, 1994). El uso de microscopia de contraste de fase, es una herramienta para la realización de esta prueba, así como la utilización de microscopia electrónica de barrido, aunque su uso está enfocado a la investigación (Bonet *et al.*, 2006).

2.7.4 Evaluación de la integridad de la membrana.

Como ya se mencionó, en el proceso de criopreservación, la membrana plasmática es una de las estructuras que sufren más daño, por lo que su valoración es indispensable, la cual se puede realizar desde dos puntos de vista; desde el aspecto funcional y estructural (Holt y Medrano, 1997; Vázquez *et al.*, 1999; Peláez, 2003).

Al ser un punto muy importante existe un amplio abanico de pruebas para su estudio, de esta manera, se puede emplear en el estudio de la integridad de la membrana citoplasmática óptica de contraste diferencial de interferencia o Nomarski, también el uso de microscopia electrónica de barrido o transmisión, a pesar de que estas técnicas aportan información detallada del daño presente en la membrana no se ha encontrado correlación de ellas con la fertilidad, a menos que el daño sea muy severo (Rodríguez-Martínez, 2005); además, de ser pruebas muy lentas, complejas y de coste elevado (Tejerina, 2007).

En cuanto a la integridad estructural de la membrana plasmática se puede realizar una prueba de manera indirecta para determinar el porcentaje de espermatozoides con la membrana dañada, como puede ser la cuantificación de ATP y de algunas enzimas intracelulares, partiendo de la base, de la imposibilidad de mantener las concentraciones de dichas enzimas dentro de rangos fisiológicos si la membrana ha perdido su integridad (Woelders, 1991), a pesar de brindar información sobre la integridad estructural del plasmalema presenta dos inconvenientes, el primero se refiere a la dependencia de las condiciones experimentales utilizadas y a que no es posible distinguir espermatozoides dañados de los espermatozoides con la membrana intacta (Watson, 1990; Woelders, 1991; Peláez, 2003).

Las técnicas más empleadas para la determinación de la integridad de la membrana, son aquellas que emplean la tinción basadas en el hecho de que un espermatozoide con la membrana plasmática intacta mantiene la permeabilidad selectiva lo que impide la entrada del colorante; por lo tanto, la célula se muestra sin tinción; en cambio, si el espermatozoide ha sufrido daño en la membrana, la permeabilidad selectiva se pierde y el colorante es capaz de penetrar a la célula provocando tinción en ella, lo que provoca que dependiendo, si los espermatozoides presentan tinción o no, se les considere vivos o muertos respectivamente (Watson, 1990). Son varias las técnicas de tinción que se emplean como son la eosina/nigrosina, azul tripán, verde rápido/eosina, eosina/azul de anilina o el amarillo de naftol/eritrosina (García-Artiga, *et al.*, 1994; Rodríguez-Martínez, 2005, Tejerina, 2007). Al momento de realizar la clasificación de status del espermatozoide, es decir, si es considerado vivo o muerto se presenta un problema, pues hay presencia de células parcialmente teñidas, Bamba (1988) indicó que la parcial coloración de la célula indica el inicio de la alteración de la membrana que con el paso del tiempo desencadenara en una alteración mayor y por lo tanto pérdida total de la permeabilidad de la membrana, por lo tanto deben considerarse como muertos, en el caso de la evaluación de espermatozoides congelados-descongelados existe otro inconveniente, ya que el glicerol aumenta la permeabilidad de las células que no están dañadas, lo que aumenta el recuento de espermatozoides muertos, que por acción del glicerol han sido dañadas artificialmente (Mixner y Saroff, 1954, citados en Peláez, 2003).

Las técnicas de tinción convencionales, han sido relegadas debido a la aparición de un gran número de fluorocromos, con los que se pueden determinar con mayor objetividad la integridad de la membrana plasmática, clasificándose en los que solo penetran como en el caso de las tinciones convencionales, si la membrana plasmática está dañada, como por ejemplo el ioduro de propidio, Hoechst 33258, homodimero de etidio y YoPro-1, que al entrar a la célula se unen específicamente al ADN (Rodríguez-Martínez, 2005; Silva y Gadella, 2006), y los que penetran al interior de la célula sin que esta tenga comprometida su integridad, como por ejemplo el diacetato de fluoresceína y sus derivados (Gillan *et al.*, 2005), estos fluorocromos una vez dentro de la célula son desacetiladas por esterasas intracelulares impidiendo así su retorno al medio externo, dentro de este grupo se encuentra SYBR-14, pero este penetra a la célula siempre y cuando estén en funcionamiento las bombas de iones de la membrana, y una vez dentro se une al ADN (Garner *et al.*, 1994). Esta característica, permite que la determinación de la población de espermatozoides vivos y muertos, se pueda realizar utilizando dos fluorocromos que tienen capacidades distintas de

penetración de la membrana plasmática, así como la utilización de otros fluorocromos que evalúan el estado del acrosoma (Garner *et al.*, 1986; Garner y Johnson, 1995; Januskauskas y Rodríguez-Martínez, 1995; Januskauskas *et al.*, 1999; Juonala *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2000; Nagy *et al.*, 2003; etc).

La determinación de las poblaciones de espermatozoides vivos y muertos, utilizando las técnicas antes mencionadas, se pueden realizar con microscopio de epifluorescente con los filtros adecuados para cada fluorocromo (Althouse y Hopkins, 1995); solo que el inconveniente es el número elevado de espermatozoides que hay que contar para obtener pequeños errores estándar, lo que ha contribuido a la incorporación de la citometría de flujo como herramienta para la evaluación de la integridad de la membrana, con la ayuda de la citometría se puede hacer un conteo de 10, 000 células en menos de 1 minuto, pudiendo de esta manera realizar una evaluación de las técnicas de fluorescencia empleadas; además, de tener la posibilidad de analizar diversos parámetros de forma simultánea, lo que se refleja en un aumento en la correlación de sus resultados con la fertilidad ya sea *in vivo* o *in vitro* (Maxwell *et al.*, 1998; Ericsson *et al.*, 1993; Januskauskas *et al.*, 2001; Guillan *et al.*, 2005; Silva y Gadella, 2006).

Para la evaluación de la integridad de la membrana plasmática desde el punto de vista funcional, se emplean técnicas que someten a los espermatozoides a un medio hipoosmótico, partiendo de la idea de que la célula realizara un intercambio de líquido para ajustar la presiones osmóticas en ambos lados del plasmalema, esto se realizará siempre y cuando la membrana cuente con sus mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente (Quintero-Moreno, 2003; Tejerina, 2007).

Test de resistencia osmótica (*Osmotic resistance test*, ORT), que utiliza esta propiedad de la membrana de reaccionar ante un medio hipoosmótico, en esta prueba se analizan las lesiones estructurales evidentes, tras la incubación que se producen a nivel del acrosoma, por lo tanto se considera que aquellos espermatozoides que han podido resistir el shock osmótico se catalogan como funcionales (Schilling *et al.*, 1984;1986; Pérez-Llano *et al.*, 1998a; Gil *et al.*, 2000). La habilidad de conservación de un eyaculado y la capacidad fecundante han sido estimadas con esta prueba (Schilling *et al.*, 1984; Schilling y Vengust, 1985; Schilling *et al.*, 1986; Tejerina, 2007).

Otra prueba que se utiliza para valorar la funcionalidad de la membrana plasmática, es el llamado test de endósmosis (*hyposmotic swelling test*, HOST), en el caso de la especie porcina, la prueba ha sufrido modificaciones desde su adaptación (Vázquez *et al.*, 1997; Pérez-Llano *et al.*, 1998b). En esta prueba, se valora la presencia de hinchamiento y enrollamiento del flagelo cuando la integridad de la membrana no ha sido comprometida debido a la acumulación de agua en esa zona, dicho hinchamiento y enrollamiento no ocurre cuando la membrana se encuentra dañada ya sea físicamente o funcionalmente, al igual que la prueba anteriormente mencionada, se emplea un medio hipoosmótico para analizar la respuesta de la célula a este medio, realizando comparaciones de esta técnica con los resultados obtenidos en las pruebas de integridad de la estructura del plasmalema no se encuentra coincidencia entre ellas, aunque sí existe correlación en mayor o menor grado, esto se explica según Jeyendran *et al.* (1984), quienes indicaron que las dos pruebas evalúan aspectos distintos, pudiendo ocurrir que una membrana estructuralmente no dañada, no pueda ser capaz de responder al estrés osmótico al que se le somete en esta prueba, indicando de esta manera la pérdida de su actividad funcional (Jeyendran *et al.*, 1984; Rodríguez-Gil *et al.*, 1994; Vázquez *et al.*, 1997; Pratap *et al.*, 2000).

2.7.5 Evaluación de la integridad del acrosoma.

El acrosoma, contiene gran cantidad de enzimas; la hialuronidasa y acrosina, son las dos enzimas indispensables para poder llevar a cabo la penetración del ovocito y por la tanto realizar la fecundación, por lo que su integridad se hace indispensable (Woelders, 1991). Existe una gran variedad de pruebas para evaluar su estado a través de la valoración de la morfología de los espermatozoides, como la observación con microscopio electrónico, pero igual que en las pruebas anteriores la técnica resulta compleja y lenta, además de necesitar saber el status de la membrana plasmática a priori para poder realizar la interpretación de manera correcta o si se trabaja con espermatozoides capacitados quienes pueden mostrar una mayor sensibilidad al proceso de fijación, lo que falsea los resultados (Yanagimachi, 1994, Peláez, 2003).

Existen mecanismos de valoración más sencillos, como por ejemplo, el empleo de microscopía de contraste de fases (Pursel y Johnson, 1974; Woelders, 1990) y la microscopía de contraste diferencial de interferencia (Aalseth y Saacke, 1986; Peláez, 2003).

Como en el caso de las técnicas tintoriales utilizadas en la evaluación de la integridad de la membrana plasmática han sido desplazadas por el uso de tinciones que incorporan fluorocromos, lo mismo pasa en el caso de la evaluación de la integridad del acrosoma, donde para realizar el marcaje fluorescente principalmente se utilizan lectinas vegetales combinadas con un fluorocromo, que proporcionan más intensidad y contraste entre el acrosoma y el resto de las estructuras del espermatozoide, el procedimiento clásico utilizado en el hombre fue adaptado para la especie porcina, entre otras, como la equina (Casey *et al.*, 1993), bovina (Cross y Watson 1994) y ovina (Valcárcel *et al.*, 1997).

En un principio fue utilizada la aglutinina de *Pisum sativum* (PSA) (Graham, 2001), en el caso de esta aglutinina solo se aprecia la coloración del acrosoma si este presenta la integridad de la membrana dañada, debido a su capacidad de unión con residuos de α -manosa y α -galactosa de la matriz acrosomal (Farlin *et al.*, 1992; Flesch *et al.*, 1998; Guillan *et al.*, 2005), además de la PSA que se ha utilizado en combinación con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como marcador acrosómico (FITC-PSA), combinaciones también con yoduro de propidio o conjugada con Hoechst 33258 (Way *et al.*, 1995; Sukardi *et al.*, 1997; Cox *et al.*, 1998), se ha utilizado las aglutininas de *Arachis hypogea* (PNA) y de *Triticum vulgare* (WGA), así como la concanavalina A (ConA). En el caso de PNA que se ha utilizado también en conjunción con FITC, presenta una ventaja sobre el PSA, ya que cuenta con menos puntos de unión no específicos en otras áreas del espermatozoide, e igual que el PSA solo habrá coloración si la membrana del acrosoma está dañada, además se cuenta con la posibilidad de apoyar estas técnicas con citometría de flujo (Tejerina, 2007). Es una práctica común conjugar la utilización de un fluorocromo de integridad de membrana y una lectina indicadora de integridad del acrosoma, de esta manera se puede evaluar estos dos parámetros a la vez (Graham, 2001; Peláez, 2003).

Otro método para poder evaluar la integridad del acrosoma, se refiere a la valoración de la capacidad de reacción acrosómica (RA) ante estímulos externos, esta prueba parece más informativa (Colenbrander *et al.*, 2003), pues se reportan correlaciones significativas ($r = 0,60$), entre el grado de inducibilidad de la RA y la fertilidad de las muestras (Rodríguez-Martínez, 2005). *In vitro* se han utilizado como agentes inductores de la RA, zonas pelúcidas (ZP) homologas, ZP solubilizada, proteínas de ZP, ionóforos de calcio como el Hoechst A23187, entre otros (Berger *et al.*, 1989b; Mattioli *et al.*, 1996; Harkema *et al.*, 1998; Rodríguez-Martínez, 2003b; 2005, Tejerina,

2007). También se ha empleado en la valoración de la integridad del acrosoma el uso de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos mono y policlonales, combinados con colorantes fluorescentes, siendo específicos de proteínas de la membrana acrosomal como la CD46 o de la matriz acrosomal (González-Urdiales *et al.*, 2006; Tejerina, 2007).

2. Material y Métodos

3.1 PRODUCTOS Y SOLUCIONES.

Tabla 5. Reactivos.

EMPRESA	PRODUCTO	REF. CAT.
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steingeim, Alemania.	Albúmina sérica bovina (BSA)	C8166
	Carboxifluoresceína	C-0750
	DMSO	L8783
	Glutaraldehido 25%	L7381
	Lactosa monohidratada	D5879
	Análogo de vitamina E	93510-50MG
	Glutación Reducido	G6013-5G
	PBS	H3375
	Ioduro de propidio	P3911
	Formaldehido	F1635
	Bicarbonato Sódico	S5761
	Citrato Sódico	131655
	Suero Salino Fisiológico	346821
	Ácido tricloracetico	T9159
Ácido tiobarbiturico	T5500	
Kubus S.A. Majadahonda. España.	Diluyente seminal MR-A	
Acofarma S.A., Tarrasa, España.	Glucosa anhidra	14732
	Glicerol	14691
Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania.	Dodecil-sulfato sódico	13560/0008

A continuación se detallan las diferentes soluciones y medios preparados. Los equipos utilizados en cada prueba se señalan individualmente al hacer la descripción pormenorizada de cada analítica concreta.

El pesaje de todos los reactivos utilizados para la preparación de las soluciones se realiza en una balanza de precisión AB204-S (Mettler-Toledo, Nueva York, EEUU), en el proceso de dilución se emplea un agitador magnético Basicmagnix (Lovango S.L., Barcelona, España), el agua de las soluciones la proporciona un dispensador Milli-Q Synthesis A10 (Millipore Corporation, Bedford, EEUU).

Tabla 6. Diluyente de Refrigeración.

Producto	Cantidad
Lactosa Monohidratada	11,0 % p/v
Yema de huevo	20,0 % v/v
Agua MilliQ	C.S.

Se almacena a 15°C hasta el momento de su utilización.

Tabla 7. Diluyente de Congelación.

Producto	Cantidad
Diluyente de refrigeración	89,55 % v/v
Glicerol	8,95 % v/v
Dodecil-sulfato sódico	1,50 % v/v

Se almacena a 5°C hasta el momento de su utilización

Tabla 8. Solución stock de Glutaraldehído al 2%.

Producto	Cantidad
Preparar una solución inicial con:	
Citrato sódico	1,0 % p/v
Glucosa anhidra	2,9 % p/v
Bicarbonato sódico	0,2 % p/v
Agua Milli Q	100 ml
De la solución anterior se toman 92 ml y se les adicionan:	
Glutaraldehído al 25%	8 ml

Se almacena a 4°C hasta el momento de su utilización

Tabla 9. Solución Formolada

Producto	Cantidad
Formaldehído al 35% v/v	0.857% v/v
Suero Salino Fisiológico	C.S.

Se almacena a 4°C hasta el momento de su utilización

Tabla 10. Solución stock de Ioduro de Propidio.

Producto	Cantidad
Ioduro de Propidio	0,5 mg/ml
Suero Salino Fisiológico	C.S.

Se prepararan alícuotas de 1 ml que se almacenan a -20°C

Tabla 11. Solución Stock de Acetato de Carboxifluoresceína.

Producto	Cantidad
Carboxifluoresceína	0,46 mg/ml
DMSO	C.S

Se almacena a 5°C hasta el momento de su utilización

Tabla 12. Ácido Tricloracetico al 20%.

Producto	Cantidad
Ácido tricloracetico	1.4 gr
Agua MilliQ	7 ml

Se mantiene a 5°C hasta el momento de su utilización

Tabla 13. Ácido Tiobarbiturico 0.67%.

Producto	Cantidad
Ácido Tiobarbiturico	46.9 mg
Agua MilliQ	7 ml

Se prepara el mismo día de su utilización

3.2 ANIMALES EMPLEADOS.

El semen se obtuvo de 10 verracos de fertilidad comprobada de raza Large White, con una edad de 22-24 meses, los cuales pertenecen al Centro Tecnológico de IA porcina CENTROTEC ubicado en Campo de Villavidel (León), que cuenta con un lote de 120 machos, los verracos utilizados permanecen en corralinas de 2.5 x 2.5 metros y sometidos a un fotoperiodo constante de 12 horas de luz, la temperatura de la nave oscila entre 18-22°C durante todo el año.

Los verracos son alimentados con pienso C7[®] suministrado por la empresa UVESA, formulado especialmente para cerdos, tratando de mantener una condición corporal de 2.5 en una escala de 1 a 5. Dicha cantidad de alimento es supervisada cada 15 días con la finalidad de mantener la condición corporal, y no entorpecer el proceso de extracción del semen por sobrepeso o desnutrición; el agua se administra *ad libitum*, y el promedio de eyaculaciones es de 1 vez por semana.

Tabla 14. Verracos utilizados.

No. Identificación	RAZA	EDAD/ MESES
T475	Large White	22
W3048	Large White	24
H2449	Large White	22
W3267	LargeWhite	23
I9360	Large White	24
W2622	Large White	24
I9761	Large White	22
W5070	Large White	24
H0915	LargeWhite	22
G9282	LargeWhite	22

Tabla 15. Composición del pienso C-7[®] (Uvesa).

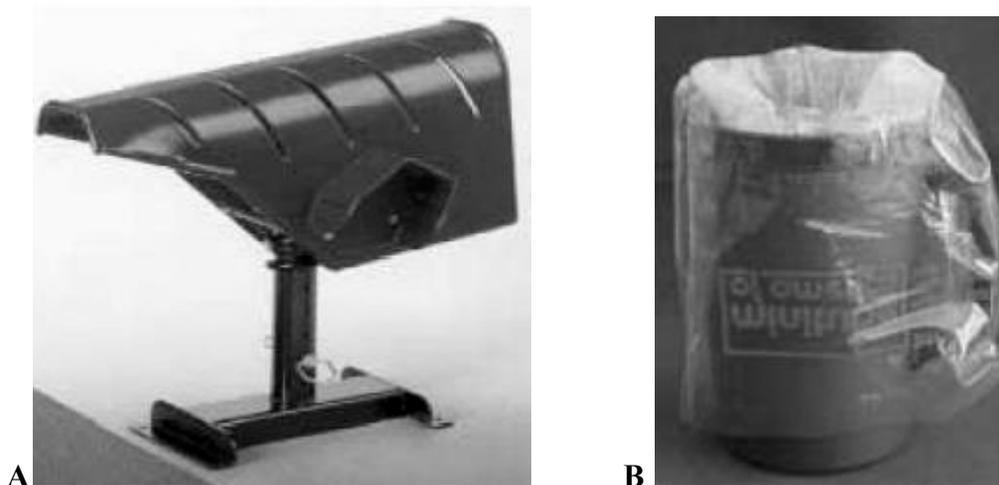
Constituyentes Analíticos	
Proteína Bruta	14,89%
Materias Grasas Brutas	2,51%
Celulosa Bruta	5,36%
Cenizas Brutas	5,14%
Aditivos	
Vitamina A	15,000 U.I.
Vitamina D	2,500 U.I.
Vitamina E	70 mg/Kg
Cobre	10 mg/Kg
Cebada	59,27%
Harina de extracción de soja tostada y decortada (apartir de soja) modificada genéticamente	10,40%
Trigo	17,51%
Harina de extracción de semilla de girasol	1,14%
Manteca	0,37%
Sal	0.46%

3.3 RECOLECCIÓN DEL SEMEN.

Para lo obtención del semen se utiliza la técnica de mano enguantada (Hancock y Hovell, 1959), la eyaculación se realiza con la ayuda de un potro fijo (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), previamente a la extracción del semen se vacía el liquido contenido en la cavidad prepucial y se desinfecta el área con una solución de amonio cuaternario limpiándola con toallas de papel desechables; del semen sólo se recoge la fracción rica en espermatozoides en un termo previamente atemperado a 37°C en una estufa Function Line (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania), y que contiene una bolsa de plástico (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), con capacidad para 3.5 L. a la que previamente se le depositan 100 ml de diluyente comercial, MR-A[®] (Kubus S.A., Majadahonda, Madrid), la bolsa cuenta con un filtro para poder retener la fracción gelatinosa procedente de las glándulas bulbouretrales, dicho filtro una vez finalizaba la extracción

del semen se desprende de la bolsa y se desecha, justo antes de entregar la bolsa con el eyaculado al laboratorio se marca con el número de verraco y el nombre de la persona que realiza la extracción del semen.

Figura 10. (A) Maniquí para extracción de semen. (B) Termo para la recolección de semen.



3.4 VALORACIÓN CONVENCIONAL DEL SEMEN.

Una vez obtenido el semen se transporta al laboratorio para evaluar el volumen de manera indirecta a través del pesaje de la bolsa utilizando una balanza BL-6 (Sartorius AG, Goettingen, Alemania), la concentración se determina con la utilización de un fotómetro SDM-5 (Minitüb, Tiefenbach, Alemania). De cada eyaculado se cogen 60µl y se colocan en una cubeta plástica (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), cargada previamente con 3ml de diluyente MR-A[®], posteriormente se introduce la cubeta plástica al fotómetro para realizar la lectura de la concentración espermática.

La información del pasaje de la bolsa con el eyaculado y también la información determinada por el fotómetro se introducen al ordenador el cual cuenta con un programa que procesa dicha información IDEE (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), el programa tiene en cuenta el volumen inicial añadido de diluyente en la bolsa de recogida y el peso de la bolsa.

A partir de este momento el semen se mantiene a una temperatura de 32.5°C durante el tiempo en que se realizan las demás pruebas de contrastación seminal, para lo cual se coloca la

bolsa dentro de un recipiente situado dentro de un baño termostático Prescidig (J.P. Selecta S.A., Abrera, España).

De cada eyaculado se cogen 60µl junto con un 1ml de diluyente en un tubo eppendorf. De esta dilución se valora la movilidad y calidad de movimiento, de forma subjetiva a través de la observación con un microscopio Eclipse E-400 (Nikon, Tochigi, Japón), con un objetivo de contraste de fase positivo de 20X y un ocular de 10X, equipado con una platina calefactada a 39°C; previamente a la observación y mediante una pipeta Pasteur se coloca una gota sobre un portaobjetos (76 mm x 26 mm), encima de la cual se coloca un cubreobjetos (20 mm x 20 mm), (método gota plana), previamente atemperados a 39°C utilizando una platina HT-200 (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), el porcentaje de la movilidad se expresa en múltiplos de 5 y la calidad de movimiento según la escala propuesta por Martin-Rillo *et al.*, (1996), que se basa en la actividad de la función flagelar espermática, valorada de manera subjetiva:

- 0: espermatozoides inmóviles o muertos.
- 1: espermatozoides sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismos.
- 2: células espermáticas con movimientos anormales o eventualmente progresivos.
- 3: espermatozoides con movimiento progresivo lento y sinuoso.
- 4: espermatozoides con movimiento progresivo rápido.
- 5: espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido.

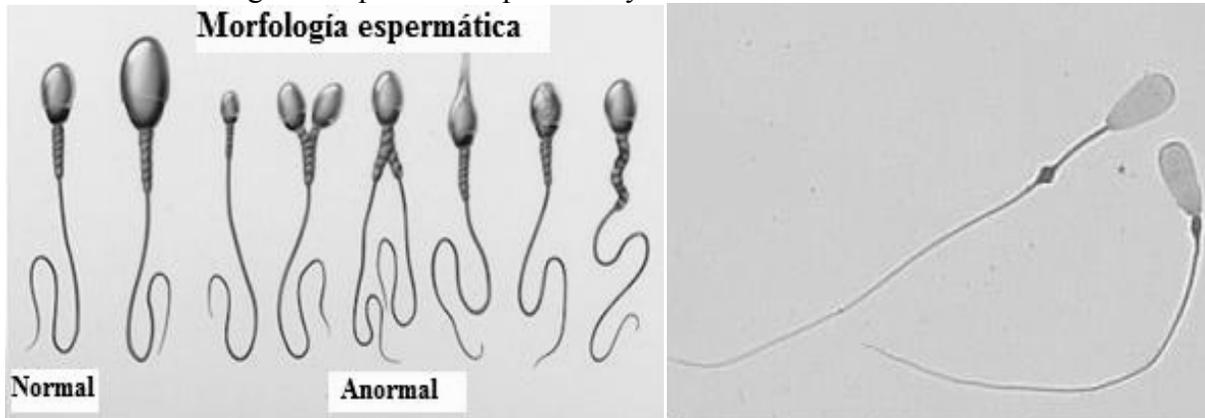
Al mismo tubo eppendorf que se utiliza para la valoración de la movilidad se le agregan 10µl de una solución de Glutaraldehído al 2% (Tabla 8), una vez fijada la muestra se coloca una gota utilizando una pipeta Pasteur entre un portaobjetos y un cubreobjetos de las mismas características utilizado en la valoración de la movilidad. La observación se realiza con la ayuda de un microscopio Eclipse E-400 con un objetivo de 400X y contraste de fases positivo, se cuentan un total de 400 espermatozoides y la clasificación que se utiliza es la siguiente (González-Urdiales, 2006; Tejerina, 2007):

- Espermatozoides morfológicamente normales.
- Espermatozoides con gota citoplasmática proximal.
- Espermatozoides con gota citoplasmática distal.

- Espermatozoides con anomalías en la cola.
- Espermatozoides con anomalías en la cabeza.

Sólo se utilizan muestras que contienen un mínimo de 80% de formas normales tras su valoración.

Figura 11. Anormalidades en el espermatozoide de verraco. Izquierda: anomalías presentes en la cabeza. Derecha: gota citoplasmática proximal y distal.



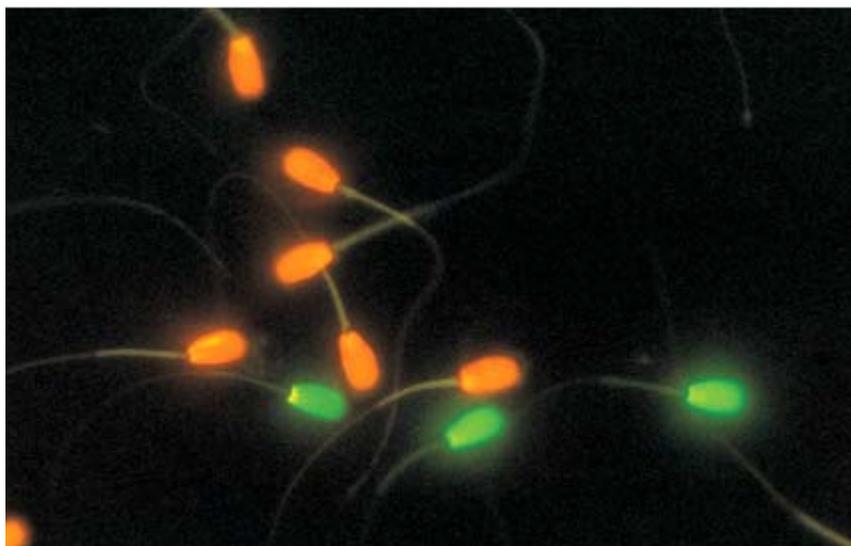
3. 5 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA (vitalidad).

Se lleva a cabo mediante la técnica descrita por Harrison y Vickers (1990). En un tubo eppendorf se colocan 10µl de una solución stock de yoduro de propidio (tabla 10), 10µl de una solución stock de acetato de carboxifluoresceína (tabla 11), y 5µl de una solución formolada al 0.3% (tabla 9), posteriormente esta preparación se incuba en un baño termostático durante 8 minutos a una temperatura de 37°C, para su observación se utiliza un microscopio Eclipse E-400 (Nikon, Tochigi, Japón) con un aumento de 400X con los filtros B-2A [filtro de excitación (paso de banda): 450-490 nm; filtro de cierre (paso largo): 515 nm] y G-2A [filtro de excitación (paso de banda): 510-560 nm; filtro de cierre (paso largo): 590 nm]. Se colocan dos gotas sobre un portaobjetos cubierto por un cubreobjetos, se cuentan 400 espermatozoides por gota.

Los espermatozoides se clasifican como “muertos” aquellos que presentan una coloración roja, provocada por el yoduro de propidio que solo penetra al interior de la membrana si esta se encuentra dañada, aquellos que presentan una coloración verde provocada por la

carboxifluoresceína se les considera como “vivos” al tener la membrana íntegra, el resultado se expreso en porcentaje de células vivas en la muestra.

Figura 12. Valoración de la integridad de membrana. Células en rojo (muertos), células en verde (vivos)



3. 6 VALORACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL ACROSOMA.

Se realiza por la técnica de Suzuki *et al.*, (2003). Para esta prueba se prepara en un tubo eppendorf 500µl de semen a una concentración de 50×10^6 y 5µl de una solución de formaldehido al 0.3% (tabla 9), a través de una pipeta Pasteur se colocan dos gotas entre un portaobjetos y un cubreobjetos, para la observación se utiliza un microscopio Eclipse E-400 (Nikon, Tochigi, Japón), a 400X y contraste de fase positivo, se cuentan 400 espermatozoides en cada una de las gotas de la preparación y se valora la apariencia del acrosoma, es decir, si el acrosoma se presenta alterado. Para que una celula se considerara con el acrosoma íntegro este debía encontrarse bien definido y sin ningún tipo de alteración. Los resultados se expresaron como porcentaje de las células con el acrosoma íntegro.

Figura 13. Valoración de la integridad del acrosoma. Izquierda: espermatozoide con el acrosoma dañado. Derecha: espermatozoide con el acrosoma íntegro.

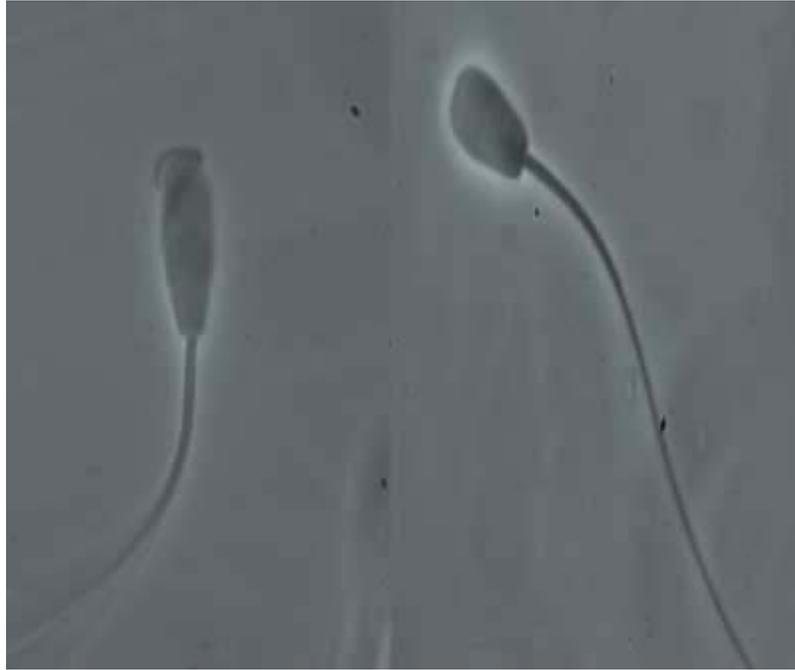
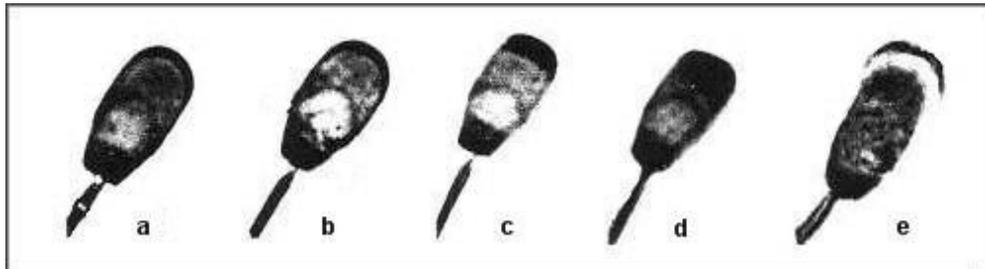


Figura 14. Imágenes bajo contraste de fases de diferentes estados de la vesícula acrosómica, en función de su morfología: a: Borde apical normal (NAR); b: Borde apical normal con partículas; c: Borde apical dañado; d: Borde apical perdiéndose; e: Acrosoma perdido. (Pursel *et al.*, 1972)



3. 7 PRUEBA DE RESISTENCIA OSMÓTICA (ORT).

Se toman 100µl del eyaculado y se añaden a un tubo eppendorf que contiene 1 ml de agua ultra pura MilliQ con una osmolaridad de 100mOms, de igual forma se añaden 100µl del eyaculado en un tubo eppendorf con 1 ml de agua MilliQ con osmolaridad de 300mOms, ambos tubos se incuban en un baño termostático a 37°C, a los 15 minutos de haber iniciado la incubación se retira del baño la preparación de 100mOms para su valoración, se colocan dos gotas entre un cubreobjetos

y se cuentan 400 espermatozoides por cada gota, la preparación con 300mOms se deja incubar 45 minutos más, una vez terminado el tiempo se retira del baño termostático y se procede a la valoración, previamente se añadió una gota de una solución formolada al 0.3% (Tabla 9), siguiendo el mismo procedimiento empleado con la preparación incubada 15 minutos (Schilling *et al.*, 1984).

Los resultados de esta prueba se expresan como el promedio de células con el acrosoma dañado a una osmolaridad de 100mOms y 300mOms.

3. 8 VALORACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE LA MEMBRANA.

Se emplea la técnica descrita por Esterbauer y Cheeseman (1990). Para medir la PL se utiliza el método de cuantificación de Malondialdehido (MDA), a través de sustancias reactivas del ácido Tiobarbiturico (TBARS). Previo a realizar la medición de la peroxidación se prepara una solución de ácido tricloroacético al 20% (Tabla 12), la cual se almacena a 5°C hasta el día de su utilización, el mismo día de la valoración se prepara una solución de ácido Tiobarbiturico (TBA) al 0.67% (tabla 13), las dos soluciones se preparan con agua ultra pura MilliQ.

Ya en el laboratorio donde se realiza la cuantificación de MDA, se mezcla 1 ml de la solución de TCA que se mantiene a 5°C con 1 ml de semen a una concentración de 250×10^6 y se centrifuga a 1500 g durante 10 minutos, posteriormente se recupera el sobrenadante el cual se mezcla con 1.5 ml de TBA en un tubo de cristal bien tapado (Pyrex, Staffordshire, Reino Unido), se incuban en un baño maría por 10 min a 100°C, tras dejar enfriar a temperatura ambiente, la concentración de MDA se determina por espectrofotometría a 534 nm (UNICAM PU 8610 Kinetics Spectrophotometer, PHILIPS; Cambridge, Reino Unido), se realizan dos mediciones por cada muestra. Los resultados se expresan en $\text{mmol}/10^6$ millones de espermatozoides presentes en la muestra.

3.9 PREPARACIÓN DE DOSIS SEMINALES REFRIGERADAS.

Ya en el laboratorio y después de haber realizado la batería de pruebas convencionales y de haber ingresados los datos obtenidos en dichas pruebas en el ordenador que cuenta con el programa IDEE, se hace el cálculo de cuanto diluyente hay que añadir al semen para alcanzar en una concentración final en cada dosis de 33×10^6 espermatozoides/ml, así pues se realiza la dilución del semen con el diluyente comercial MR-A[®] preparado el mismo día y mantenido a 29°C en un tanque de almacenamiento (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), la dilución del semen se realiza en la misma bolsa utilizada para la recogida del semen.

Una vez hechos los cálculos de concentración se coloca el semen dentro de la cámara de vacío de la envasadora minitub (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania) de esta manera automáticamente se depositan 90 ml del semen en cada envase, la misma máquina los cierra y etiqueta con el número de verraco, la fecha de elaboración y la fecha de caducidad de la dosis.

Una vez finalizada la elaboración de las dosis comerciales estas se mantienen a temperatura de laboratorio (20-22°C) durante 120 min, después se procede a su almacenamiento en una cámara frigorífica a 15°C, hasta el momento de su comercialización o en el caso de este trabajo hasta el momento de la realización de las pruebas.

3.10 CRIOPRESERVACIÓN SEMINAL (CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN).

El criterio de selección de los eyaculados que se procedería a congelar depende de los resultados de las pruebas de movilidad total subjetiva ($\geq 80\%$), la calidad del movimiento (≥ 3), así como de la cantidad de formas normales la cual debía ser por lo menos de 80% y del porcentaje de acrosomas intactos de al menos 95%.

Se emplea la técnica de congelación descrita por Bwanga *et al.* (1990), basada en el protocolo de Westendorf *et al.* (1975), con unas ligeras modificaciones. Se realizan los cálculos para obtener la cantidad de semen necesaria para contar con 12000×10^6 espermatozoides móviles, así pues se diluye 1:2 con diluyente MR-A[®] previamente atemperado a 32.5°C teniendo en cuenta el volumen de diluyente presente al momento de la eyaculación. La dilución permanece a temperatura de laboratorio (20-22°C), durante 1 hora, terminado este tiempo se lleva el semen a una

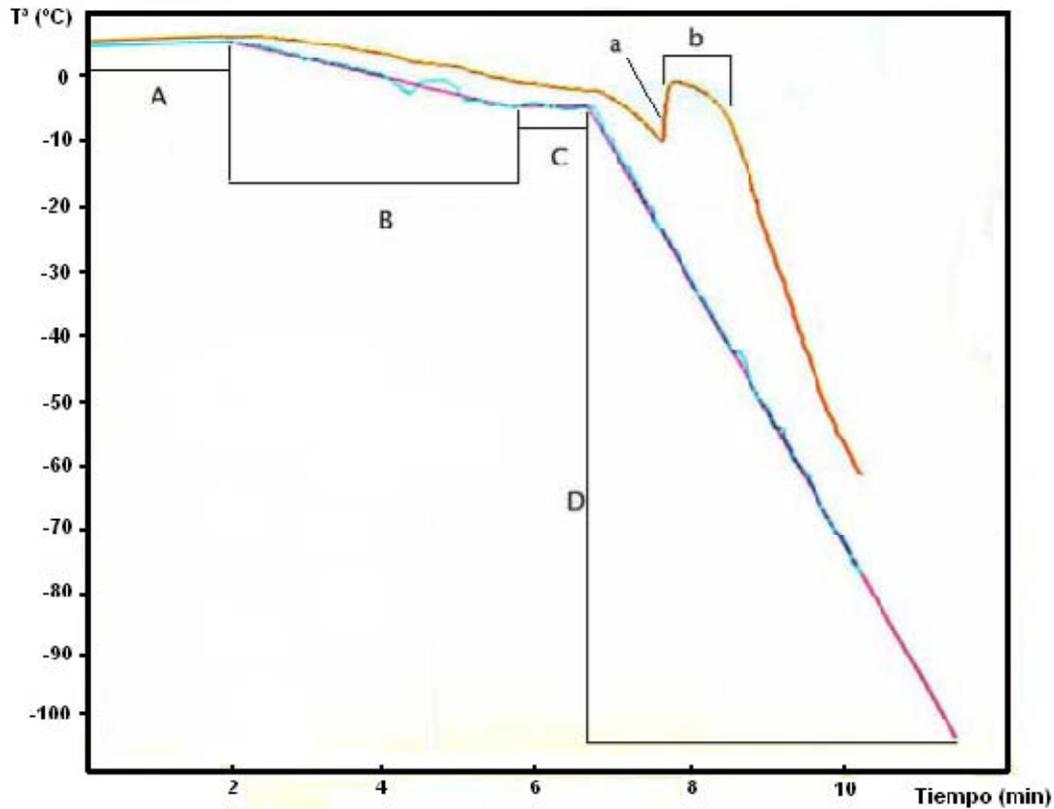
cámara de frío donde permanece por 3 horas, tras esta incubación la dilución se reparte en partes iguales en tubos de centrifuga de 50 ml, dichos tubos se mantienen a la misma temperatura que el semen, así pues se somete a los tubos a una centrifugación en una cintrifuga Heraeus Megafuge 1.0 (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Alemania), durante 10 minutos a 800 g y a una temperatura de 15°C, terminada la centrifugación se desecha el sobrenadante y el pellet es diluido con el diluyente de refrigeración (tabla 2) que se prepara el mismo día de la congelación y se mantiene en la cámara de 15°C hasta el momento de su utilización, la cantidad de diluyente que se añade es la suficiente para alcanzar una concentración de 1500×10^6 espermatozoides/ml, esta disolución se somete a una homogenización, una vez realizada se introduce dicha disolución a una cámara a 5°C.

La suspensión se mantiene a 5°C durante 2 horas, al finalizar esta incubación se diluye nuevamente el semen, en este caso con diluyente de congelación, la concentración final después de dicha disolución es de 1000×10^6 espermatozoides/ml y la concentración final de glicerol es del 3%, terminada la dilución se procede rápidamente a su envasado mediante un quipo automático MPP 133 (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), en pajuelas de 0.25 ml, las cuales son identificadas mediante una impresora Easy Coder (Minitüb GmbH, Tiefenbach, Alemania), con el numero de macho, el grupo específico de cada experimento y el día de la congelación.

Una vez terminado el envasado se trasladan las pajuelas a un biocongelador Ice Cube 1810 (Sy-Lab, Purkersdorf, Austria) el cual se estabiliza a 5°C, se aplica un programa trifásico de enfriamiento a 3 °C/min desde 5 °C hasta -6°C, mantenimiento a -6 °C durante 1 minuto y bajada de temperatura a razón de 20 °C/min desde -6 °C hasta -100 °C (figura 15), una vez alcanzada esta temperatura se retiran las pajuelas del biocongelador para sumergirse inmediatamente en nitrógeno líquido a -196°C.

Las pajuelas se conservan al menos durante una semana antes de proceder a su descongelación, la cual se realiza sumergiendo las pajuelas en un baño termostático a 50°C durante 12 segundos (Bwanga *et al.*, 1990), se diluye el contenido de las pajuelas descongeladas con diluyente comercial MR-A Thaw® (Kubus S.A., Majadahonda, España) a 20 °C de acuerdo con las instrucciones del fabricante, la concentración final fue de 50×10^6 espermatozoides /ml.

Figura 15. Régimen de enfriamiento utilizado en la congelación del semen. La línea morada indica la temperatura prefijada de la cámara de congelación (A: Meseta de estabilización de la temperatura de la cámara a 5 °C; B: Descenso de temperatura a -3 °C/min. desde 5 °C a -6 °C; C: Meseta térmica a -6 °C durante 1 min; D: Descenso de temperatura a -20 °C/min desde -6 °C hasta -100 °C). La línea azul indica la temperatura real de la cámara de congelación. La línea roja representa la temperatura en el interior de una pajuela de congelación, donde podemos observar el rebote térmico producido por la disipación del calor latente de fusión (a) y la meseta del punto de congelación (b). (González -Urdiales, 2010)



3.11 TEST DE TERMORRESISTENCIA.

La realización de un test sometiendo a los espermatozoides a un estrés térmico fue diseñada para analizar la capacidad de supervivencia de los espermatozoides durante su viaje a través del tracto reproductivo femenino (King y MacPherson, 1967; Fiser *et al.*, 1991) y, de esta forma, intentar acercarse a una predicción más fiable sobre su capacidad fecundante. Dicha técnica ha sido utilizada por varios autores (Kozumplík y Sosnová, 1985; Kozumplík y Roubal, 1990; Tardif *et al.*, 1999; González-Urdiales, 2010), tanto en semen fresco como en criopreservado, como paso previo a la valoración de los parámetros convencionales del semen, como movilidad total, movilidad progresiva e integridad de la membrana, integridad del acrosoma.

Fiser *et al.* (1991) determinaron que la realización de un test de termorresistencia al semen descongelado de porcino revela leves daños en las membranas de los espermatozoides, producidos durante en el proceso de la congelación, y que solamente se hacen evidentes después del periodo de incubación.

Por lo tanto se procede a descongelar tres pajuelas de cada grupo a estudiar en este trabajo, se realiza una dilución como se hace para el estudio de la movilidad, vitalidad e integridad del acrosoma descritas en la sección de material y métodos correspondiente a cada analítica. Una vez hecha la descongelación y la dilución, las muestras se mantienen en un baño termostático a 37°C por un tiempo total de 4 horas.

De la dilución inicial se cogen en un tubo eppendorf 500µl para realizar las valoraciones seminales, el equipo que se emplea es el mismo descrito para las mismas pruebas señaladas anteriormente.

Las valoraciones comienzan una vez descongelado el semen que se considera como “hora 0”, realizando pruebas de movilidad, vitalidad y estado del acrosoma cada hora, para realizar dichas pruebas se utilizan los procedimientos descritos anteriormente. Esta prueba solo se realiza para el caso del semen criopreservado.

3.12 METODOLOGÍA PARA LA VALORACIÓN DE LA MOVILIDAD MEDIANTE EL EQUIPO *INTEGRATED SEMEN ANALYSIS SYSTEM*[®] (ISAS[®])

Para realizar las pruebas de movilidad individual se utiliza un programa informático Integrated semen analysis system (ISAS[®]) (Proiser. Valencia, España) (Amann y Katz, 2004, Tejerina, 2007).

Para la realización de esta prueba se utiliza un microscopio Nikon Eclipse E-400, que cuenta con óptica de contraste de fase negativo, para la captura de las imágenes se emplea un aumento de 200X, en el tercer ojo del microscopio se coloca una cámara de captura discontinua PE2015 (Pulnix, Basingstoke, Reino Unido), con un CCD de 752x582 píxeles, conectada a una tarjeta digitalizadora Meteor-II (Matrox, London, Canada), situada en un ordenador personal en el que se instala el programa ISAS[®].

En un tubo eppendorf se diluye semen a una concentración de 25×10^6 /ml hasta alcanzar 1 ml, el cual se incuba a 36°C durante 6 minutos, una vez terminada la incubación se cogen 4µl de la muestra que son colocados en la cámara de recuento Makler (Sefi Medical, Haifa, Israel), de 10µl de profundidad (figura 16), la cámara está situada sobre una platina calefactada a 39°C, se cuentan un mínimo de 200 espermatozoides por muestra.

Figura 16. Cámara Makler.

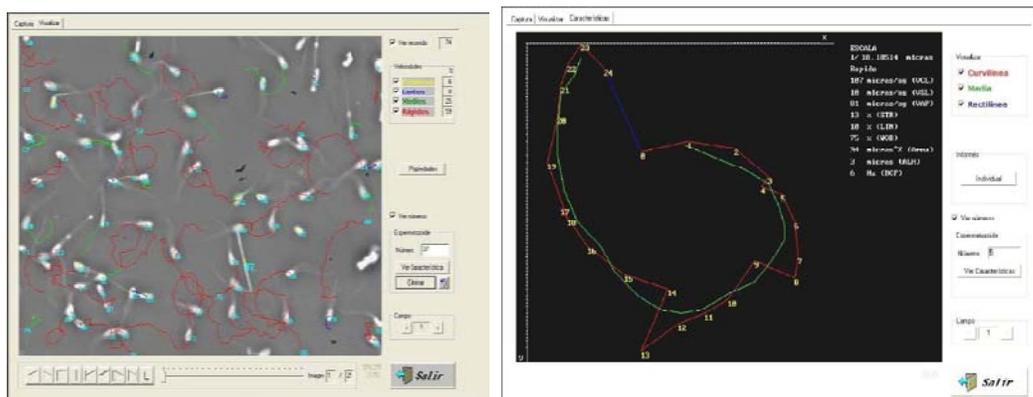


3. Material y Métodos

Los parámetros cinéticos medidos por el programa son los siguientes: (figura 17)

- VCL: Velocidad Circular ($\mu\text{m/s}$).
- VAP: Velocidad Media ($\mu\text{m/s}$).
- VSL: Velocidad Rectilínea ($\mu\text{m/s}$).
- LIN: Índice de Linealidad (%).
- STR: Índice de Rectitud (%).
- WOB: Índice de Oscilación (%).
- ALH: Amplitud media del desplazamiento lateral de la cabeza (μm).
- BCF: Frecuencia de batido (Hz).

Figura 17. Captura del programa CASA. A la izquierda se muestra el aspecto de una pantalla con todas las trayectorias analizadas y a la derecha se representan las trayectorias correspondientes a las tres velocidades calculadas para la trayectoria analizada de un determinado espermatozoide. (González-Urdiales, 2010)



Aparte del análisis de los parámetros cinéticos mencionados, el programa CASA también analizó el porcentaje de movilidad total de cada una de las muestras.

3.13 DISEÑO EXPERIMENTAL

3.13.1 EXPERIMENTO 1. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN REFRIGERADO A 15°C MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol /Glutati3n reducido), Y SU REPERCUSI3N SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

Debido a que la movilidad espermática es una de las principales características que se ven afectadas durante el proceso de conservaci3n, es nuestro objetivo valorar el efecto que tiene sobre este parámetro la adici3n de un análogo del α -tocoferol en una concentraci3n de 200 μ M y de glutati3n reducido a una concentraci3n de 5mM. Para que dicho análisis fuese realizado de manera objetiva se emplea un sistema computarizado (CASA), de esta manera se analizan los diferentes parámetros cinéticos que dicho programa tiene la capacidad de medir (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, WOB y BCF). Se analiza tambi3n en este medio de conservaci3n y en presencia o no de los antioxidantes, la integridad de la membrana y el estado del acrosoma, parámetros de gran importancia en el proceso de fecundaci3n.

Para la realizaci3n de este trabajo se toman muestras seminales de 10 verracos de fecundidad comprobada que se procesan para su refrigeraci3n a 15°C de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 3.9; los eyaculados se dividen en tres grupos, uno de ellos contiene vitamina E (200 μ M), otro contiene GSH (5mM), en el tercer grupo no se adiciona antioxidante y funciona como control. Los controles de calidad seminal se realizan los días 0, 5 y 7 despu3s de la preparaci3n de las dosis seminales, las pruebas se efectúan a los tres grupos en las mismas condiciones.

Los antioxidantes son ańadidos junto con el diluyente utilizado (MR-A) Dicha conservaci3n consiste en mantener el semen diluido en una c3mara frigorífica a 15°C. El experimento tiene como periodo de incubaci3n 7 días; determinamos ese tiempo de incubaci3n teniendo en cuenta que el centro de producci3n (CENTROTEC) marca como fecha de caducidad el quinto día posterior a la preparaci3n de dicha dosis (figura 18).

En cada uno de los días, previamente al análisis de las características espermáticas mencionadas anteriormente, se diluye la dosis seminal en diluyente MR-A, se preparan alícuotas

con una concentración de 25×10^6 /ml de cada uno de los grupos refrigerados y para cada una de las pruebas, esta dilución se realiza en envases eppendorf con capacidad de 1 ml. los cuales son etiquetados con el nombre de cada uno de los tres grupos a analizar, estas alícuotas son incubadas según lo requería cada una de las pruebas, las cuales se realizan de manera simultánea para el caso de las muestras que contenían o no antioxidantes (figura 19).

Cabe mencionar que la elaboración y conservación de las muestras se realiza del mismo modo y en las mismas condiciones en que se elaboran normalmente las dosis seminales.

Como ya se ha mencionado en epígrafes anteriores las características que el espermatozoide de verraco posee en la estructura de su membrana plasmática, le hace altamente sensible a los daños provocados por la acción de los ROS, bajo esta primicia, este trabajo tiene como objetivo valorar la presencia de PL a través de la cuantificación del MDA y se repercusión sobre la calidad espermática la cual es valorada mediante las pruebas mencionadas.

Al ser el MDA un compuesto resultante de la PL se realizan pruebas para determinar su presencia en las dosis seminales refrigeradas. Para realizar dicha cuantificación se emplea la técnica de reacción del Ácido Tiobarbiturico (TBARS) (Sikka, 1996; Carvajal *et al.*, 2004; Roca *et al.*, 2004), mediante la mezcla de sustancias descritas en el apartado 3.8, se consigue que la reacción resultante de la mezcla de TCA con el TBA, produzca un color, que es posible medir a través de espectrofotometría con una longitud de onda de 534 nm (figura 19).

3.13.2 EXPERIMENTO 2. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol / Glutati3n reducido), Y SU REPERCUSI3N SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

Los da3os producidos por los ROS sumados a los causados por la congelaci3n en s3, hacen que la calidad del semen congelado disminuya en un alto porcentaje, por lo que su utilizaci3n no se ha difundido.

Por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar la capacidad de la vitamina E o del GSH, a una concentraci3n de 200 μ M y 5mM respectivamente, de disminuir el da3o provocado por los ROS a los parámetros de calidad espermática como son la movilidad, la integridad de la membrana y acrosoma, que como hemos mencionado en la secci3n de revisi3n bibliográfica son de gran importancia para que se lleve a cabo la fecundaci3n.

Con la ayuda de un programa CASA se evalúa el comportamiento de los parámetros cinéticos de los espermatozoides individualmente y el porcentaje de movilidad total. De igual forma que se realiza en el experimento anterior se valora la presencia de MDA en el semen descongelado, en presencia y ausencia de la vitamina E y del GSH

Por lo tanto se congelaron los eyaculados de 10 verracos, el antioxidante (vitamina E o GSH) se a3ade junto con el diluyente de refrigeraci3n (5°C) con la intenci3n de proteger a los espermatozoides a los distintos cambios de temperatura a partir de este momento. Las pajuelas de 0.25 ml se conservan a -196°C por espacio de 15 d3as antes de su descongelaci3n (figura 20).

Una vez hecha la descongelaci3n a 50°C durante 12 segundos (Bwanga *et al.*, 1990), se prepararon al3cuotas con cada uno de los grupos a analizar, es decir, en presencia y ausencia de vitamina E y/o GSH y de la misma forma se prepara una al3cuota para cada una de las purebas de calidad seminal. Las al3cuotas debidamente etiquetadas se incuban por espacio de 4 horas a 37°C con la finalidad de valorar el comportamiento de los parámetros espermáticos a trav3s del tiempo, se toma como primera valoraci3n (hora 0) la realizada inmediatamente despu3s de haber descongelado el semen, y de esta manera sucesivamente cada 60 min. hasta completar 4 horas, la

concentración espermática en cada una de las valoraciones es de 25×10^6 espermatozoides/ml (figura 21).

Para la valoración de la presencia de MDA se descongelan 2 pajuelas de cada uno de los grupos del experimento, se diluyen en MR-A[®] hasta alcanzar una concentración de 25×10^6 de espermatozoides/ml. Una vez realizada la descongelación de los distintos grupos, se transportaron al Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI-Universidad de León) para su análisis, el cual se efectúa tras realizar la mezcla con los reactivos y la posterior incubación descritos por la técnica, una vez realizada la incubación se mide la presencia de MDA a través de espectrofotometría con una longitud de onda de 534nm (como se describe en el epígrafe 3.8) (figura 22).

Figura 18. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas desde la recogida del eyaculado hasta la refrigeración del semen a 15°C.

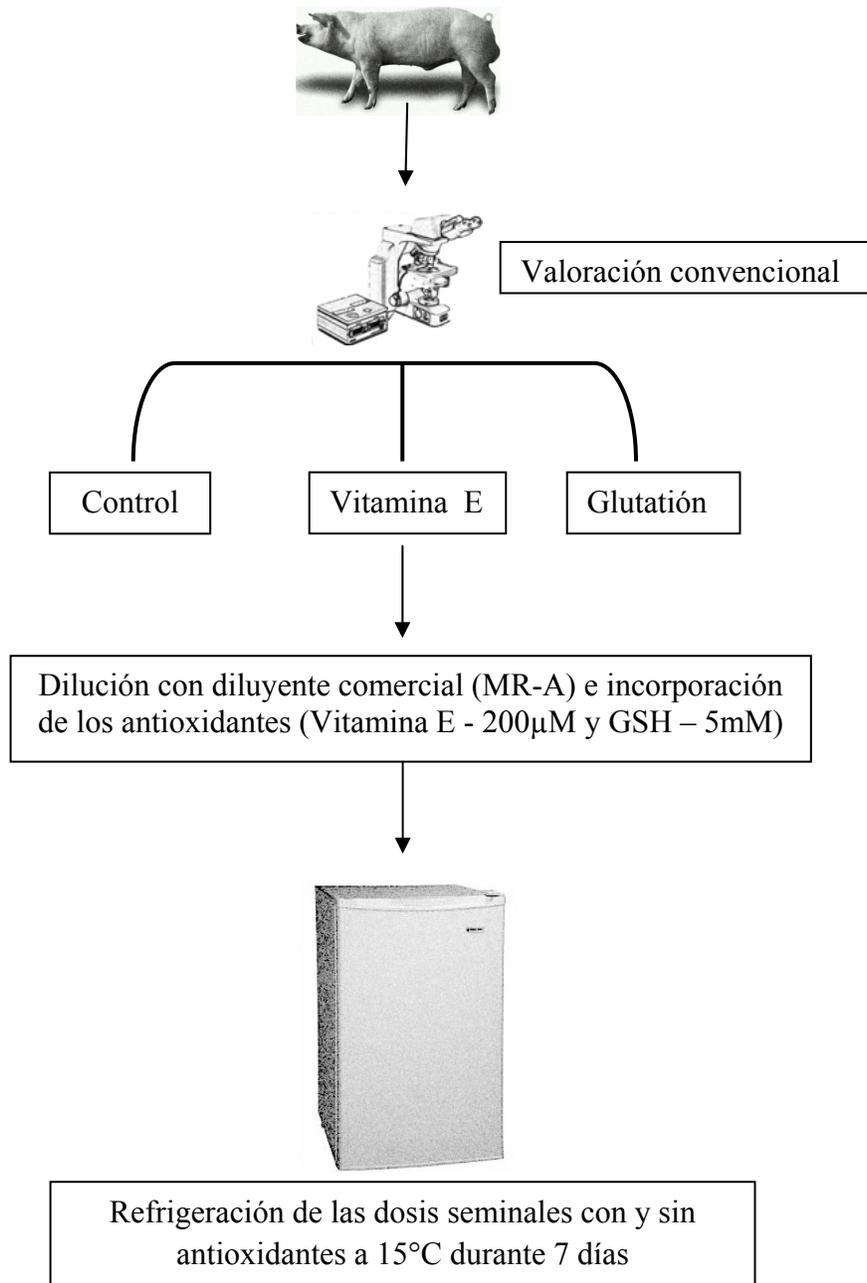


Figura 19. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas durante los días del experimento con semen refrigerado.

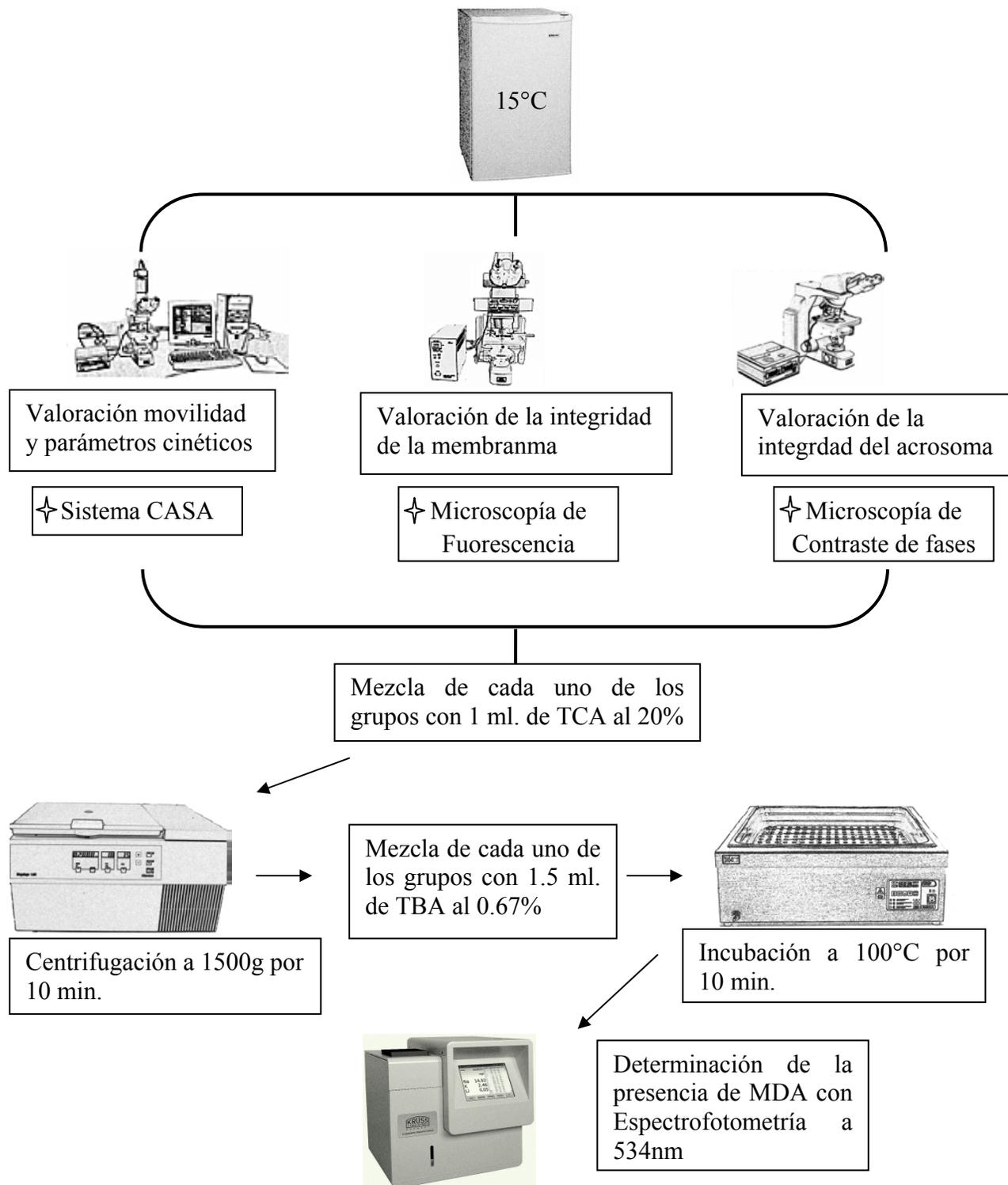


Figura 20. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas en el proceso de congelacion de semen.

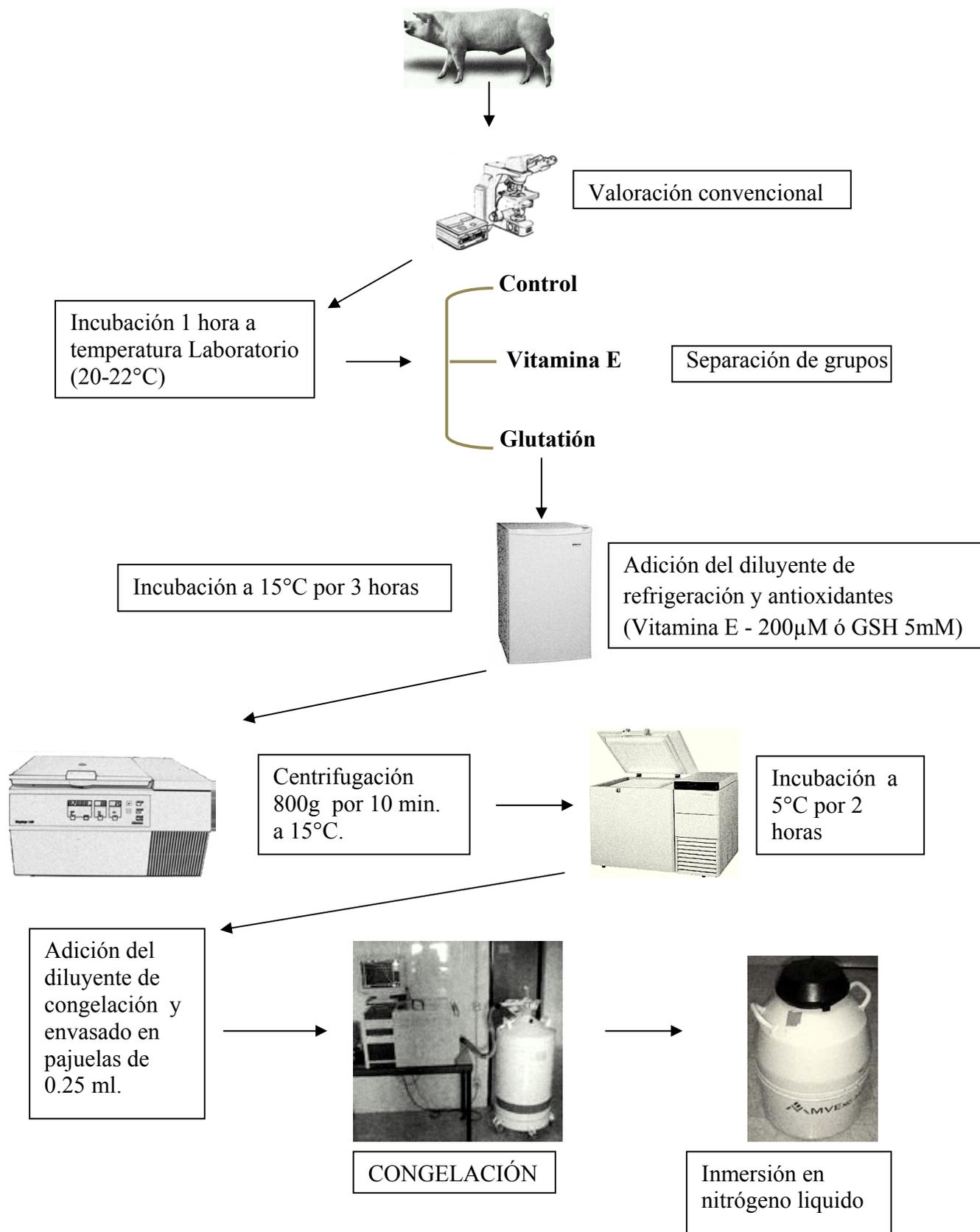


Figura 21. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas una vez hecha la descongelación.

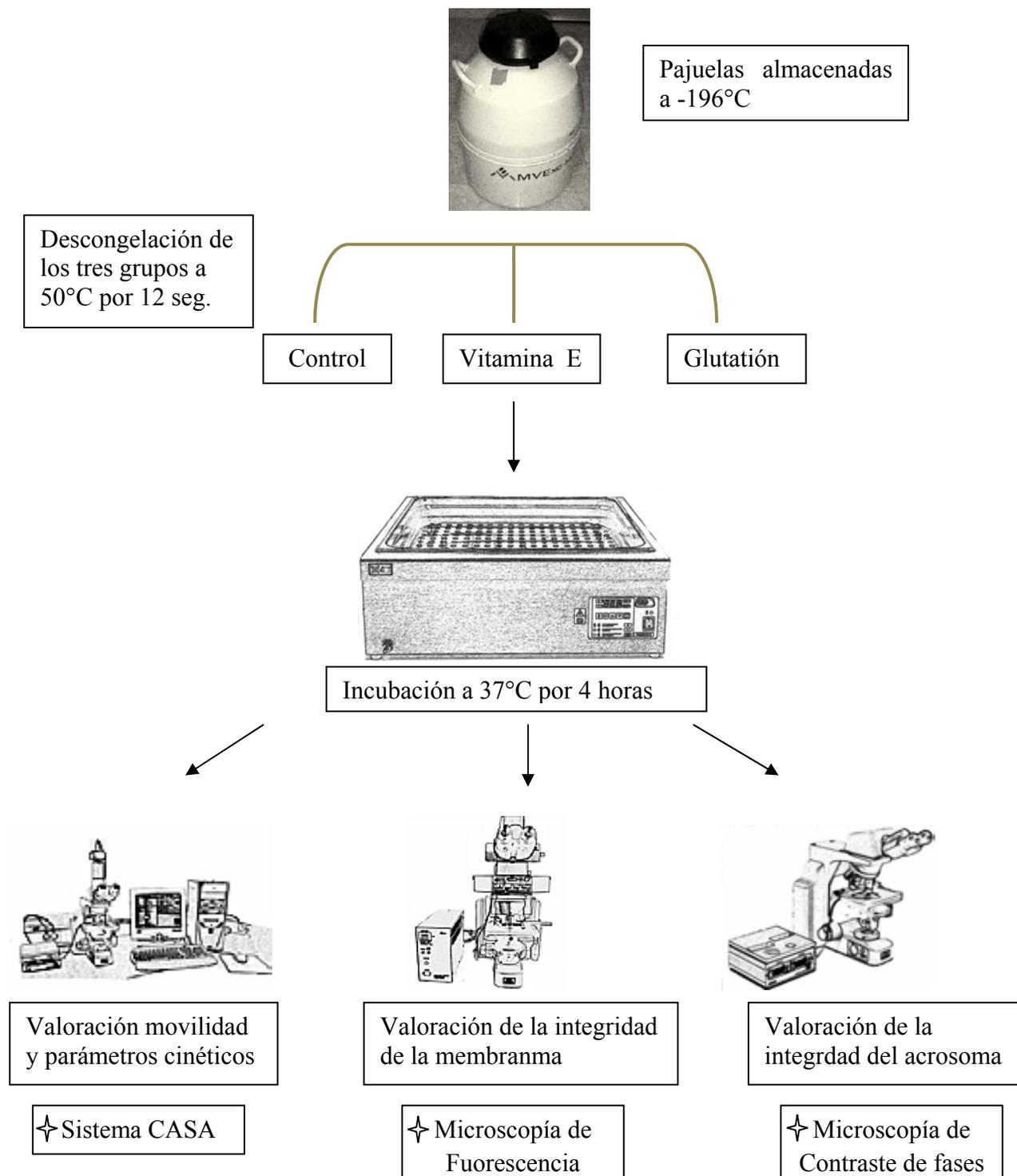
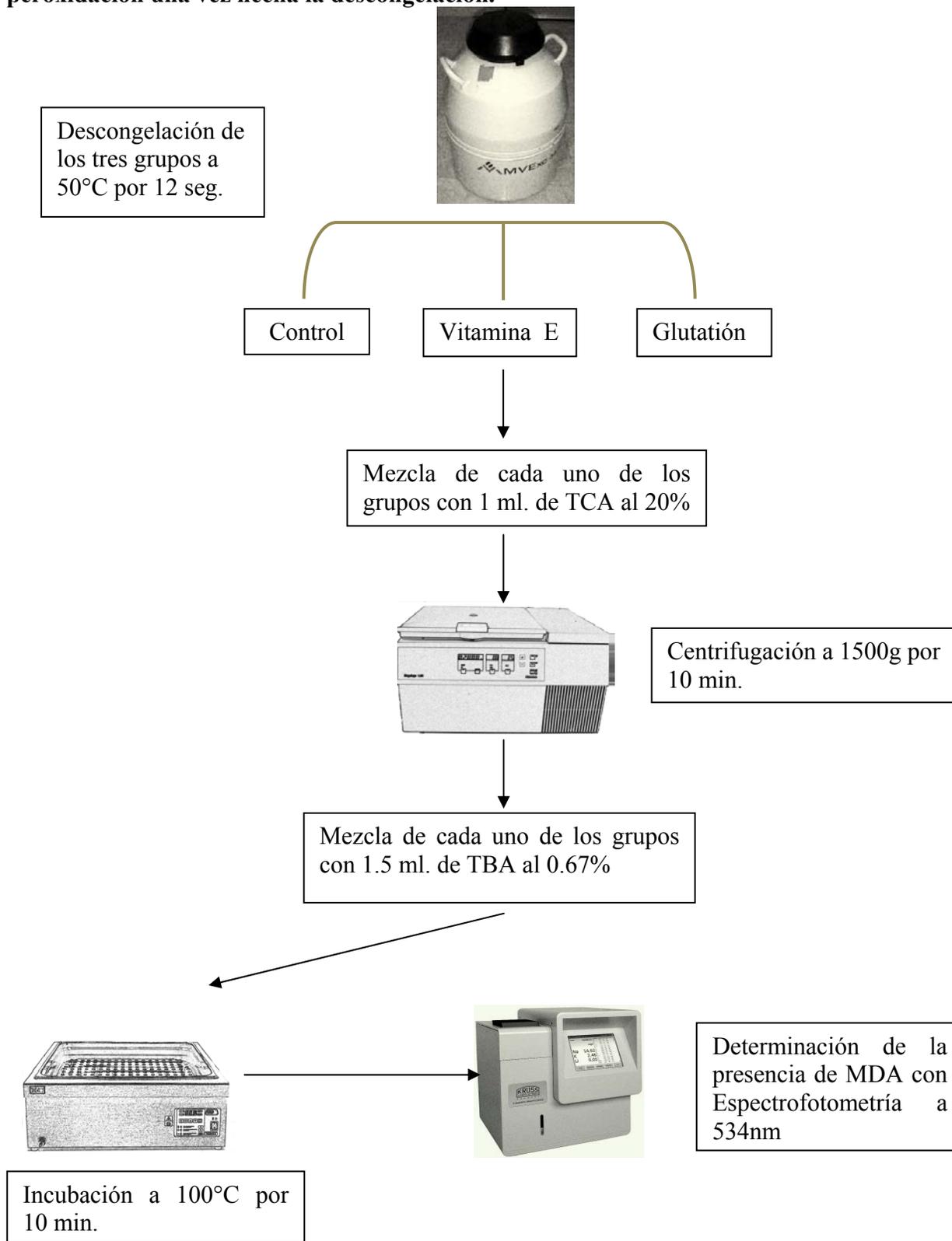


Figura 22. Diagrama de flujo de las operaciones realizadas en la valoración de los niveles de peroxidación una vez hecha la descongelación.



3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el estudio de los resultados obtenidos en este trabajo se utiliza el paquete informático SPSS 15.0 para Windows (Statistical Package for the Social Science, Chicago, Illinois, EEUU).

En primera instancia se realiza la prueba de Shapiro-Wilk a todas las comparaciones efectuadas, de esta forma se establece si los conjuntos de datos a evaluar cumplen o no con las condiciones de normalidad, por otra parte, se realiza también el contraste de Levene, de esta manera se acepta o no la premisa de (igualdad de varianzas) homocedasticidad, el nivel de significación para tal acción fue de 15%.

Se emplea el t-test de Student para la comprobación de la homogeneidad entre los grupos suplementados con los antioxidantes y los que funcionan como grupo control, esto en el caso de muestras independientes para todos los parámetros analizados, en el caso de que los conjuntos de datos presenten una distribución normal. Por otra parte, si no se cumple la premisa de normalidad entre ellos, se recurre a su comparación en el test no paramétrico de Mann-Whitney, así pues en estas dos pruebas y en el resto de las comparaciones, se considera como significativa cuando las diferencias encontradas resulten inferiores al 5% de la probabilidad.

Para analizar la respuesta observada, entre los días de la valoración en el caso del semen refrigerado o entre horas en el caso del semen congelado-descongelado, para los parámetros de movilidad espermática, integridad de la membrana, estado del acrosoma y peroxidación, se realiza en los casos en los que los datos presenten una distribución normal un ANOVA de un factor, estableciendo el sitio donde aparecen las diferencias entre días, mediante el test HSD de Tukey o mediante el test de Games-Howell, esto en función a si se puede o no asumir la homocedasticidad de los datos.

Se realiza un análisis para determinar la correlación que mantienen los distintos parámetros de calidad seminal, con la presencia de PL, mediante el desarrollo del coeficiente de correlación de Pearson.

4. Resultados

4. Resultados

Los valores individualizados de todos los análisis realizados en cada uno de los grupos experimentales se recogen en las las tablas 44 a la 91 del apartado de Anexos.

4.1 EXPERIMENTO 1. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN REFRIGERADO DE VERRACO A 15°C MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol /Glutación reducido), Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

4.1.1 Efecto de la adición de un Análogo de la Vitamina E, y del Glutación Reducido sobre la integridad de la membrana (vitalidad).

En la tabla 16 se muestran los resultados en el estudio que se realiza de la integridad de la membrana de los grupos control, vitamina E y GSH, para los días 0, 5 y 7 después de haber preparado las dosis seminales y refrigerarlas a 15°C, valores individualizados en la tablas 48, 49 y 50 de la sección de Anexos. Se constata una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre los valores del grupo control y los dos antioxidantes utilizados, no apreciándose, sin embargo, entre los dos grupos que contienen antioxidante. Entre los días de la experiencia se aprecia una diferencia estadística significativa en cada grupo analizado, a excepción del grupo GSH, pues no existe diferencia significativa en el día 5 y el 7, lo que sugiere que la protección a favor de la integridad de la membrana es más efectiva a partir del día 5 en comparación a los demás grupos en el mismo periodo de tiempo.

Tabla 16. Evolución de la integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos.

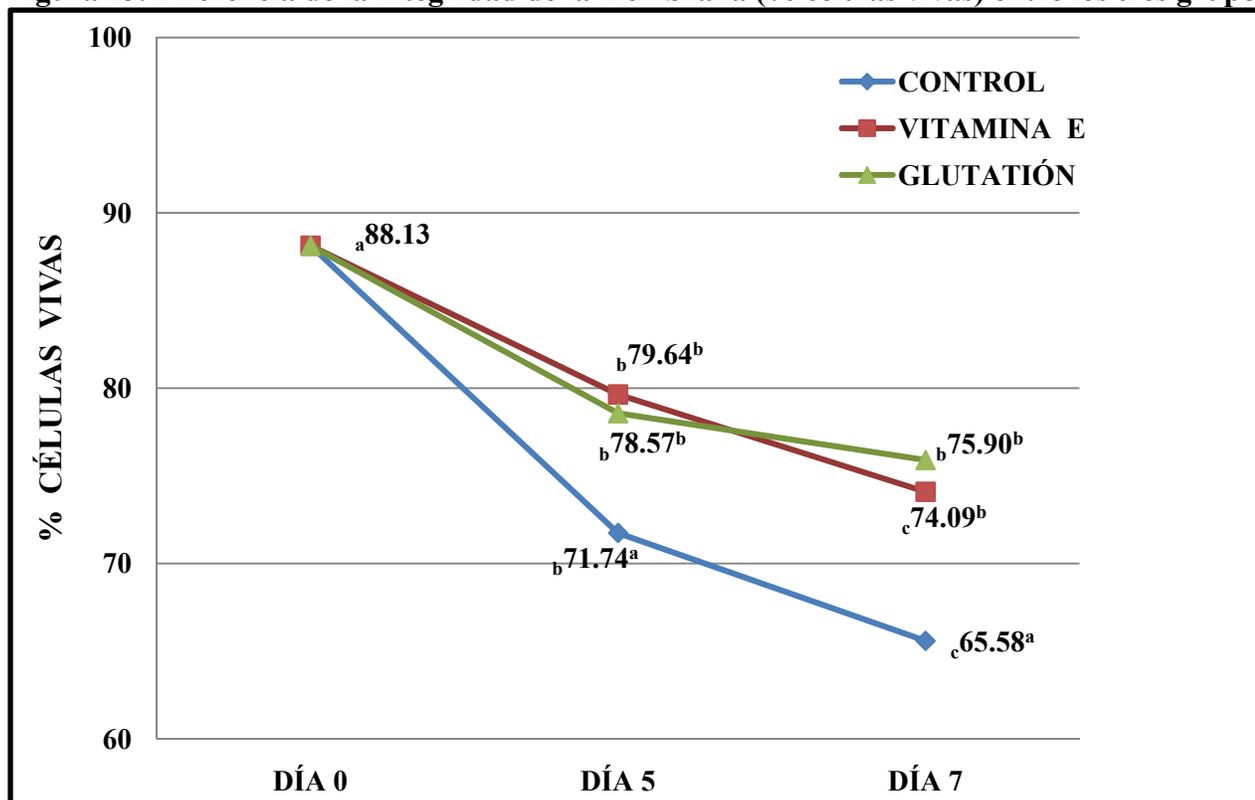
DÍA	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
	N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
0	10	^a 88,13	5.68	10	^a 88.13	5.68	10	^a 88.13	5.67
5	10	^b 71,74 ^a	5.49	10	^b 79.64 ^b	3.35	10	^b 78.57 ^b	4.58
7	10	^c 65,58 ^a	4,36	10	^c 74,09 ^b	4,45	10	^b 75,90 ^b	3,06

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

4. Resultados

En las siguientes figuras (23, 24, 25 y 26), se muestran de manera gráfica las diferencias detectadas, entre cada uno de los antioxidantes con el grupo control y entre ellos. Cabe resaltar que en el día 0, prácticamente los resultados son iguales para todos los grupos experimentales, evidentemente esto es debido a que la valoración se efectúa inmediatamente después de que se extrae el semen, y en su caso, de adicionar el antioxidante.

Figura 23. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos.



Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

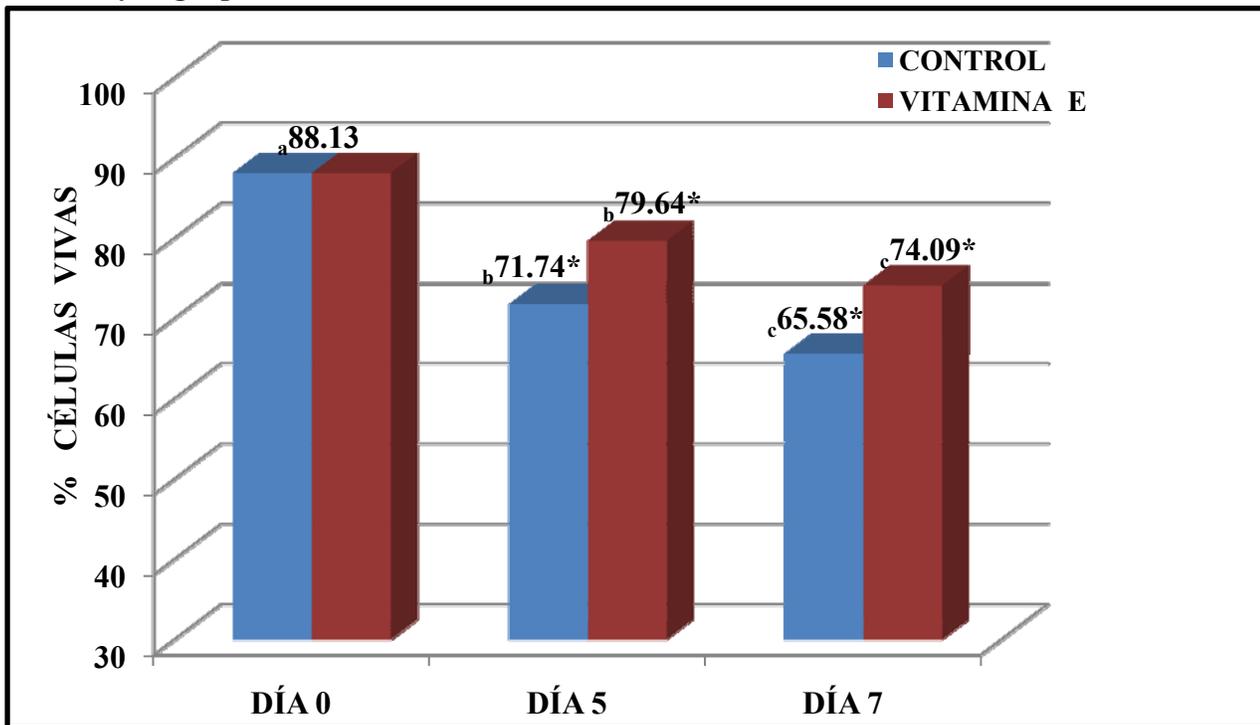
Como ya hemos comentado en el párrafo anterior los valores medios de las valoraciones para el día 0 no pueden ser tomados más que como referencia para la comparativa efectuada con el resto de los días (5 y 7), partiendo de una calidad espermática lo mas parecida posible, para valorar de mejor manera el efecto de los antioxidantes al cabo del transcurso del tiempo de incubación.

En la figura 24, se aprecia claramente que a partir del día 5 el porcentaje de células vivas (vitalidad), para el caso del grupo que se añadía vitamina E, no desciende de manera tan acusada presentando un 79,64%, mientras que el grupo control descendió el porcentaje hasta casi el 70%,

4. Resultados

encontrándose de esta manera una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), conforme avanza el periodo de incubación la diferencia entre los dos grupos sigue siendo estadísticamente significativa ($p < 0.001$), ya que, en el día 7 el grupo al que se añade vitamina E presenta casi un 75% mientras que el grupo control descendió hasta el 65% de células con integridad de la membrana.

Figura 24. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y el grupo Vitamina E.

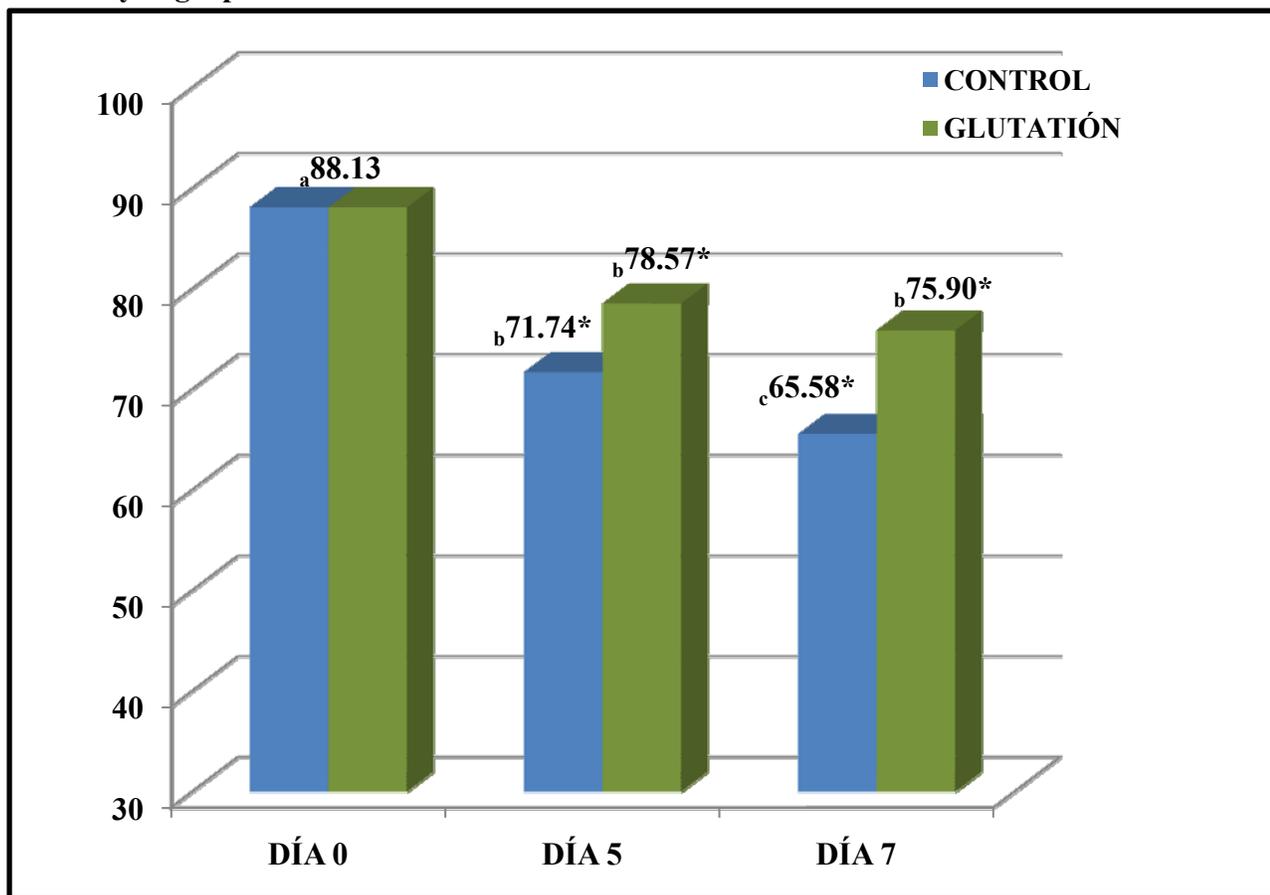


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre vitamina E y control ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

De la misma manera que en el caso anterior en el que se compara el grupo control con el grupo que contiene vitamina E, en la siguiente figura se muestra la comparación de las diferencias encontradas entre el grupo control y el grupo GSH, donde se puede observar que el grupo que contiene el antioxidante resiste mejor el proceso de refrigeración, reflejándose en una mejor respuesta en la valoración de la integridad de la membrana de los espermatozoides, constatándose una diferencia estadística ($p < 0.001$).

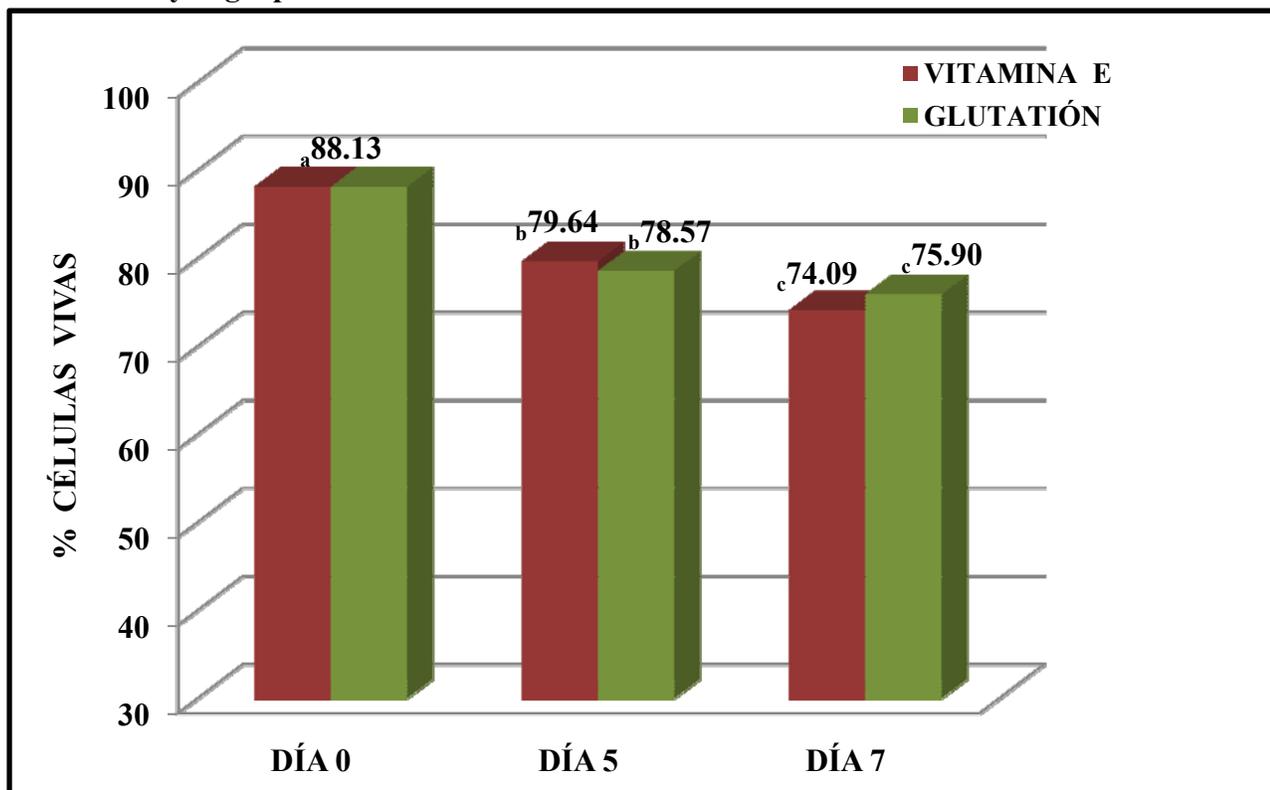
Figura 25. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y el grupo Glutación.



(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y glutación. ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

La figura 26 recoge las diferencias entre los grupos vitamina E y GSH, en dicha comparación no se constata ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Se aprecia que la diferencia en cuanto a mejor respuesta a la conservación es muy similar entre los grupos, siendo los valores para el grupo de la vitamina E y el grupo GSH 79,64 y 78,57 % respectivamente en el día 5 del experimento, y en el día 7 el valor registrado para el caso de la vitamina E fue 74,24 y para el GSH 75,90.

Figura 26. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Vitamina E y el grupo Glutacion.



No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre vitamina E y glutatión.

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

4.1.2 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutathión Reducido sobre la integridad del acrosoma.

En la tabla 17 se pueden apreciar los resultados del análisis que se realiza para evaluar el efecto de los antioxidantes sobre el estado del acrosoma. Los resultados en esta tabla se muestran como la comparación general de los valores medios del grupo control con los grupos vitamina E y GSH, donde se aprecia una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Sin embargo, no se encuentra diferencia estadística entre los antioxidantes. Cabe recordar que los valores del día 0 son los mismos en los tres grupos debido a lo mencionado en el epígrafe anterior. Se constata también diferencias significativas entre los días del experimento en cada uno de los grupos. Valores individualizados en las tablas 51, 52 y 53 de la sección de Anexos.

Tabla 17. Evolución de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre los tres grupos.

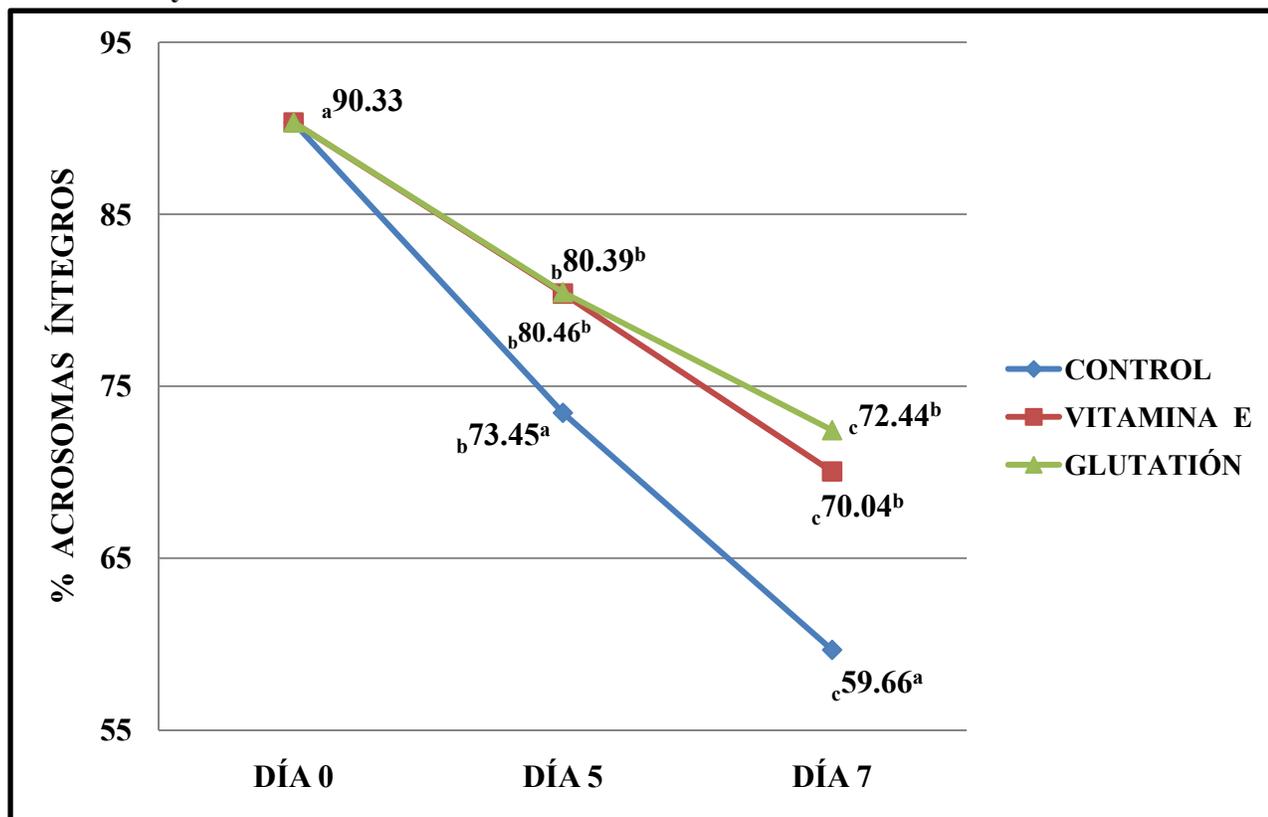
DIA	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
	N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
0	10	^a 90,33	5,26	10	^a 90,34	5,26	10	^a 90,34	5,26
5	10	^b 73,45 ^a	5,06	10	^b 80,39 ^b	5,18	10	^b 80,46 ^b	4,24
7	10	^c 59,66 ^a	4,58	10	^c 70,04 ^b	5,91	10	^c 72,44 ^b	4,71

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 27 se aprecia la evolución de los distintos grupos analizados a lo largo del experimento, de la misma manera que en el caso de la valoración de la integridad de la membrana, se observa para el caso de los grupos que contenían un antioxidante, que la disminución en el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma íntegro no es tan acentuada en comparación con el grupo control. Las diferencias encontradas estadísticamente son ($p < 0.001$) como se indica en la figura para cada caso.

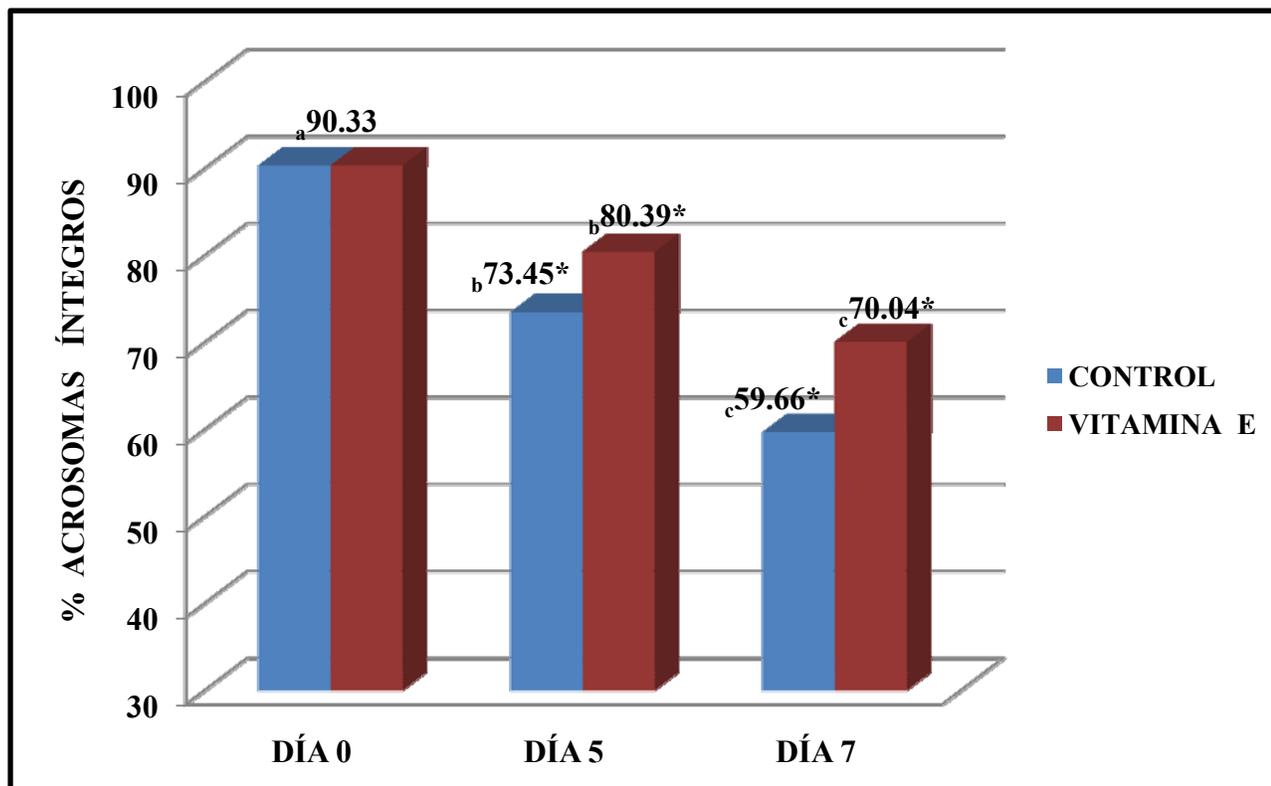
Figura 27. Diferencia de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre Control, Vitamina E y Glutación.



Distintito subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

La figura 28 muestra gráficamente la diferencia en la evolución del estado del acrosoma en los grupos control y vitamina E, donde se puede observar claramente que el grupo que contiene el antioxidante responde mejor para esta prueba, siendo apreciable una mayor diferencia para el día 7 de la refrigeración. En esta valoración la diferencia estadística que se constata por el programa estadístico es de $p < 0.001$.

Figura 28. Diferencia de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre Control y Vitamina E.

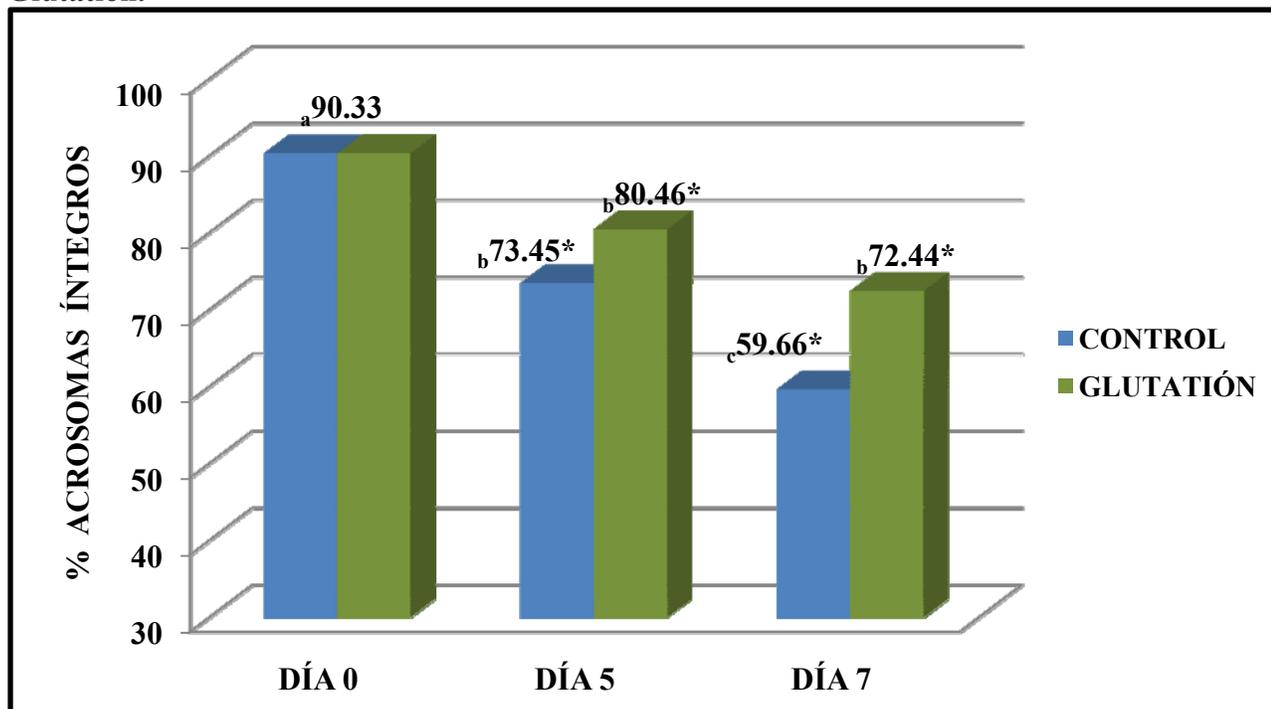


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y vitamina E ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 29 se muestra la evolución de grupo control en comparación al grupo GSH, donde de igual forma que en la figura anterior se aprecia claramente que la presencia del antioxidante mejora de manera pronunciada la presencia de espermatozoides con el acrosoma íntegro en el día 5 y día 7, aunque la mayor diferencia presente entre los dos grupos se observa en el día 7, donde la diferencia estadística que se encuentra es muy significativa ($p < 0.001$).

Figura 29. Diferencias de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre Control y Glutación.

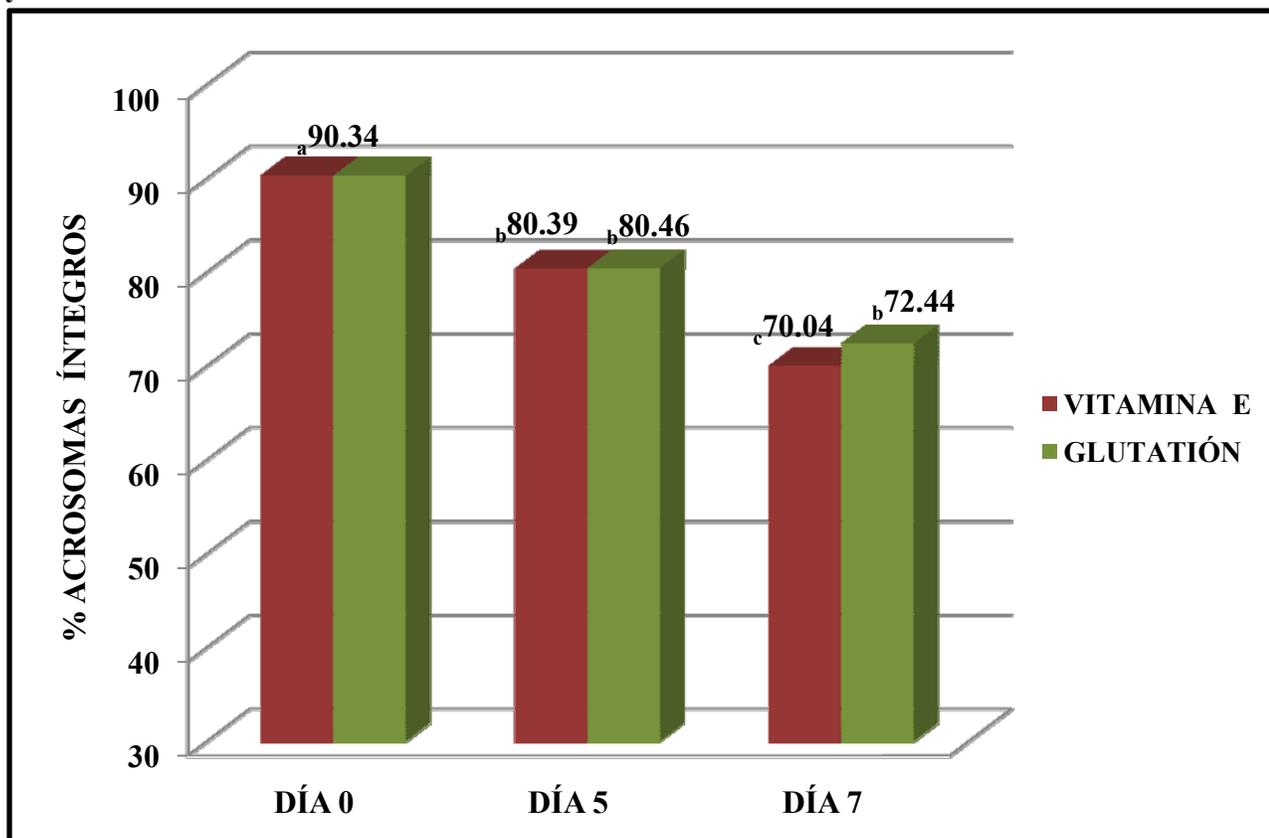


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y glutación ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 30 se muestra una comparación entre el grupo que contiene el análogo de la vitamina E y el que contiene GSH, se observa que el grupo que contiene el GSH mejora levemente la calidad de la dosis refrigeradas, en cuanto a la integridad del acrosoma, dicha diferencia es más apreciable en el día 7 de la prueba, sin embargo no se aprecia una diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los días.

Figura 30. Diferencia de la integridad del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre Vitamina E y Glutación.



No se aprecia diferencia estadísticamente significativa entre vitamina E y glutación.

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$)

4.1.3 Efecto de un análogo de la vitamina E y del Glutatión reducido sobre la movilidad espermática.

En la tabla 18 se muestran los resultados obtenidos tras la evaluación de la movilidad total usando el programa informático ISAS®.

En el caso de la valoración en el día 5 de la refrigeración solo se encuentra diferencia estadística ($p < 0.001$), entre el grupo control y el grupo GSH, mientras tanto en este día de análisis el grupo vitamina E no presenta diferencia estadística con ningún otro grupo analizado.

En el día 7 de la experimentación y tras realizar la comparación de los valores medios de los tres distintos grupos, se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) para el caso de la comparación del grupo control con el grupo vitamina E y el grupo GSH. Para el caso de los dos antioxidantes, no se aprecia ninguna diferencia estadística entre ellos, aunque los valores reflejan una mejor tendencia en el mantenimiento de la movilidad en el grupo que contiene GSH. Se constata diferencia estadísticamente significativa entre los días de la incubación en cada uno de los grupos analizados. Los valores individualizados se recogen en las tablas 54, 55 y 56 de la sección de Anexos.

Tabla 18. Evolución de la movilidad (%) entre los tres grupos.

DÍA	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
	N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
0	10	_a 85,79	8,56	10	_a 85,79	8,56	10	_a 85,79	8,56
5	10	_b 66,49 ^a	6,76	10	_b 72,01 ^b	5,83	10	_b 73,41 ^b	5,13
7	10	_c 50,78 ^a	10,90	10	_c 61,29 ^b	4,57	10	_c 64,71 ^b	2,69

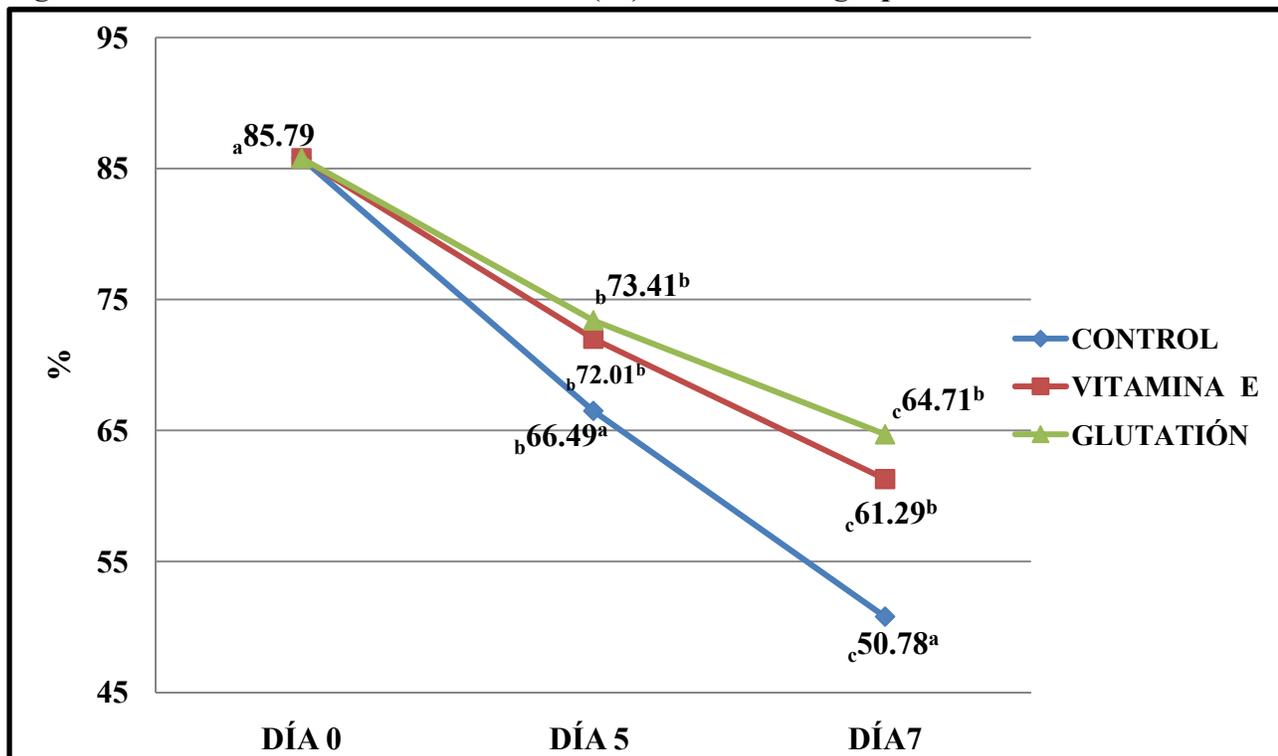
Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

4. Resultados

En la figura 31 se aprecia la evolución de la movilidad total a lo largo del experimento, se muestra cómo va disminuyendo la movilidad gradualmente a lo largo de la incubación, en el día 5 se constata una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el grupo control y los demás grupos.

Para el caso del día 7, se obtiene una diferencia estadística ($p < 0.001$) entre el grupo control y los grupos que contienen antioxidante. Se aprecia en la imagen que el grupo control desciende en sus valores de manera acusada, mientras que en el resto de los grupos la disminución es menos pronunciada, reflejado esto en la diferencia estadística ($p < 0.001$) encontrada para este día.

Figura 31. Diferencia de la movilidad total (%) entre los tres grupos.

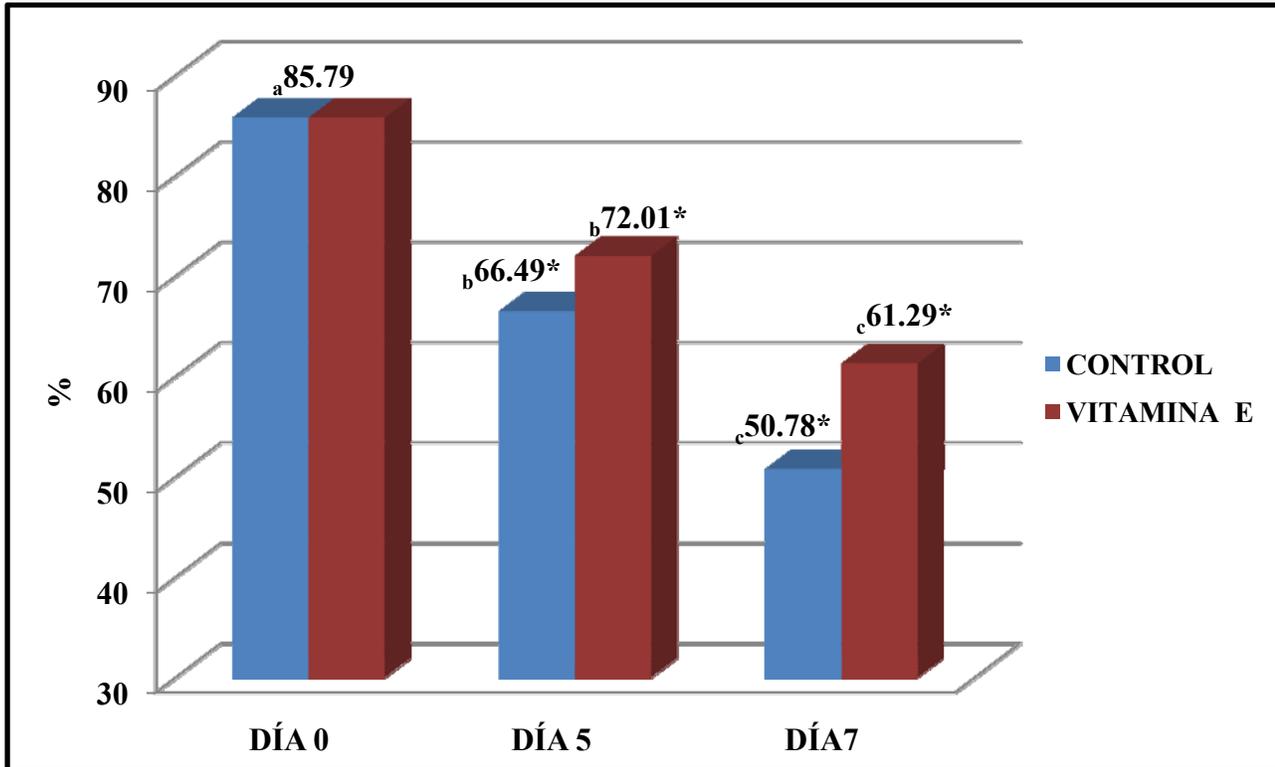


Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

4. Resultados

En la figura 32 se muestra la comparación entre el grupo control y el grupo de la vitamina E, que como se ha mencionado antes, se constata diferencia estadística ($p < 0.001$), se aprecia claramente la diferencia entre los grupos, siendo el grupo que contiene el antioxidante el que mantiene la movilidad de mejor manera durante los días valorados.

Figura 32. Diferencia de la movilidad total (%) entre Control y Vitamina E.

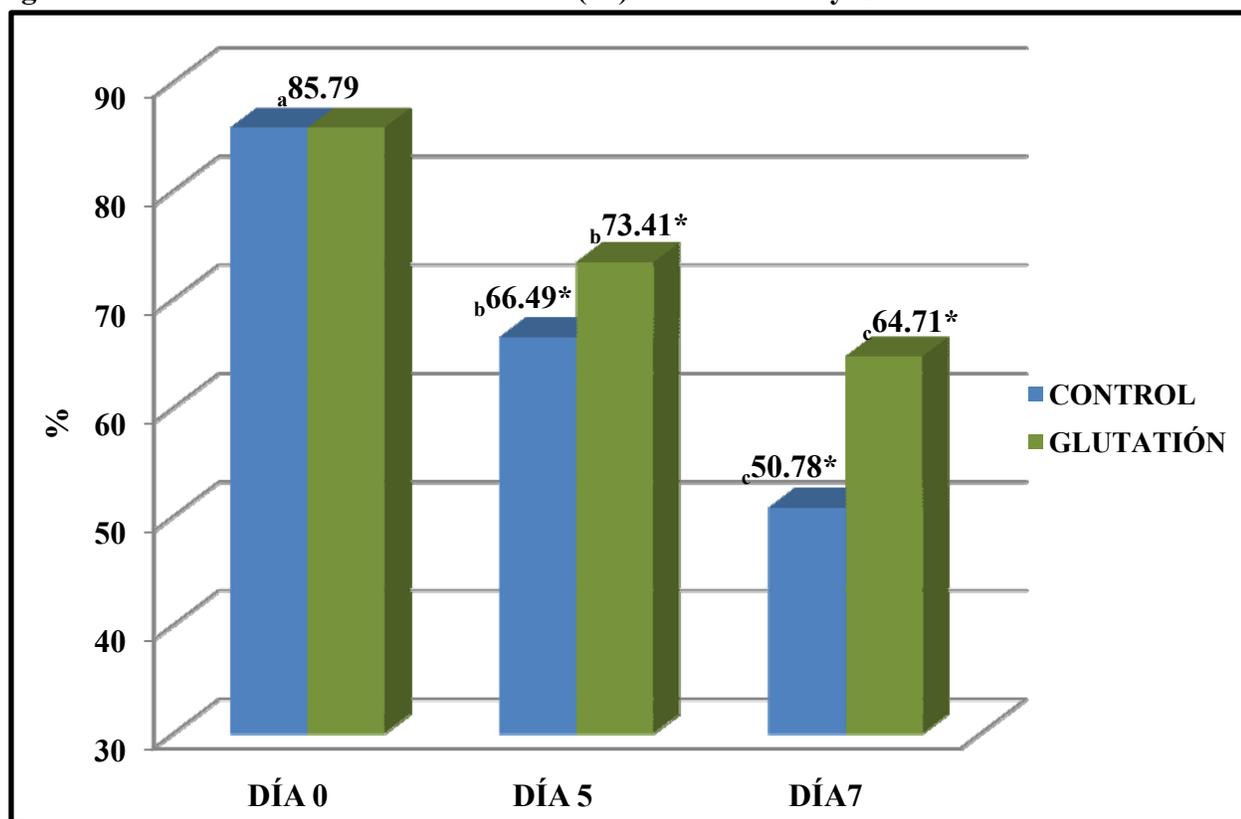


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y vitamina E ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

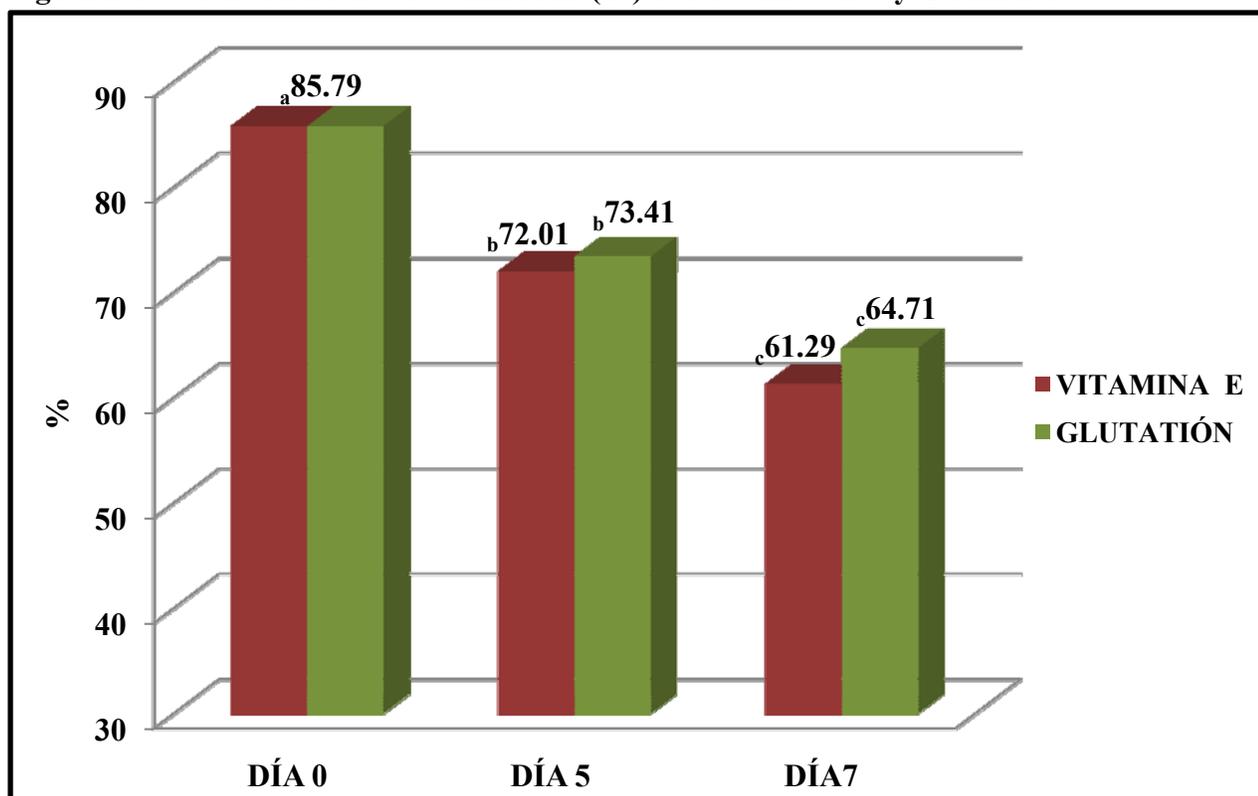
En la figura 33 se aprecia la diferencia entre el grupo control y el grupo GSH, en donde en los días 5 y 7 se observa una diferencia significativa ($p < 0.001$), se aprecia que la intensidad de descenso en el porcentaje de movilidad en el grupo control es el mismo una vez iniciada la refrigeración, mientras que el grupo GSH muestra un descenso menos pronunciado a partir del día 5.

Figura 33. Diferencia de la movilidad total (%) entre Control y Glutación.



(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y glutación ($p < 0.001$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 34 se aprecia claramente la cercanía de los valores medios de los grupos que contenían antioxidantes, lo que hace que no se aprecie ninguna diferencia estadística entre ellos a lo largo del periodo de refrigeración. Aunque no se encuentra diferencia significativa entre ellos el grupo GSH funciona mejor en cuanto al mantenimiento de la movilidad en los días 5 y 7 de la experiencia.

Figura 34. Diferencia de la movilidad total (%) entre Vitamina E y Glutación.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre vitamina E y glutación.

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En las tablas siguientes (19, 20 y 21) se recogen los resultados obtenidos en cada día de la incubación, en cuanto a la valoración de los parámetros cinéticos mediante la utilización del programa CASA, se muestran las diferencias estadísticas ($p < 0.001$) encontradas en cada uno de los días de la conservación mediante refrigeración.

Como se puede observar en la tabla 19, no se constata ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos analizados en el día 0 de la refrigeración. Los valores individualizados se muestran en las tablas 57 y 58 de la sección de Anexos.

Tabla 19. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos para el día 0.

	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
	N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
VCL ($\mu\text{m/s}$)	2012	51,38	30,02	2083	52,77	30,04	1957	52,33	29,85
VSL ($\mu\text{m/s}$)	2012	24,79	17,55	2083	25,43	17,58	1957	25,53	17,64
VAP ($\mu\text{m/s}$)	2012	39,91	24,90	2083	41,06	24,79	1957	40,70	24,61
LIN (%)	2012	0,49	0,22	2083	0,49	0,22	1957	0,49	0,22
STR (%)	2012	0,63	0,23	2083	0,63	0,23	1957	0,63	0,22
WOB (%)	2012	0,76	0,16	2083	0,76	0,15	1957	0,76	0,15
ALH (μm)	2012	1,83	1,00	2083	1,87	1,01	1957	1,86	1,01
BCF (Hz)	2012	7,37	3,10	2083	7,53	3,10	1957	7,38	3,06

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados.

Para el caso del día 5 en la valoración de los parámetros cinéticos y como se muestra en la siguiente tabla se aprecian diferencias estadísticas ($p < 0.001$) entre los distintos parámetros analizados, a excepción del parámetro BCF donde no se encuentra ninguna diferencia entre ninguno de los grupos. Valores individualizados en las tablas 59 y 60 de la sección de Anexos.

Tabla 20. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos para el día 5.

		CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
		N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
DÍA 5	VCL ($\mu\text{m/s}$)	1243	68,60 ^a	37,63	785	80,20 ^b	40,44	996	78,34 ^b	39,42
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	1243	28,24 ^a	19,13	785	28,36 ^a	19,27	996	31,82 ^b	22,00
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	1243	47,09 ^a	27,71	785	53,92 ^b	29,95	996	51,25 ^b	28,40
	LIN (%)	1243	0,42 ^a	0,21	785	0,37 ^b	0,21	996	0,40 ^c	0,20
	STR (%)	1243	0,61 ^a	0,23	785	0,54 ^b	0,24	996	0,61 ^a	0,23
	WOB (%)	1243	0,67 ^a	0,16	785	0,66 ^a	0,15	996	0,64 ^b	0,14
	ALH (μm)	1243	2,59 ^a	1,37	785	2,94 ^b	1,46	996	2,99 ^b	1,43
	BCF (Hz)	1243	8,54	3,69	785	8,60	4,15	996	8,45	3,87

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

En la tabla 21 se recogen los valores medios de la valoración de los distintos parámetros cinéticos en el día 7 de incubación, por el programa informático CASA, donde se puede apreciar que hay diferencia estadística ($p < 0.001$) en todos los parámetros para los tres grupos del experimento a excepción de BCF que igual que en el día anterior no se aprecia ninguna diferencia estadística. Para ver los valores individualizados revisar las tablas 61 y 62 de la sección de Anexos.

Tabla 21. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos para el día 7.

		CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
		N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
DÍA 7	VCL ($\mu\text{m/s}$)	1096	63,71 ^a	38,50	1121	75,00 ^b	44,17	814	82,93 ^c	45,11
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	1096	25,29 ^a	18,88	1121	25,49 ^a	18,80	814	30,04 ^b	21,45
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	1096	42,02 ^a	27,46	1121	48,45 ^b	30,00	814	50,89 ^b	28,71
	LIN (%)	1096	0,40 ^a	0,20	1121	0,36 ^b	0,20	814	0,37 ^b	0,20
	STR (%)	1096	0,60 ^a	0,23	1121	0,54 ^b	0,24	814	0,59 ^a	0,23
	WOB (%)	1096	0,65 ^a	0,15	1121	0,64 ^a	0,15	814	0,61 ^b	0,14
	ALH (μm)	1096	2,51 ^a	1,44	1121	2,96 ^b	1,77	814	3,30 ^c	1,76
	BCF (Hz)	1096	7,94	3,82	1121	7,96	3,66	814	8,10	3,75

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

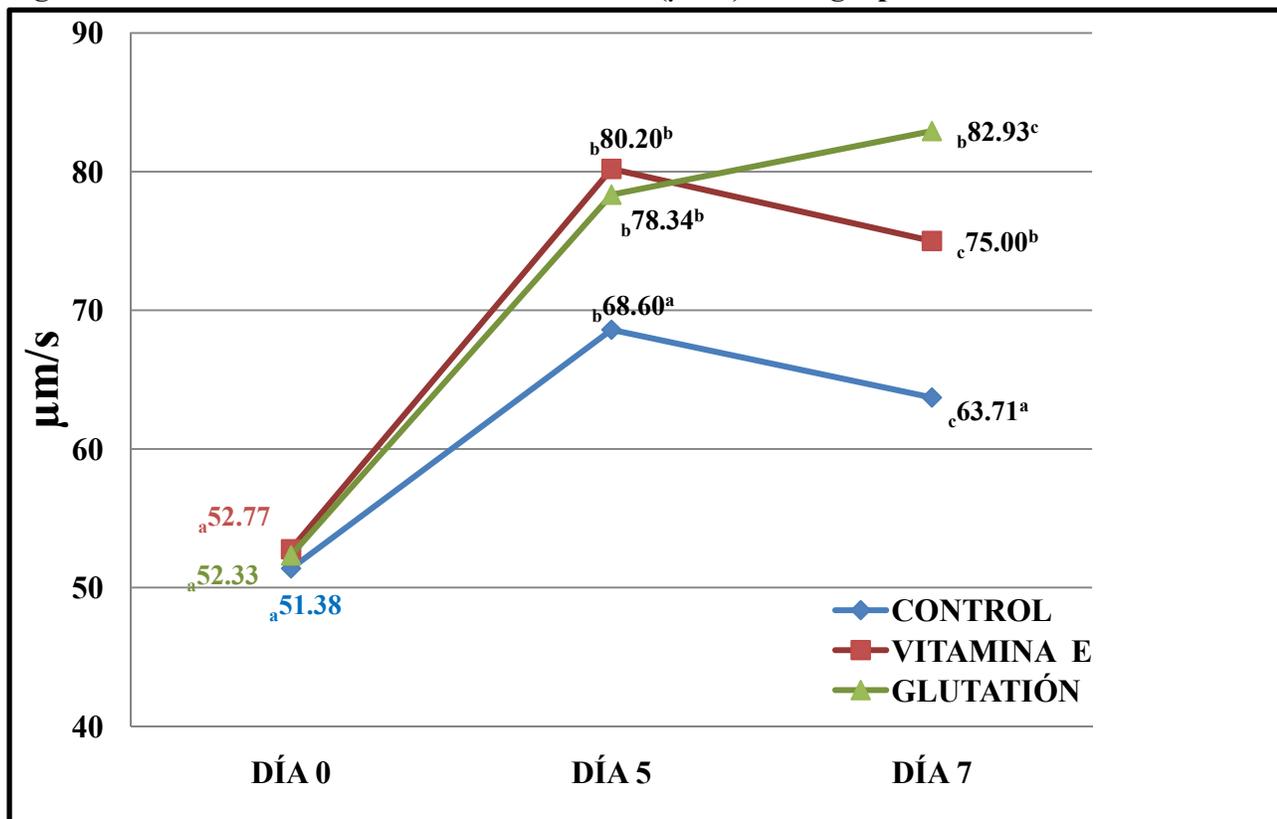
De la misma manera que en los epígrafes anteriores, a continuación se muestra de manera gráfica la diferencias en la valoración de los parámetros cinéticos con la ayuda del programa CASA, en las figuras siguientes (29 a la 36) se puede observar de manera individual cada uno de los parámetros analizados, también se observa la diferencia estadística ($p < 0.001$) encontrada en cada una de las comparaciones entre los grupos del experimento.

Para el caso del parámetro VCL que es un indicador de la distancia real recorrida por el espermatozoide, se puede apreciar que los grupos que contenían antioxidante presentaron un aumento significativo ($p < 0.001$) con respecto al grupo control en el día 5, sin haber diferencia estadística entre los antioxidantes.

4. Resultados

En el día 7 con respecto a este parámetro la diferencia estadística ($p < 0.001$) se encuentra entre los tres grupos, y como se aprecia en la figura el grupo que presenta valores medios más altos con respecto al resto de los grupos fue el que contenía GSH. Por otro lado, se constata diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), entre los días de la prueba en cada grupo, a excepción del grupo GSH donde el día 5 y 7 no presentaron diferencia significativa, lo que puede traducirse en un buen comportamiento de dicho antioxidante en la protección de la movilidad espermática.

Figura 35. Diferencia de la velocidad curvilinea ($\mu\text{m/s}$) entre grupos.

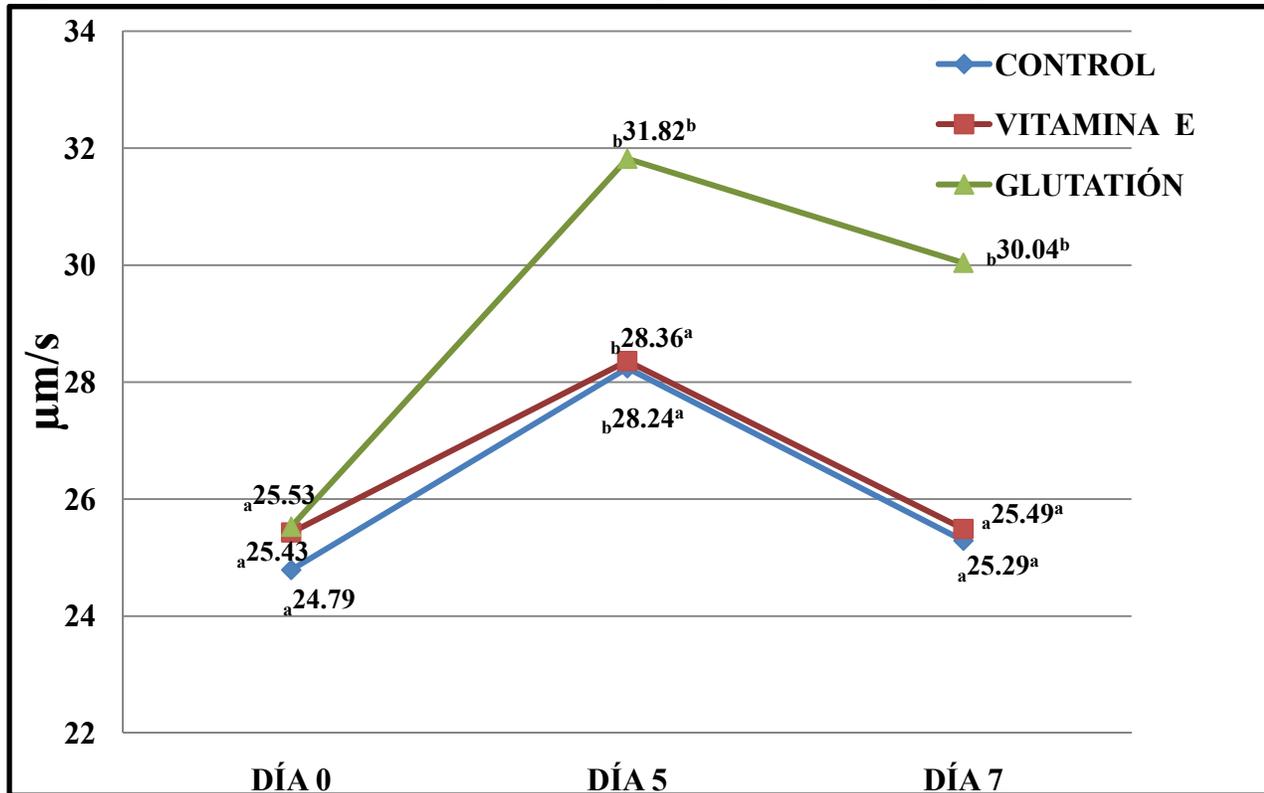


Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En las comparaciones entre los grupos analizados con respecto a VSL se aprecia en el día 5 un aumento significativo ($p < 0.001$) en el grupo GSH con respecto a los demás, no siendo así en la comparación de los valores medios entre el grupo control y el grupo vitamina E, que mostraron valores muy similares. En el día 7 las diferencias estadísticas ($p < 0.001$) se constatan de igual forma que en el día 5, sólo en el grupo GSH con respecto a los demás, mientras que los valores para el control y el grupo vitamina E continúan con la tendencia de tener valores muy similares como se

puede apreciar claramente en la figura 36. Una vez más el grupo GSH presenta el mejor comportamiento.

Figura 36. Diferencia de la velocidad rectilínea ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.

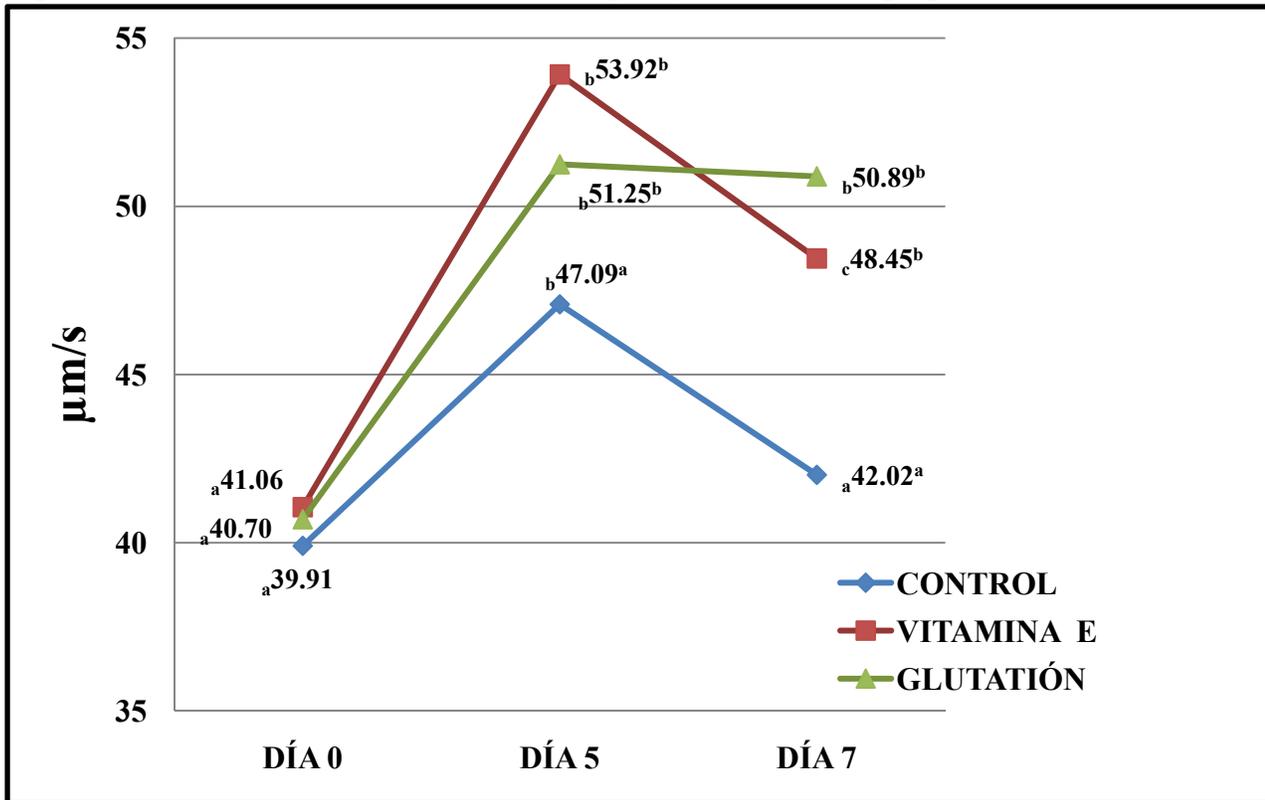


Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$). Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 37 se muestran las diferencias estadísticas encontradas en el caso de VAP, tanto en el grupo GSH como en el grupo vitamina E ($p < 0.001$) con respecto al grupo control en el día 5, no siendo así en el caso de los dos grupos con antioxidantes, los cuales no presentan diferencia significativa entre ellos, aunque el valor más alto se observa en el grupo vitamina E.

Para el día 7 las diferencias estadísticas ($p < 0.001$), se mantienen en el mismo orden, solo que los valores más altos en este caso los presenta el grupo GSH, como se aprecia claramente en la figura lo que se puede entender como una mejor protección de este parámetro a lo largo del tiempo por parte de este antioxidante. En cuanto a las diferencias entre los días en cada grupo, el grupo GSH fue el único que no presenta diferencia significativa entre el día 5 y el día 7, lo que una vez más sugiere que este antioxidante protege mejor la VAP de las dosis refrigeradas.

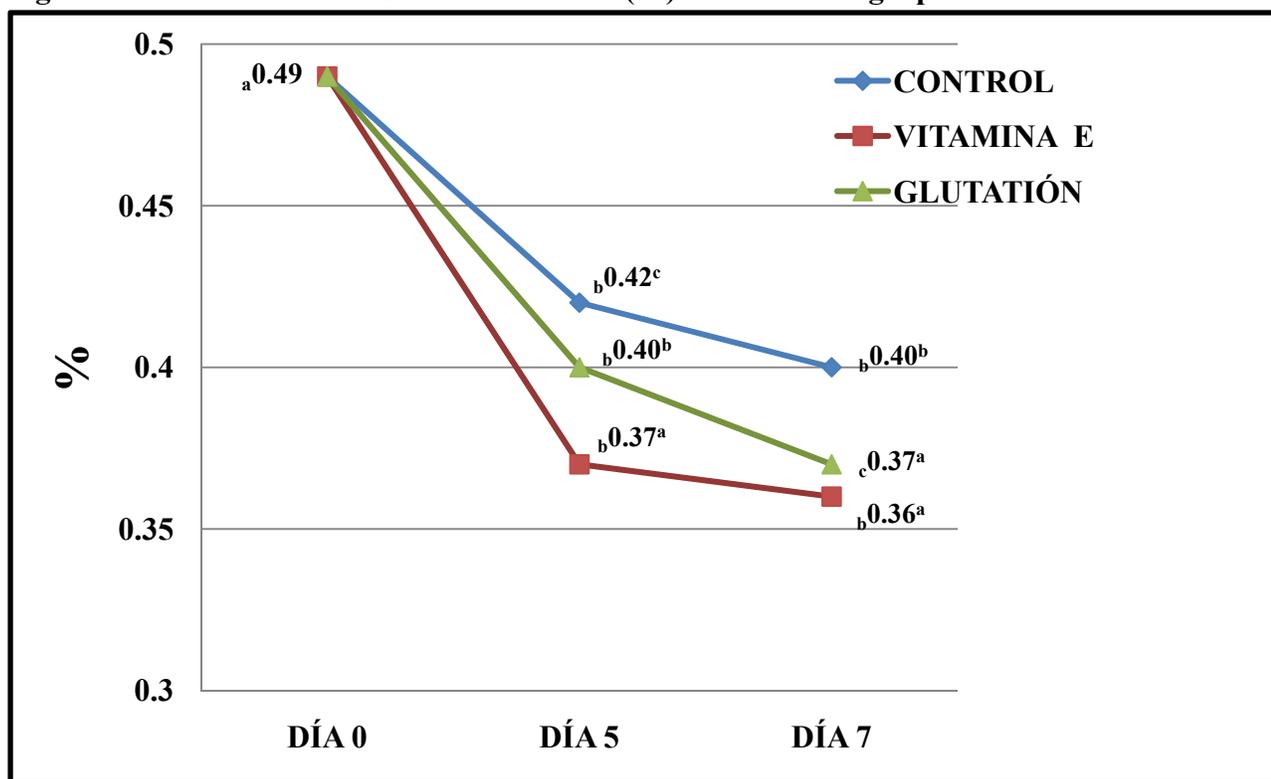
Figura 37. Diferencia de la velocidad media ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En figura 38 se aprecia la diferencia estadística ($p < 0.001$) en la valoración del día 5 la cual se presenta entre todos los grupos de la prueba, el que muestra los valores más bajos lo que denota un movimiento más curvilíneo o sinusoidal fue el grupo de la vitamina E, en el día 7 se constata una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) que se presenta solo en la comparación de los valores medios del grupo control con respecto a los demás grupos, los grupos con antioxidantes no mostraron significación estadística entre ellos.

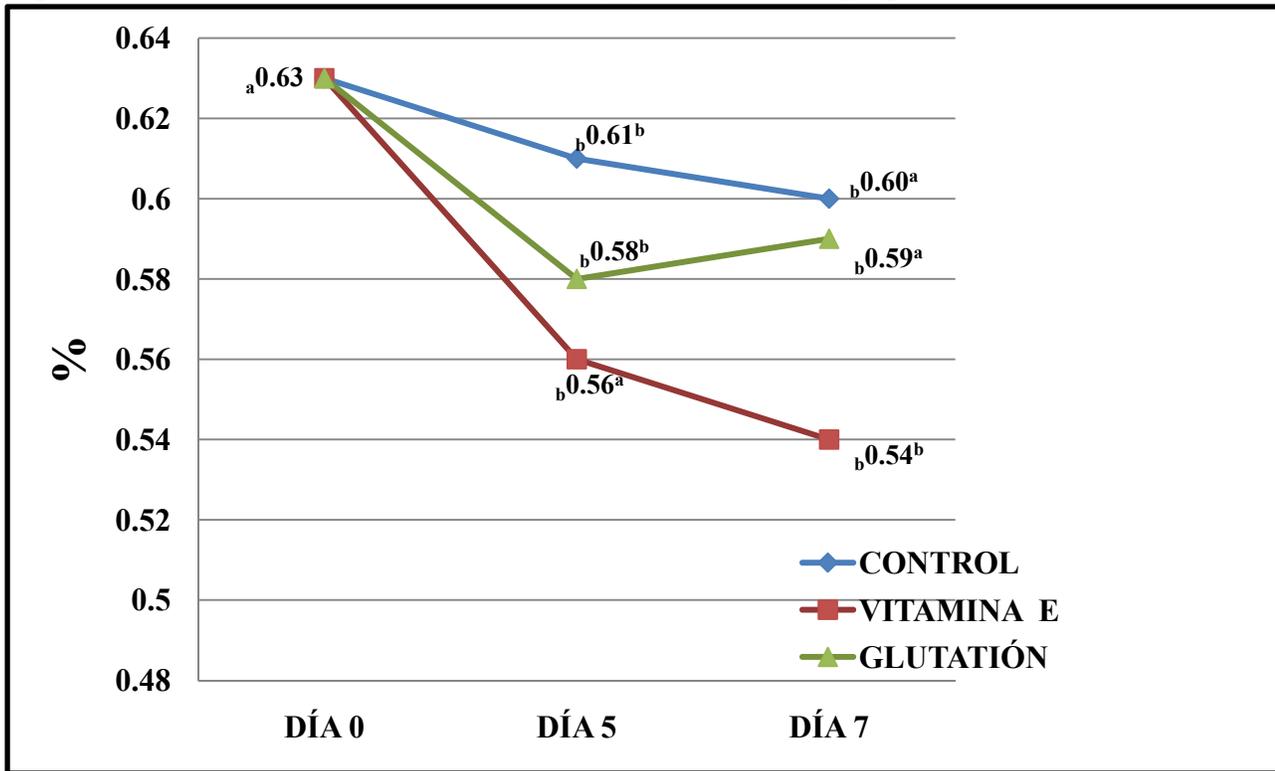
Figura 38. Diferencia del índice de linealidad (%) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 39 se muestran los resultados para STR, en el día 5, se aprecia una diferencia significativa entre el grupo control y los antioxidantes ($p < 0.001$), sin embargo entre los antioxidantes no existe. En el día 7 la tendencia continua en el mismo orden, aunque no existe diferencia entre el grupo GSH y el grupo control sí que la hay entre el grupo vitamina E y los demás grupos. También se muestran las diferencias estadísticas entre los días del experimento en cada uno de los grupos analizados.

Figura 39. Diferencia del índice de rectitud (%) entre los tres grupos.



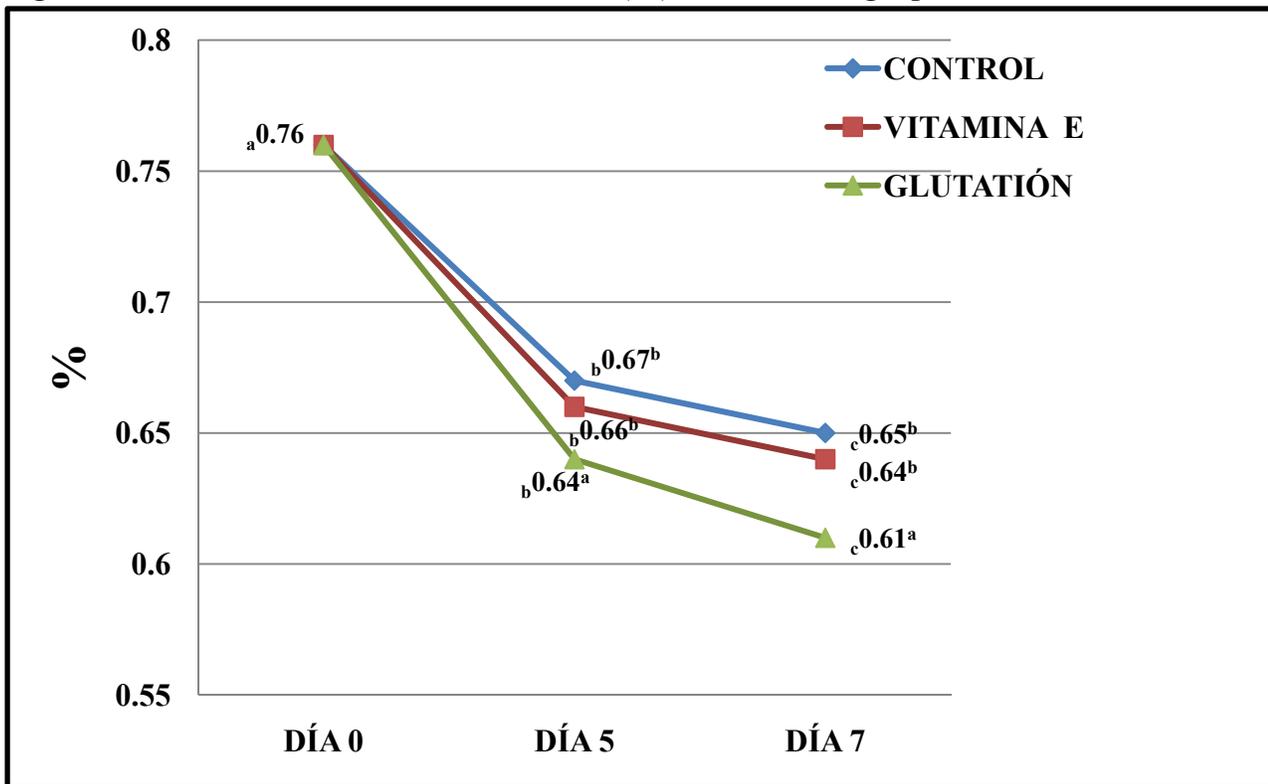
(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 40 se aprecian las diferencias en la valoración de WOB, aunque los resultados de los tres grupos lucen muy próximos unos de otros se constata una diferencia estadística ($p < 0.001$) entre el grupo GSH y el resto de los grupos, no siendo así entre el grupo control y el grupo vitamina E en el día 5.

En el día 7 los valores siguen con la misma tendencia, pero de igual forma que en el día 5 se observa una diferencia estadística ($p < 0.001$) entre el grupo GSH y los demás grupos, en el caso de la comparación del grupo control con el grupo vitamina E no se aprecia una diferencia estadística. En todos los grupos, a partir del día 5 se constatan diferencias significativas ($p < 0.001$) entre los días del experimento.

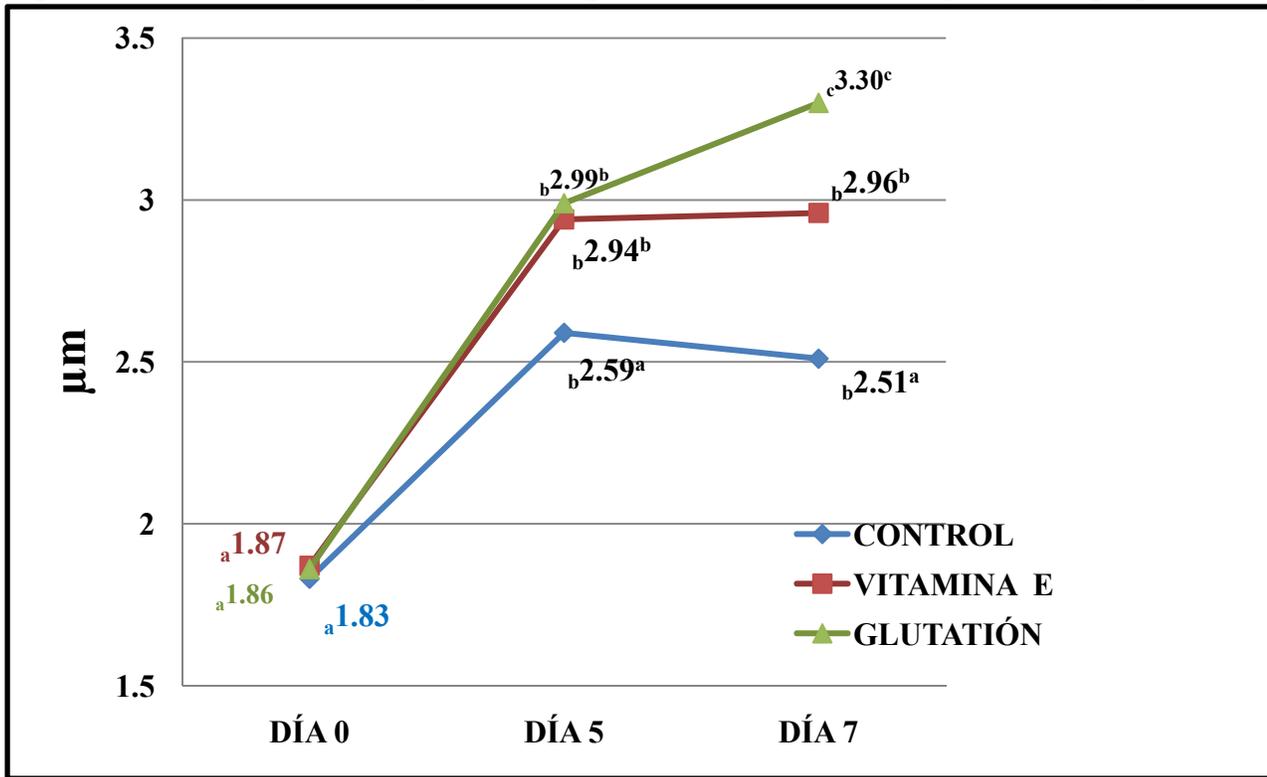
Figura 40. Diferencia del índice de oscilación (%) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

Para el parámetro ALH las comparaciones de los valores medios se observan en la figura 41, donde se puede apreciar en el día 5 una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el grupo control y los grupos que contienen antioxidante, lo que significa que los espermatozoides pertenecientes a los grupos con antioxidantes presentan un mayor vigor en relación al grupo control. En el día 7 la diferencia estadística ($p < 0.001$) aparece entre los tres grupos, mostrando un mayor vigor los espermatozoides pertenecientes al grupo GSH. Se incluye en la figura las diferencias entre los días del experimento en cada uno de los grupos.

Figura 41. Diferencia de la amplitud de desplazamiento de la cabeza (μm) entre grupos.

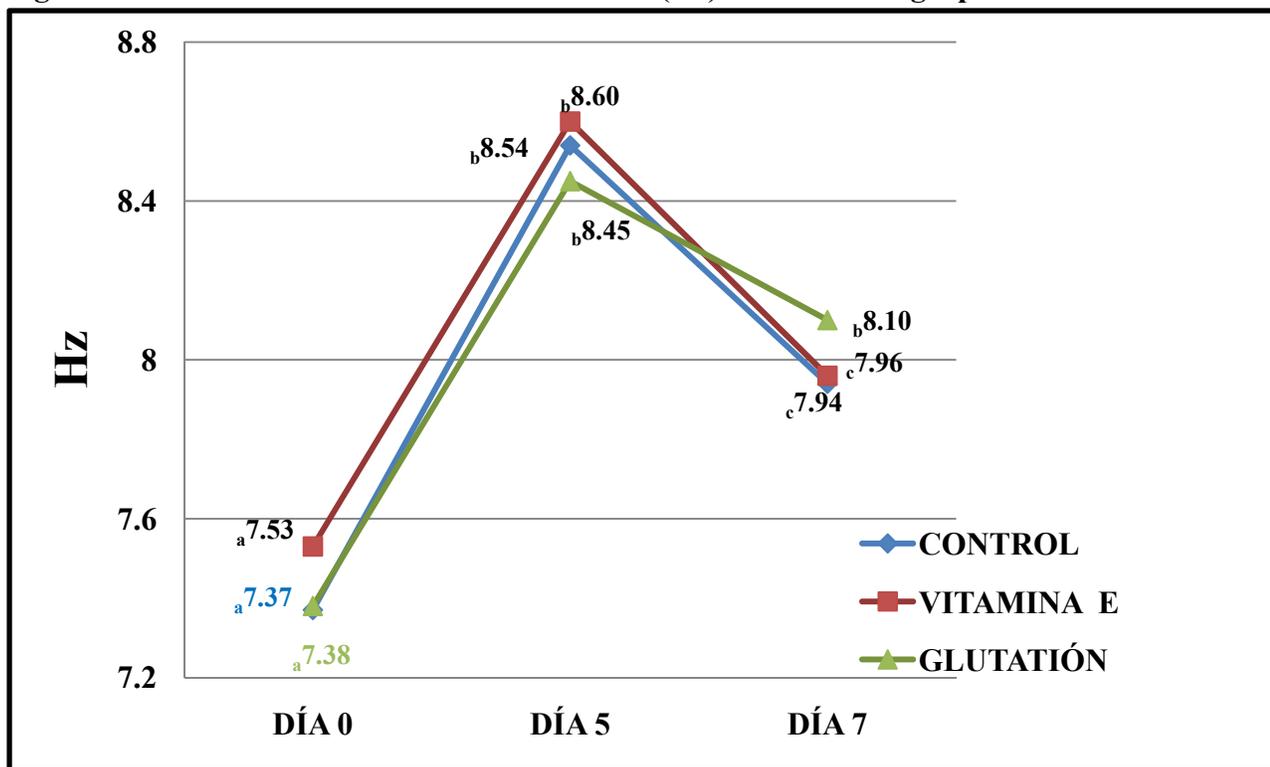


Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

Para el caso de BCF, que a semejanza de la ALH, es un indicador del vigor de las células espermáticas, no se constata ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre ninguno de los grupos, en ningún día de la refrigeración. En la comparación entre días del experimento se constata diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), en cada grupo.

Figura 42. Diferencia en la frecuencia de batido (Hz) entre los tres grupos.



No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados.

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

4.1.4 Efecto del Vitamina E y del Glutati3n reducido sobre la Peroxidaci3n Lip3dica.

Se muestra en la tabla 22 la evoluci3n de la PL a lo largo de la refrigeraci3n, se muestra la comparaci3n de los valores medios entre cada grupo a lo largo de los d3as de la incubaci3n, se ve reflejada la diferencia estad3sticamente significativa ($p < 0.001$) en cada caso. Las medias de los resultados se refieren a mmol TBARS/ 10^6 de espermatozoides presentes en la muestra analizada. Valores individualizados en las tablas 63, 64 y 65 de la secci3n de Anexos.

Tabla 22. Evoluci3n de la peroxidaci3n lip3dica (mmol TBARS/ 10^6) entre los tres grupos.

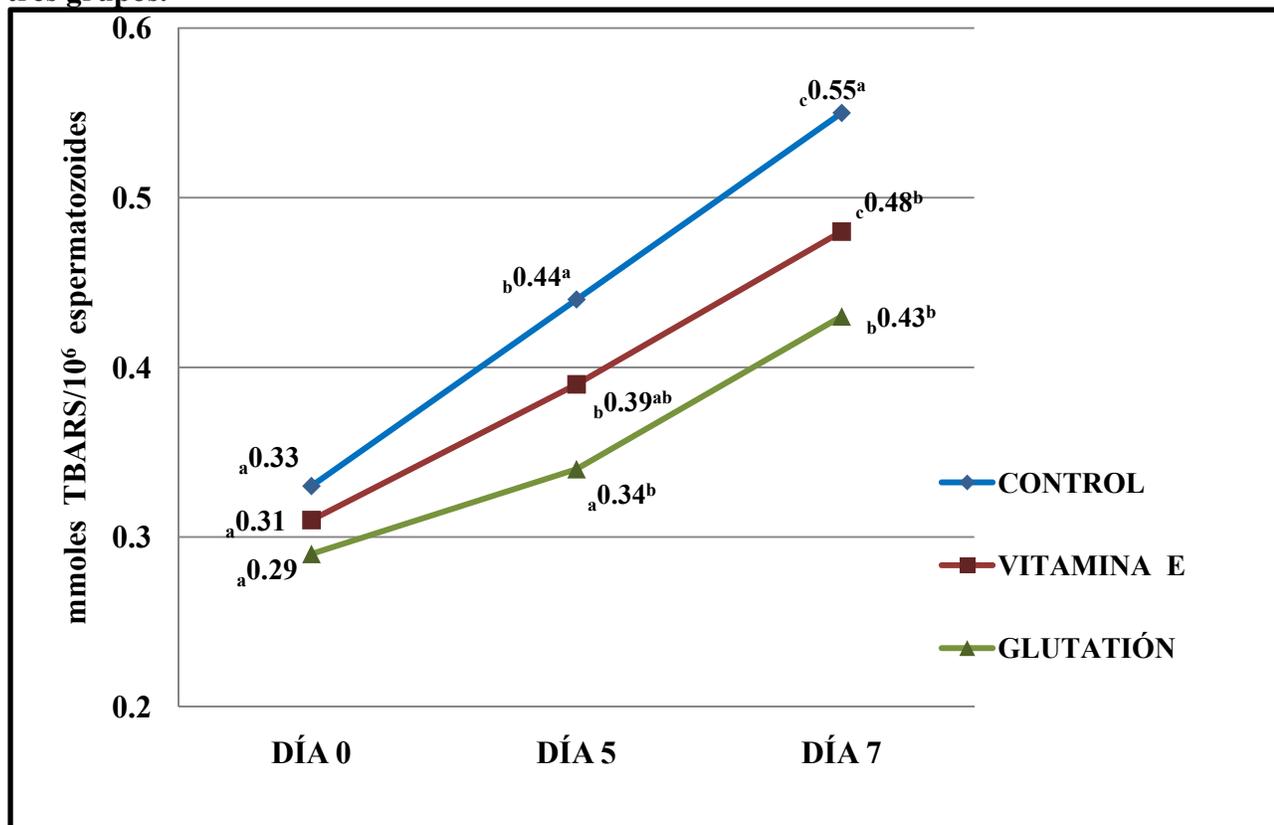
D3A	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATI3N		
	N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
0	10	^a 0,33	0,03	10	^a 0,31	0,06	10	^a 0,29	0,05
5	10	^b 0,44 ^a	0,05	10	^b 0,39 ^{ab}	0,06	10	^a 0,34 ^b	0,05
7	10	^c 0,55 ^a	0,04	10	^c 0,48 ^b	0,04	10	^b 0,43 ^b	0,06

Distinto super3ndice indica diferencia estad3sticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

Distinto sub3ndice indica diferencia estad3sticamente significativa entre los d3as del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 43 se aprecia claramente la diferencia entre los grupos analizados en cuanto a la valoraci3n de la PL; en dicha comparaci3n, se encuentra una diferencia estad3stica ($p < 0.001$) entre el grupo control y los grupos vitamina E y GSH, esta diferencia se observa de la misma manera tanto para el d3a 5 como para el d3a 7, mostrando siempre los mejores resultados, es decir, los valores mas bajos, el grupo GSH.

Figura 43. Diferencia de la peroxidación lipídica (mmol TBARS/10⁶ espermatozoides) entre los tres grupos.

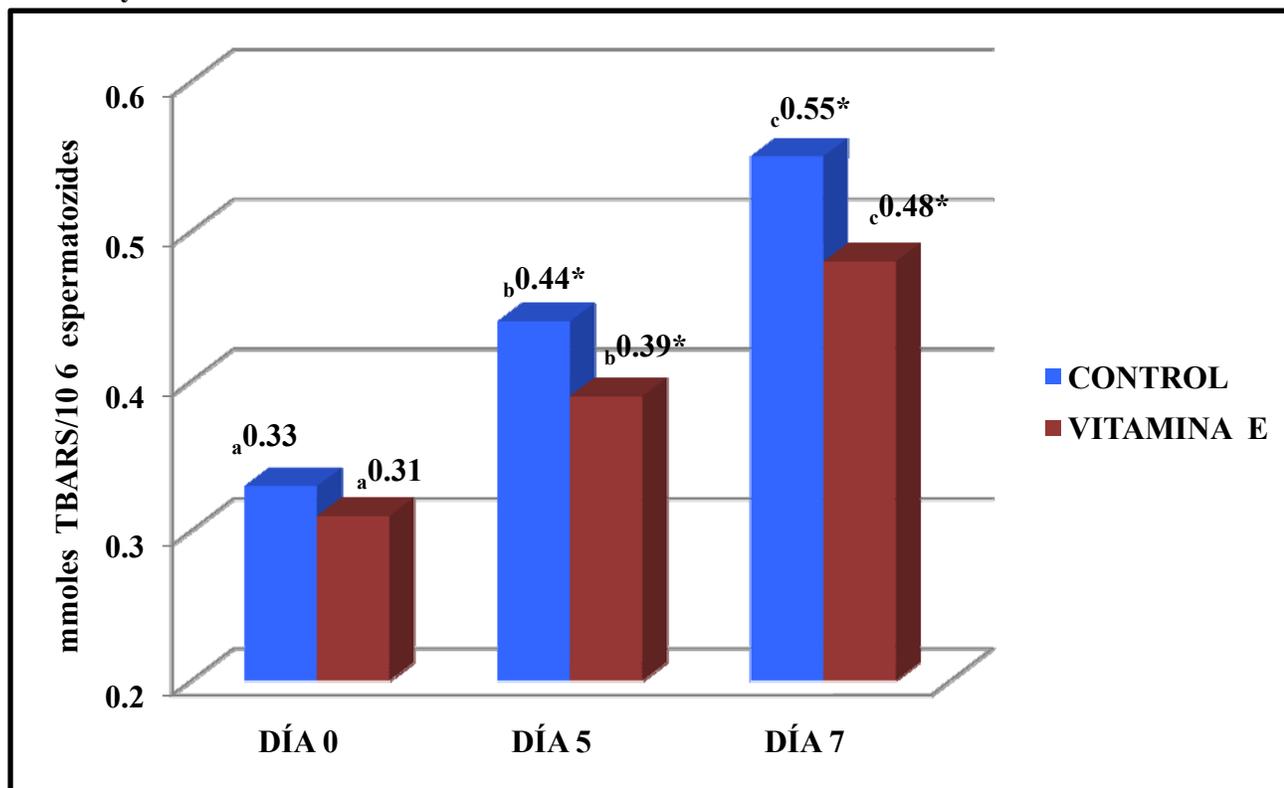


Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 44 se puede observar solo la comparación del grupo control con el Grupo vitamina E donde en el día 0 del experimento no se aprecia ninguna diferencia significativa, no siendo así para los días 5 y 7, donde la diferencia estadística es significativa ($p < 0.001$) en ambos días. Se aprecia una curva de ascenso similar en los dos grupos, solo que el grupo vitamina E se mantiene siempre por debajo de los valores medios del grupo control.

Figura 44. Diferencia de la peroxidación lipídica (mmol TBARS/10⁶ espermatozoides) entre Control y Vitamina E.

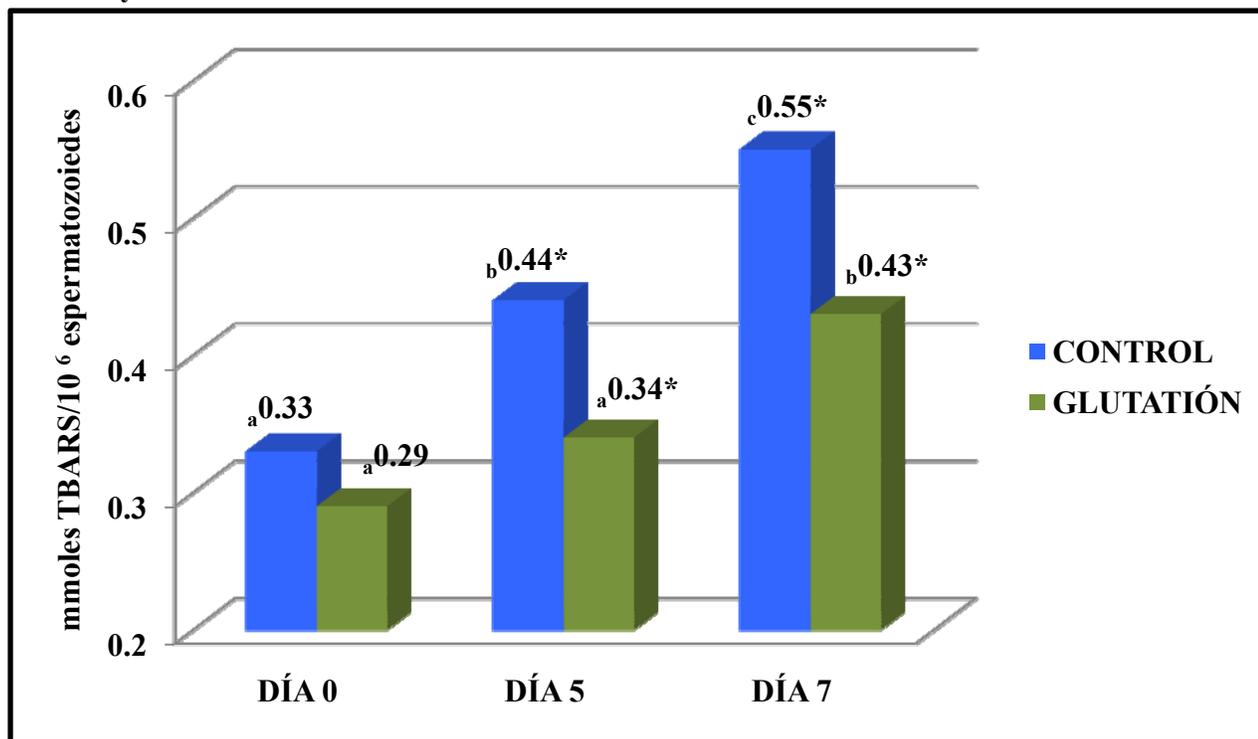


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y vitamina E ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En la figura 45 se observa la evolución de la PL en los grupos control y GSH, donde en el día 0 no se aprecia ninguna diferencia significativa, en cambio, en el día 5 y día 7 se observa una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el grupo GSH y el grupo control. También se aprecia la manera en que aumente la peroxidación en el caso del grupo control, lo cual lo hace de manera muy acentuada en los días 5 y 7, mientras que en el grupo GSH es menos pronunciada.

Figura 45. Diferencia de la peroxidación lipídica (mmol TBARS/10⁶ espermatozoides) entre Control y Glutación.

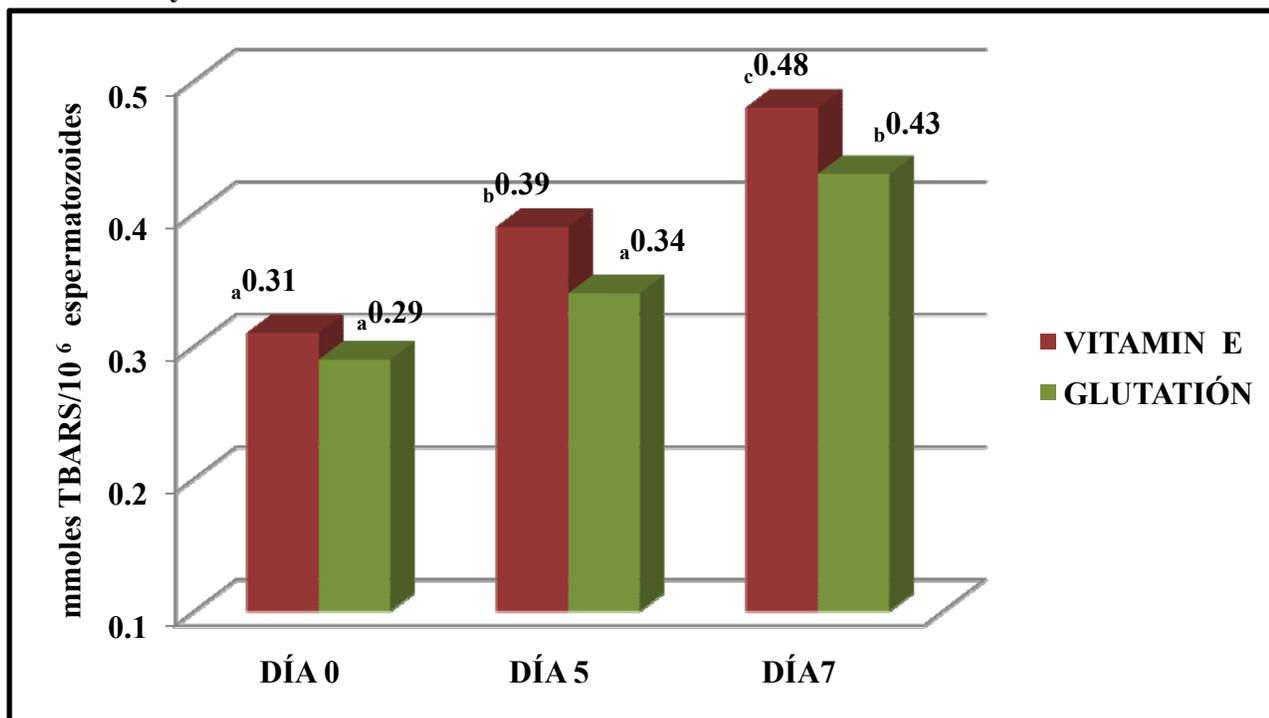


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y glutación ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento ($p < 0.001$).

En cuanto a la comparación de los valores medios de los grupos que contienen antioxidantes no se observa ninguna diferencia estadística ($p < 0.001$) entre ellos en ningún día de la valoración, aunque el grupo que muestra mejor respuesta ante la peroxidación fue el que contenía GSH, como se muestra en la figura 46.

Figura 46. Diferencia de la peroxidación lipídica (mmol TBARS/10⁶ espermatozoides) entre Vitamina E y Glutación.



No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre vitamina E y glutación.

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los días del experimento (p<0.001).

4.1.5 Correlaciones de Pearson entre la Peroxidación Lipídica y la Integridad de la membrana, Integridad del Acrosoma y la Movilidad.

En las tablas siguientes (23 a 31), se muestran las correlaciones de Pearson encontradas entre la peroxidación y los parámetros de calidad espermática valorados en este experimento, se observa una relación estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre los tres grupos analizados.

En las tablas 23, 24 y 25 se aprecia la correlación encontrada entre la integridad de la membrana de los espermatozoides y la PL, en cada uno de los grupos del experimento, la cual es significativa ($p < 0.01$) y negativa, esta correlación estuvo presente en todos los grupos analizados lo cual nos sugiere que el incremento en la presencia de PL aumenta el daño que se produce en la membrana plasmática durante la conservación. Se presentan coeficientes distintos en cada grupo pero todos manteniendo la correlación significativa y negativa.

Tabla 23. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la integridad de la membrana en el grupo Control.

		PEROXIDACIÓN	VITALIDAD
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,763*
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	30	30
VITALIDAD	Correlación de Pearson	-0,763*	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

Tabla 24. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la integridad de la membrana en el grupo Vitamina E.

		PEROXIDACIÓN	VITALIDAD
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,576*
	Sig. (bilateral)		0,001
	N	30	30
VITALIDAD	Correlación de Pearson	-0,576*	1
	Sig. (bilateral)	0,001	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

Tabla 25. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la integridad de la membrana en el grupo Glutión.

		PEROXIDACIÓN	VITALIDAD
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,545*
	Sig. (bilateral)		0,002
	N	30	30
VITALIDAD	Correlación de Pearson	-0,545*	1
	Sig. (bilateral)	0,002	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

En las tablas 26, 27 y 28 se recogen las correlaciones entre la presencia de PL y la integridad del acrosoma en cada uno de los grupos de este trabajo experimental, la correlación presenta una significación estadística ($p < 0.01$) de carácter negativo, lo que igual que en las tablas anteriores, nos hace pensar que la integridad del acrosoma se ve afectada directamente por la presencia de PL.

Tabla 26. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la integridad del acrosoma en el grupo Control.

		PEROXIDACIÓN	ACROSOMA
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,860*
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	30	30
ACROSOMA	Correlación de Pearson	-0,860*	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

Tabla 27. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la integridad del acrosoma en el grupo Vitamina E.

		PEROXIDACIÓN	ACROSOMA
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,662*
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	30	30
ACROSOMA	Correlación de Pearson	-0,662*	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

Tabla 28. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la integridad del acrosoma en el grupo Glutatión.

		PEROXIDACIÓN	ACROSOMA
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,753*
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	30	30
ACROSOMA	Correlación de Pearson	-0,753*	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

De la tabla 29 a la 31 se puede observar las correlaciones presentes entre la PL y la movilidad (%) en los grupos que contienen antioxidante y el grupo control, en donde se constata que dicha correlación es significativa ($p < 0.01$) y negativa para todos los casos, lo que hace notar la relación del daño producido por la PL y la disminución en el porcentaje de movilidad de las células espermáticas en conservación.

Tabla 29. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la movilidad en el grupo Control.

		PEROXIDACIÓN	MOVILIDAD
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,764*
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	30	30
MOVILIDAD	Correlación de Pearson	-0,764*	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

Tabla 30. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la movilidad en el grupo de la Vitamina E.

		PEROXIDACIÓN	MOVILIDAD
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,639*
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	30	30
MOVILIDAD	Correlación de Pearson	-0,639*	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

Tabla 31. Correlación de Pearson entre la peroxidación y la movilidad en el grupo Glutación.

		PEROXIDACIÓN	MOVILIDAD
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	1	-0,730*
	Sig. (bilateral)		0,000
	N	30	30
MOVILIDAD	Correlación de Pearson	-0,730*	1
	Sig. (bilateral)	0,000	
	N	30	30

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$)

4.2 EXPERIMENTO 2. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE VERRACO MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol/Glutatión reducido), Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

4.2.1 Efecto del análogo de la Vitamina E y del Glutatión reducido sobre la integridad de la membrana (vitalidad).

En la tabla 32 se pueden observar los resultados en la comparación de los valores medios de los tres grupos en esta analítica, en las distintas horas tras realizar la descongelación. En dicha tabla también se muestran las diferencias estadísticas ($p < 0.001$) para el caso de la comparación del grupo control con los grupos vitamina E y GSH. No se constata ninguna diferencia estadística en la comparación entre sí de los dos grupos que contienen antioxidantes en las horas 0, 1, 2, 3, para el caso de la hora 4 si se aprecia una diferencia estadística ($p < 0.001$) entre ellos. Aunque no se aprecia diferencia significativa entre el grupo GSH y el grupo vitamina E en la mayoría de las horas examinadas la tendencia en cuanto al mantenimiento de la integridad de la membrana fue mejor en el grupo GSH a lo largo de toda la incubación. También se muestran las diferencias constatadas entre las horas de la incubación en cada uno de los grupos. Los valores individualizados se refelejan en las tablas 66, 67, 68, 69 y 70 de la sección de Anexos.

Tabla 32. Evolución de la integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos.

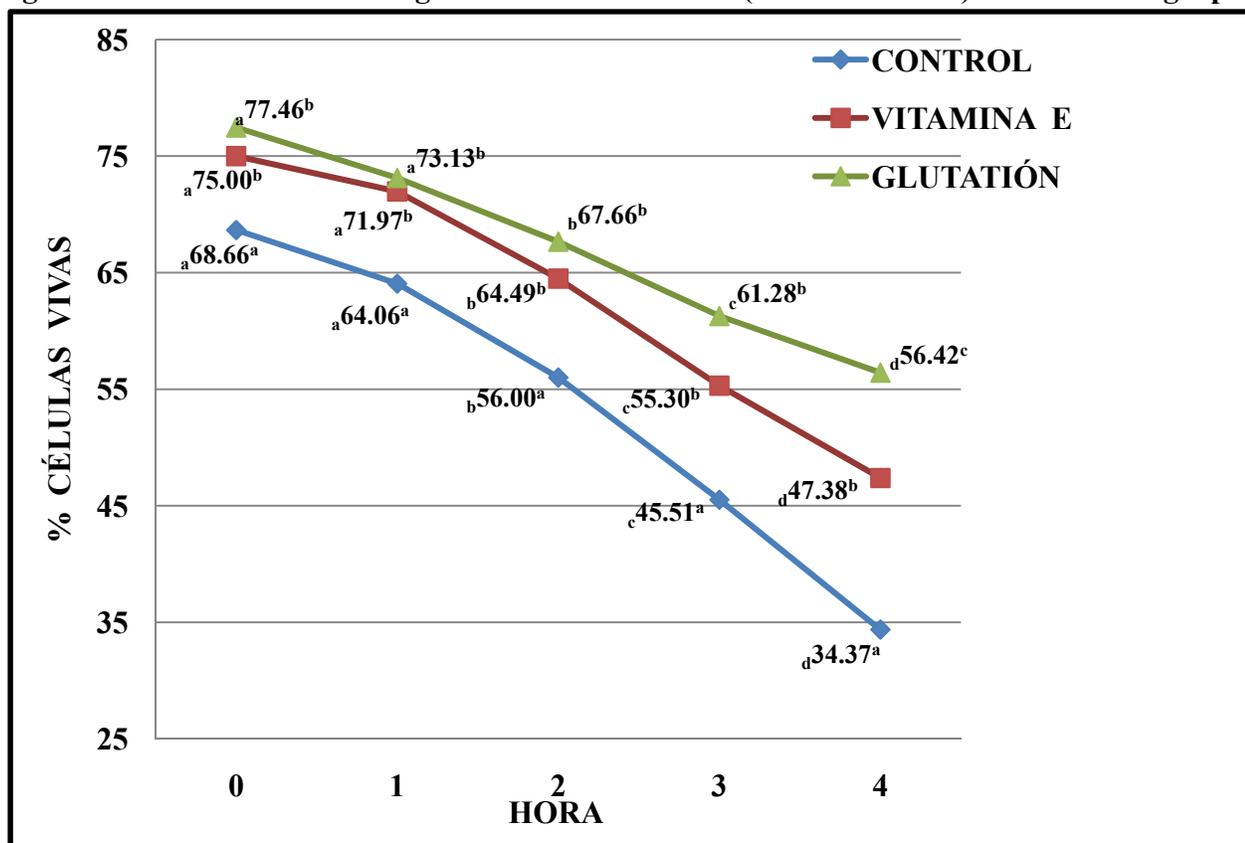
HORA	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
0	10	^a 68,66 ^a	8,25	10	^a 75,00 ^b	4,15	10	^a 77,46 ^b	2,49
1	10	^a 64,06 ^a	4,16	10	^a 71,97 ^b	3,39	10	^a 73,13 ^b	1,95
2	10	^b 56,00 ^a	7,13	10	^b 64,49 ^b	3,83	10	^b 67,66 ^b	3,70
3	10	^c 45,51 ^a	8,42	10	^c 55,30 ^b	7,61	10	^c 61,28 ^b	4,83
4	10	^d 34,37 ^a	7,08	10	^d 47,38 ^b	6,80	10	^d 56,42 ^c	4,28

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

4. Resultados

La figura 47 muestra de manera gráfica la diferencia entre los tres grupos analizados en este experimento, se puede observar que a lo largo de la prueba y como se ha mencionado anteriormente, el grupo que presenta un porcentaje más alto de células vivas, durante las 4 horas de incubación a 37°C, fue el que contenía GSH, también se aprecian las diferencias estadísticas entre las horas en los distintos grupos ($p < 0.001$).

Figura 47. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre los tres grupos.



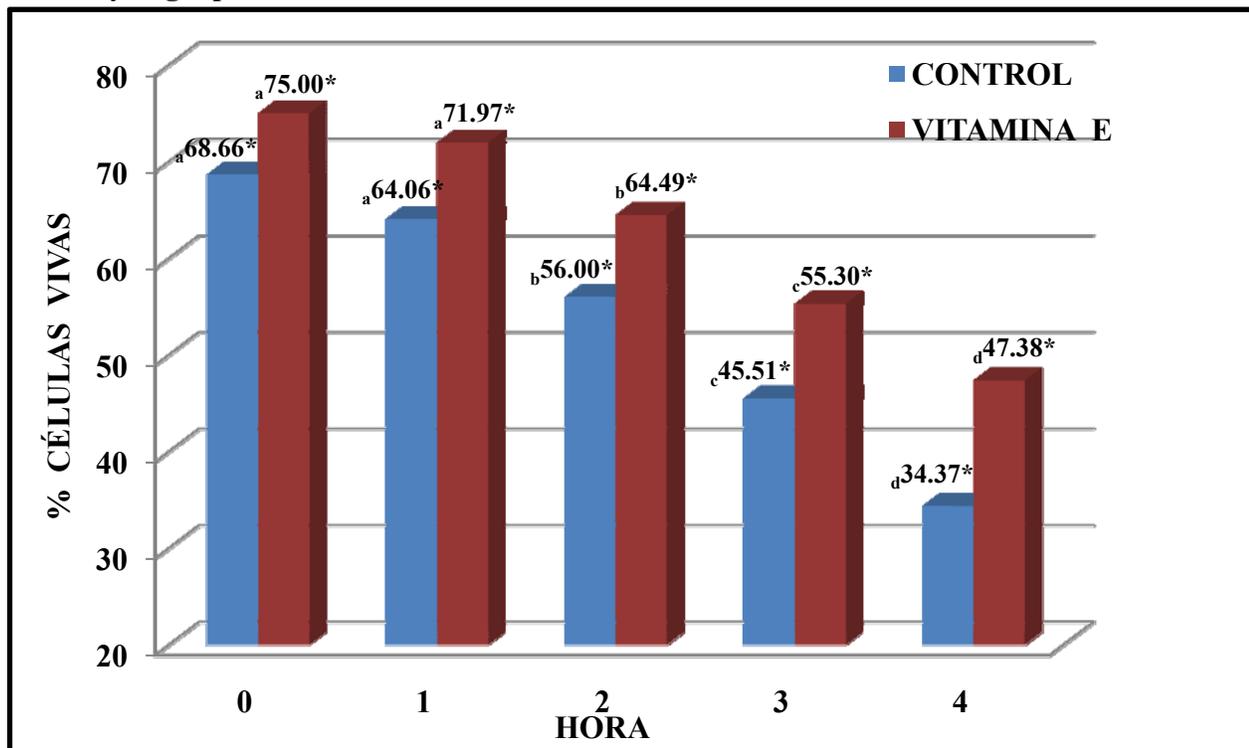
Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

4. Resultados

La figura 48 nos muestra la evolución del grupo control en comparación con el grupo vitamina E, se aprecia la diferencia estadística ($p < 0.001$), se observa claramente que la mejor respuesta se ha obtenido con el grupo vitamina E.

Figura 48. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y el grupo Vitamina E.

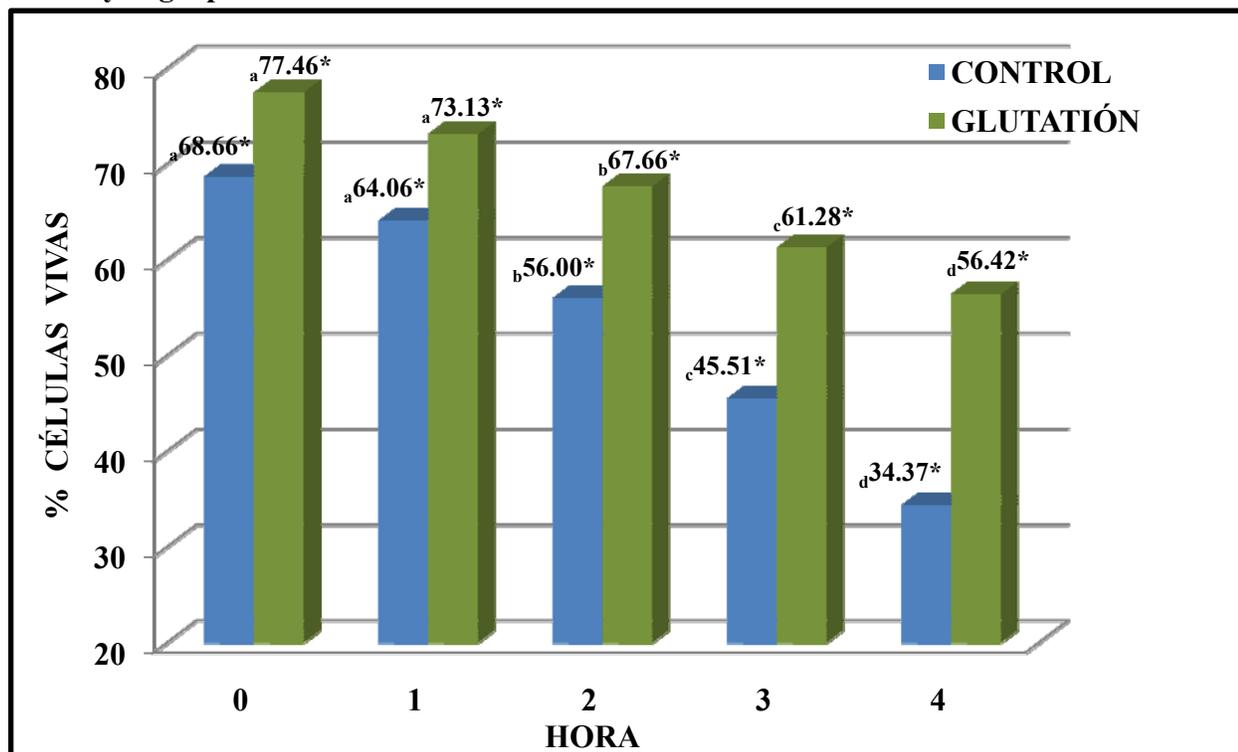


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y vitamina E ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

La figura 49 nos muestra la comparación gráfica del grupo control con el grupo GSH, de igual forma que en la imagen anterior se aprecia claramente que el grupo que contiene el antioxidante presenta un mejor comportamiento en cuanto a la protección de la membrana, reflejándose esto en la diferencia estadística ($p < 0.001$) obtenida.

Figura 49. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Control y el grupo Glutación.

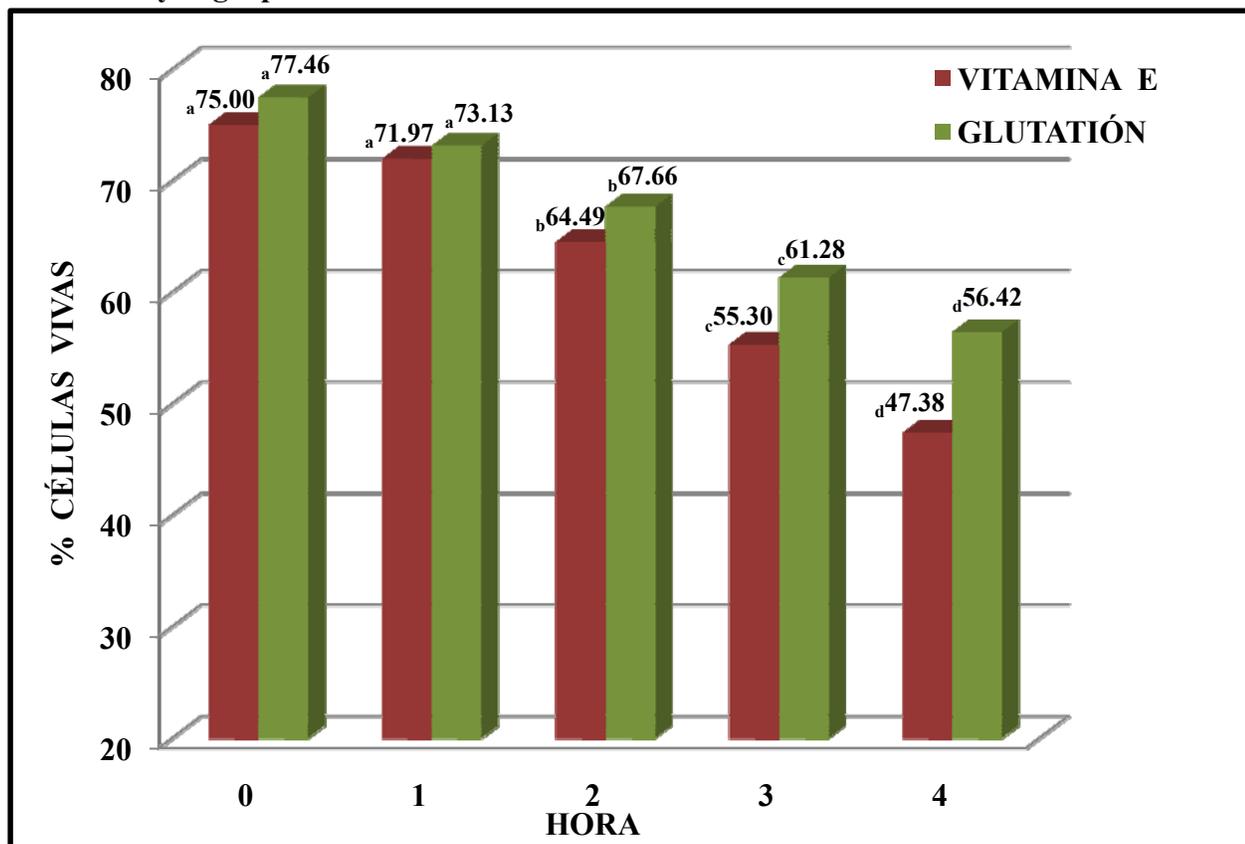


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y glutación ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

Para visualizar de mejor manera la diferencia entre los antioxidantes utilizados en esta prueba, la figura 50 nos muestra una comparación entre ellos, donde la única diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) se constata en la valoración realizada en la hora 4 de la incubación tras realizar la descongelación, a pesar que la diferencia estadística se presenta solo en la hora 4, podemos observar que de los dos antioxidantes el que mejor valores medios presenta a lo largo de la prueba es el GSH.

Figura 50. Diferencia de la integridad de la membrana (% células vivas) entre el grupo Vitamina E y el grupo Glutación.



(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre vitamina E y glutación ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

4.2.2 Efecto del análogo de la Vitamina E y del Glutatión reducido sobre la integridad del acrosoma.

En la tabla 33 se puede observar la evolución de los valores medios de los tres grupos evaluados en esta prueba, donde se aprecia una diferencia estadística ($p < 0.001$) entre el grupo control en comparación al grupo GSH dicha diferencia está presente en todas las horas de la incubación, mientras que para la comparación del grupo control con el grupo vitamina E solo se aprecia la diferencia estadística ($p < 0.001$) en las horas 2, 3 y 4; en la comparación del grupo vitamina E con el grupo GSH solo se aprecia una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la hora 2, no se constata ninguna diferencia estadísticamente significativa en el resto de las horas entre los grupos que contenían antioxidantes, aunque la tendencia de los resultados del grupo GSH muestran valores superiores a lo largo de toda la incubación. También se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre las horas de la incubación en cada grupo. Los valores individualizados se presentan en las tablas 71, 72, 73, 74 y 75 del apartado de Anexos.

Tabla 33. Evolución de la integridad del acrosoma (% de acrosomas íntegros) entre los tres grupos.

HORA	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
0	10	^a 85,12 ^a	4,96	10	^a 88,03	2,96	10	^a 91,10 ^b	2,93
1	10	^b 70,53 ^a	16,98	10	^a 83,29	3,77	10	^a 86,77 ^b	3,65
2	10	^b 69,21 ^a	3,46	10	^b 75,18 ^b	3,90	10	^b 80,71 ^c	3,51
3	10	^b 61,52 ^a	5,21	10	^b 71,48 ^b	6,48	10	^b 76,14 ^b	3,96
4	10	^c 52,85 ^a	8,52	10	^c 63,43 ^b	5,89	10	^c 69,38 ^b	4,77

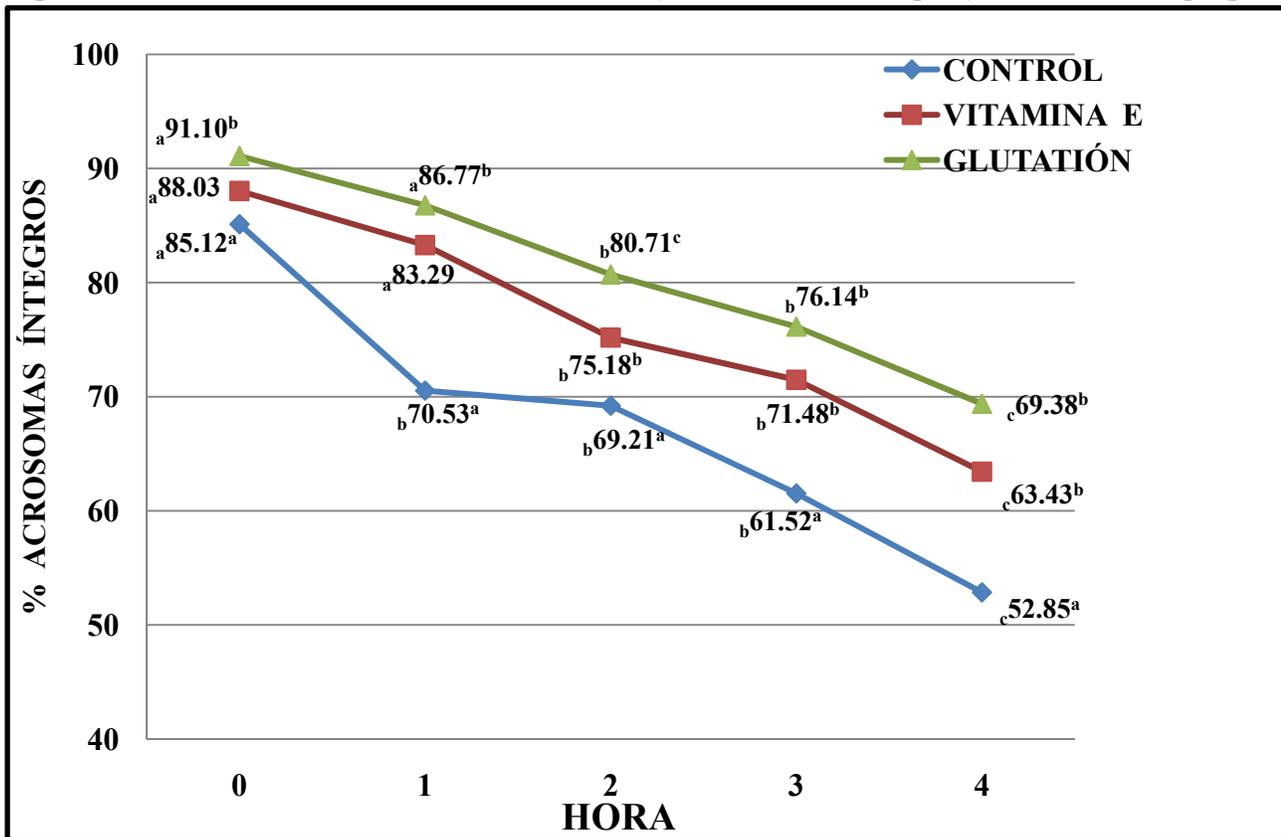
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

4. Resultados

En la figura 51 se muestra la evolución gráfica de la comparación de los valores medios entre los tres grupos, donde observamos que la mejor respuesta se obtiene con el grupo que contiene GSH, pues se aprecia una diferencia estadística ($p < 0.001$) entre ellos. En el caso del grupo vitamina E solo presenta diferencia estadística ($p < 0.001$) con el grupo control en las horas 2, 3 y 4. Aunque entre los grupos vitamina E y GSH no se aprecia ninguna diferencia estadística, podemos ver claramente en la grafica que los valores medios más altos se obtuvieron en el grupo que contiene GSH.

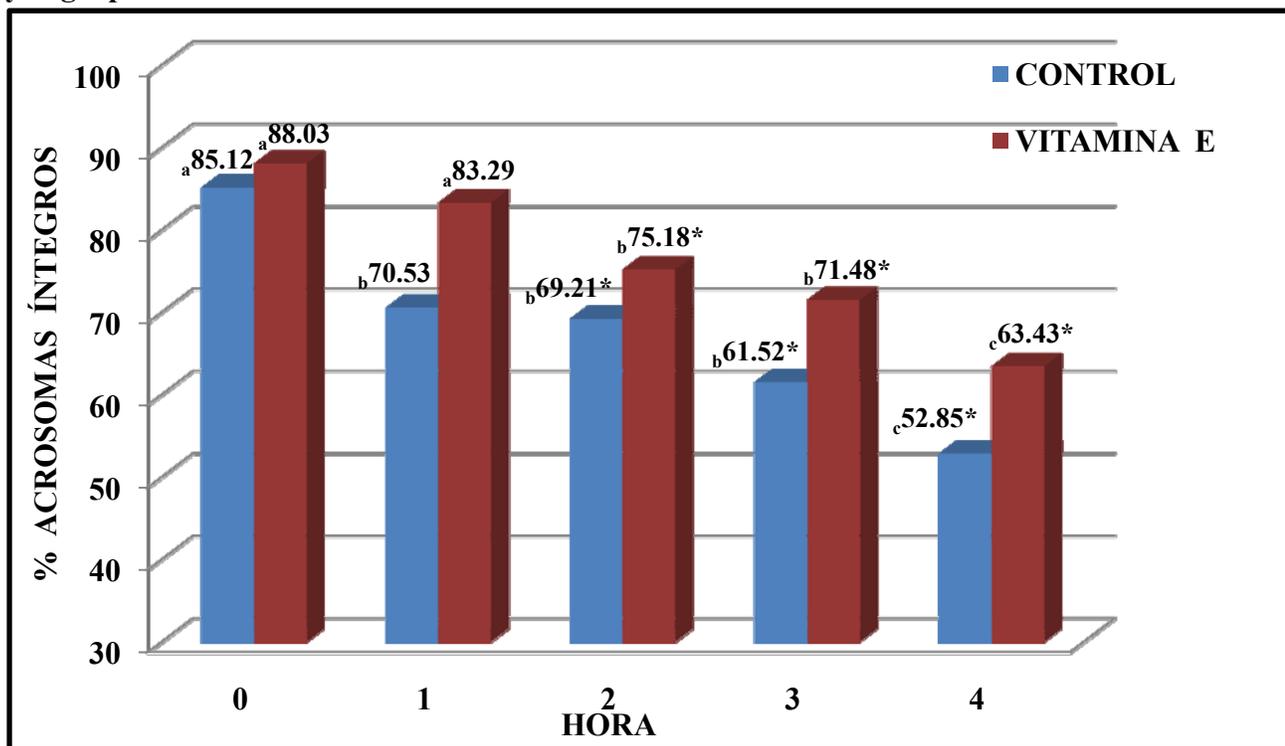
Figura 51. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre los tres grupos.



Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).
Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

La figura 52 nos muestra de manera individualizada la comparación de los valores medios obtenidos para el grupo control y el grupo vitamina E, donde podemos apreciar que solo a partir de la hora 2 se aprecia diferencia estadística ($p < 0.001$), aunque, el porcentaje de acrosomas íntegros es siempre superior en el grupo que contiene vitamina E.

Figura 52. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y el grupo Vitamina E.

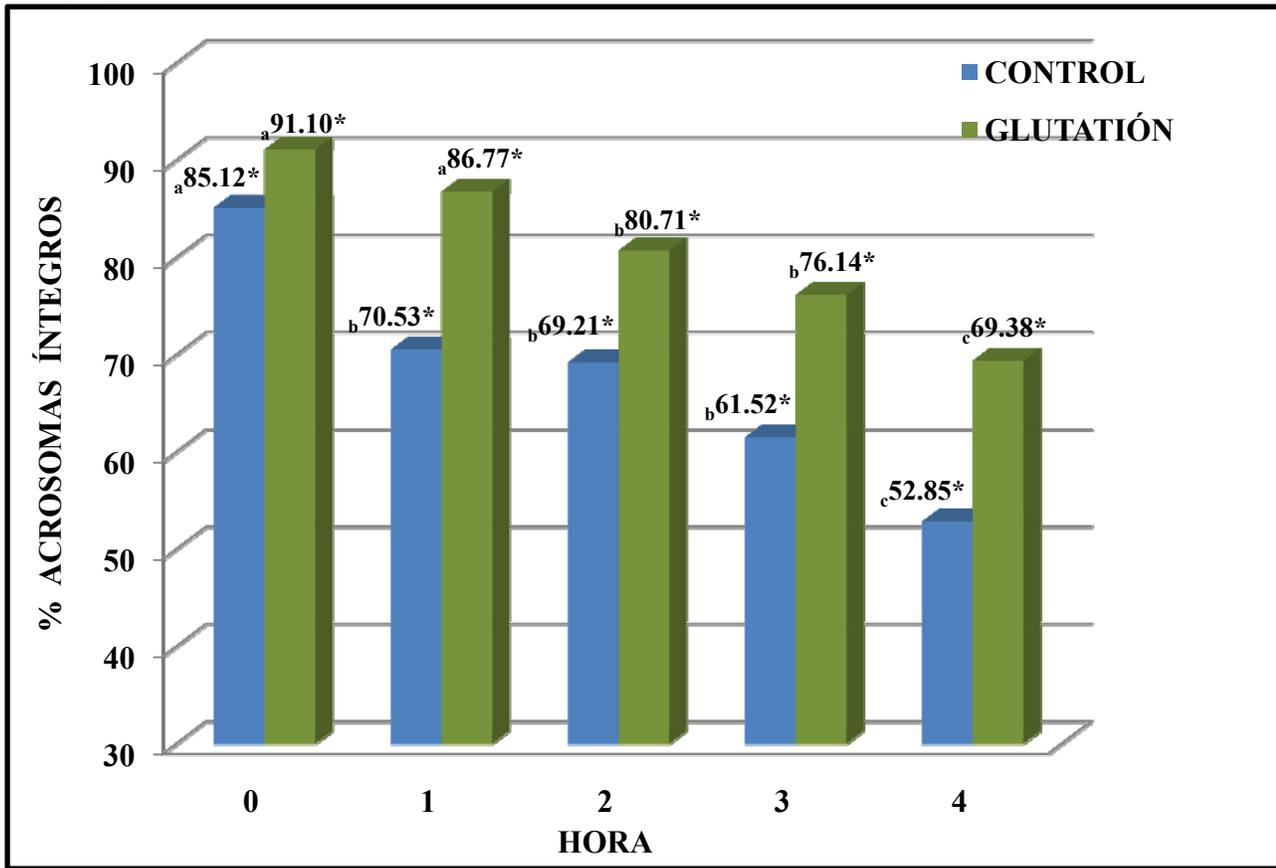


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y vitamina E ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

En la figura 53 se puede observar la diferencia, de manera gráfica, de los valores medios del grupo control en comparación del grupo GSH a lo largo de la incubación, se puede observar que a lo largo de todas las valoraciones se constata una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$), mostrando una clara respuesta positiva el grupo GSH con respecto al grupo que no contiene antioxidante, incrementándose dicha diferencia conforme pasan las horas tras haber descongelado el semen.

Figura 53. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y el grupo Glutación.

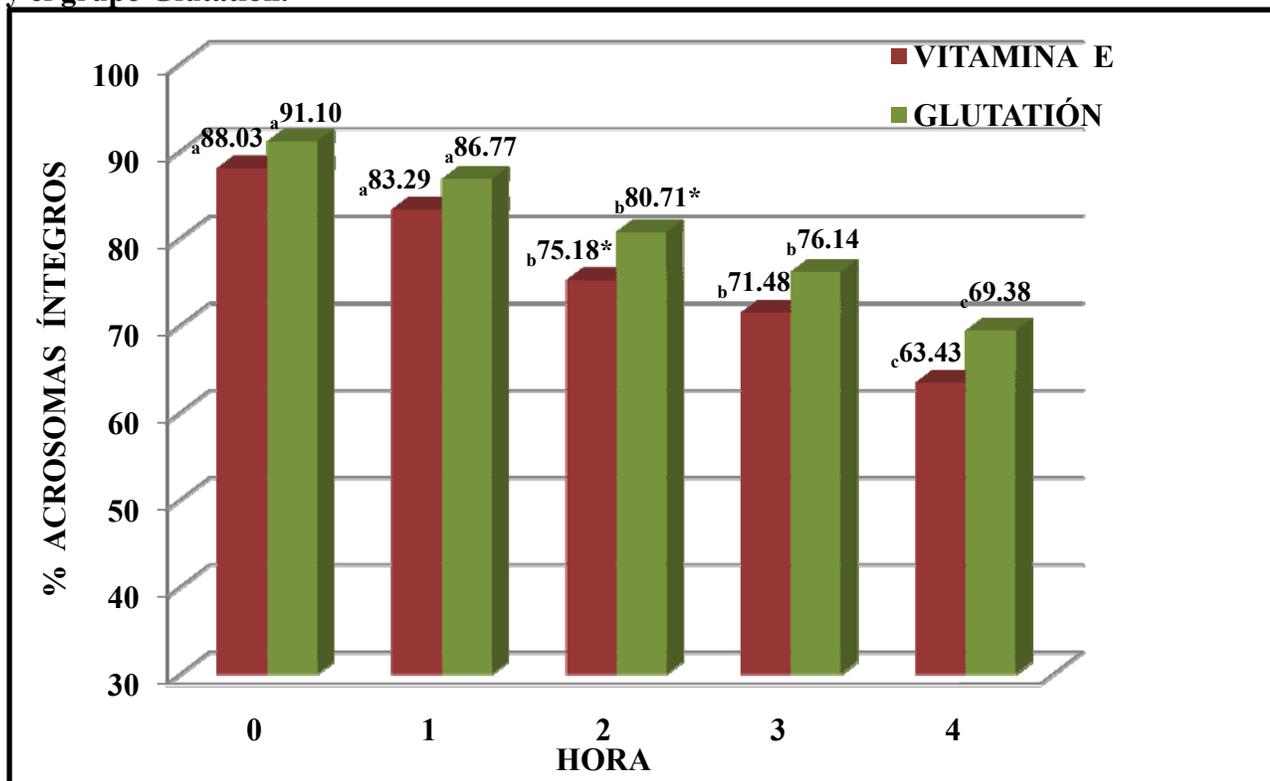


(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre control y glutación ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

En la figura 54 se aprecia la comparación de los valores medios del grupo vitamina E con el grupo GSH, donde se puede observar que la única diferencia estadística ($p < 0.001$) se constata en la hora 2 tras la descongelación, se puede ver que el grupo GSH muestra a lo largo de toda la prueba valores superiores en porcentaje de acrosomas íntegros en comparación al grupo vitamina E.

Figura 54. Diferencia del estado del acrosoma (% acrosomas íntegros) entre el grupo Control y el grupo Glutación.



(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre vitamina E y glutación ($p < 0.001$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

4.2.3 Efecto del análogo de la Vitamina E y del Glutati3n reducido sobre la movilidad espermática.

En la tabla 34 se puede observar la comparaci3n de los resultados entre los grupos analizados en esta prueba, en la cual no se aprecia ninguna diferencia estadisticamente significativa entre ninguno de los grupos, los valores medios de todos ellos como se puede observar en la tabla son muy similares, aunque los valores correspondientes para los grupos que contenían antioxidantes se muestran más altos que los valores para el grupo control, en relaci3n a los valores el grupo vitamina E con los valores del grupo GSH son muy similares, siendo solo superiores los valores medios del grupo vitamina E en el caso de la valoraci3n realizada para la hora 0, a partir de esta hora los valores más altos se registraron en el grupo GSH, lo que indica una tendencia por parte del GSH a mejorar la movilidad del semen descongelado. También se muestran las diferencias estadísticas ($p < 0.001$), entre las horas de la incubaci3n en cada grupo. Los valores individualizados se encuentran en las tablas 76, 77, 78, 79 y 80 del apartado de Anexos.

Tabla 34. Evoluci3n de la movilidad (% total) entre los tres grupos.

HORA	CONTROL			VITAMINA E			GLUTATI3N		
	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
0	10	^a 48,77	21,57	10	^a 56,18	15,32	10	^a 51,07	2,93
1	10	^b 23,57	13,51	10	^b 31,09	14,59	10	^{ab} 32,04	3,65
2	10	^b 22,15	14,18	10	^b 22,23	13,64	10	^b 24,86	3,51
3	10	^b 17,20	13,22	10	^b 21,94	13,07	10	^b 20,55	3,96
4	10	^b 13,29	9,64	10	^b 16,19	12,92	10	^b 21,65	4,77

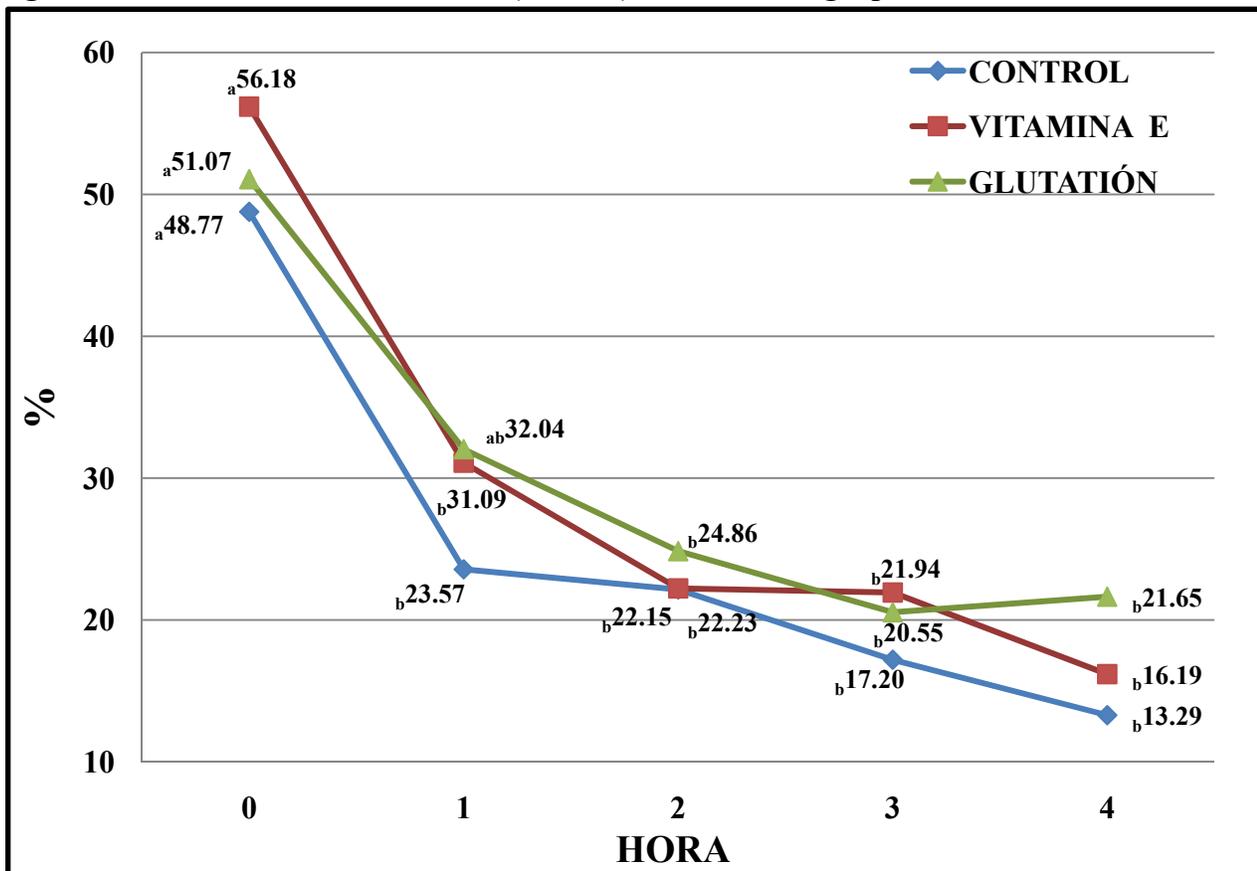
No se encuentra ninguna diferencia estadística significativa entre los grupos analizados.

Distinto subíndice indica diferencia estadisticamente significativa entre horas de la incubaci3n ($p < 0.001$).

4. Resultados

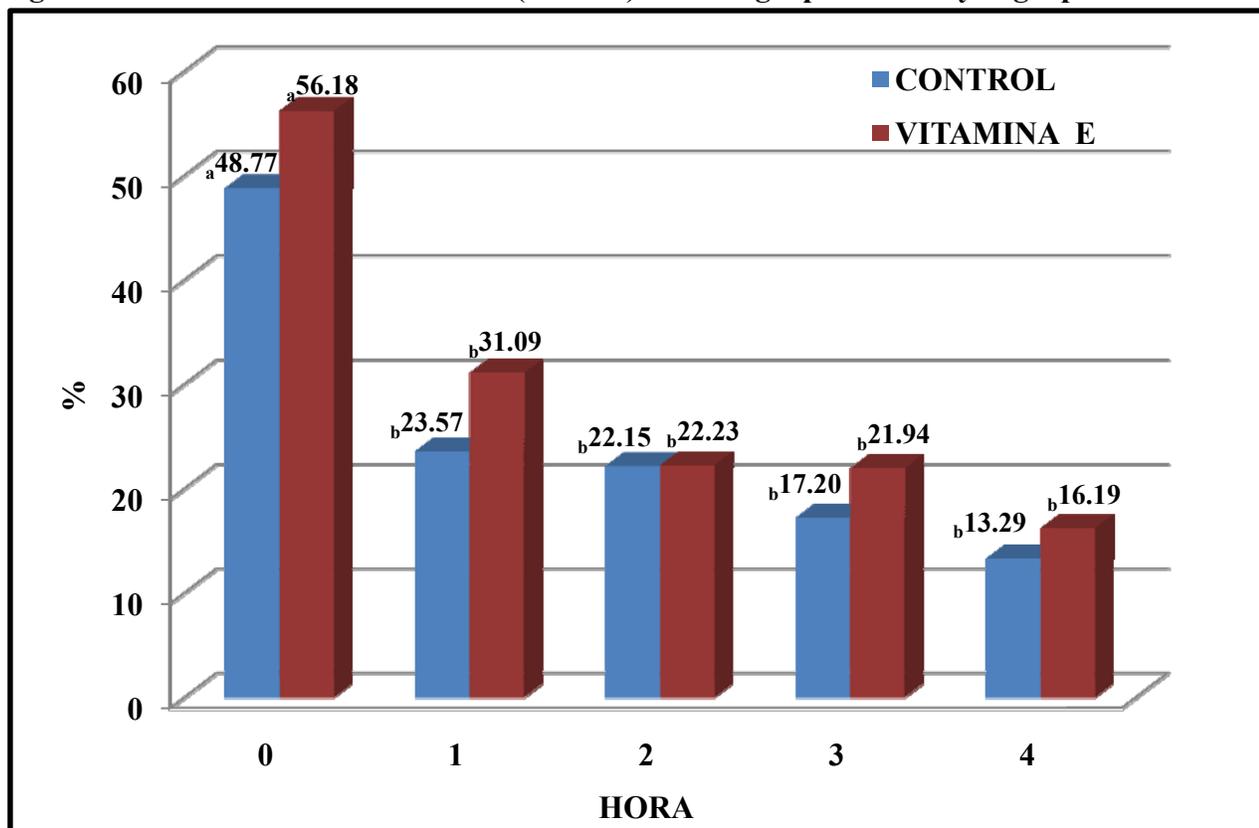
En la figura 55 se observa que no existe ninguna diferencia estadística entre ninguno de los grupos experimentales, además se puede observar que a partir de la hora 1 tras la descongelación el porcentaje de movilidad descende de manera muy acusada en los tres grupos, y aunque no existe diferencia significativa, se puede apreciar que los grupos que contienen antioxidantes muestran valores más altos. En las figuras 55, 56, 57 y 58 se aprecia la comparación de los valores medios del grupo control de manera separada con los grupos vitamina E y GSH, igualmente que en las pruebas anteriores los mejores resultados corresponden al antioxidante GSH. No se aprecia ninguna diferencia estadísticamente significativa aunque la tendencia de los grupos que contienen antioxidantes es hacia el mejoramiento de la movilidad, y especialmente el grupo GSH, pues en él se aprecian valores más altos en cuanto a porcentaje de movilidad en comparación a los demás grupos.

Figura 55. Diferencia en la movilidad (% total) entre los tres grupos.



No se encuentra ninguna diferencia estadística significativa entre los grupos analizados. Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

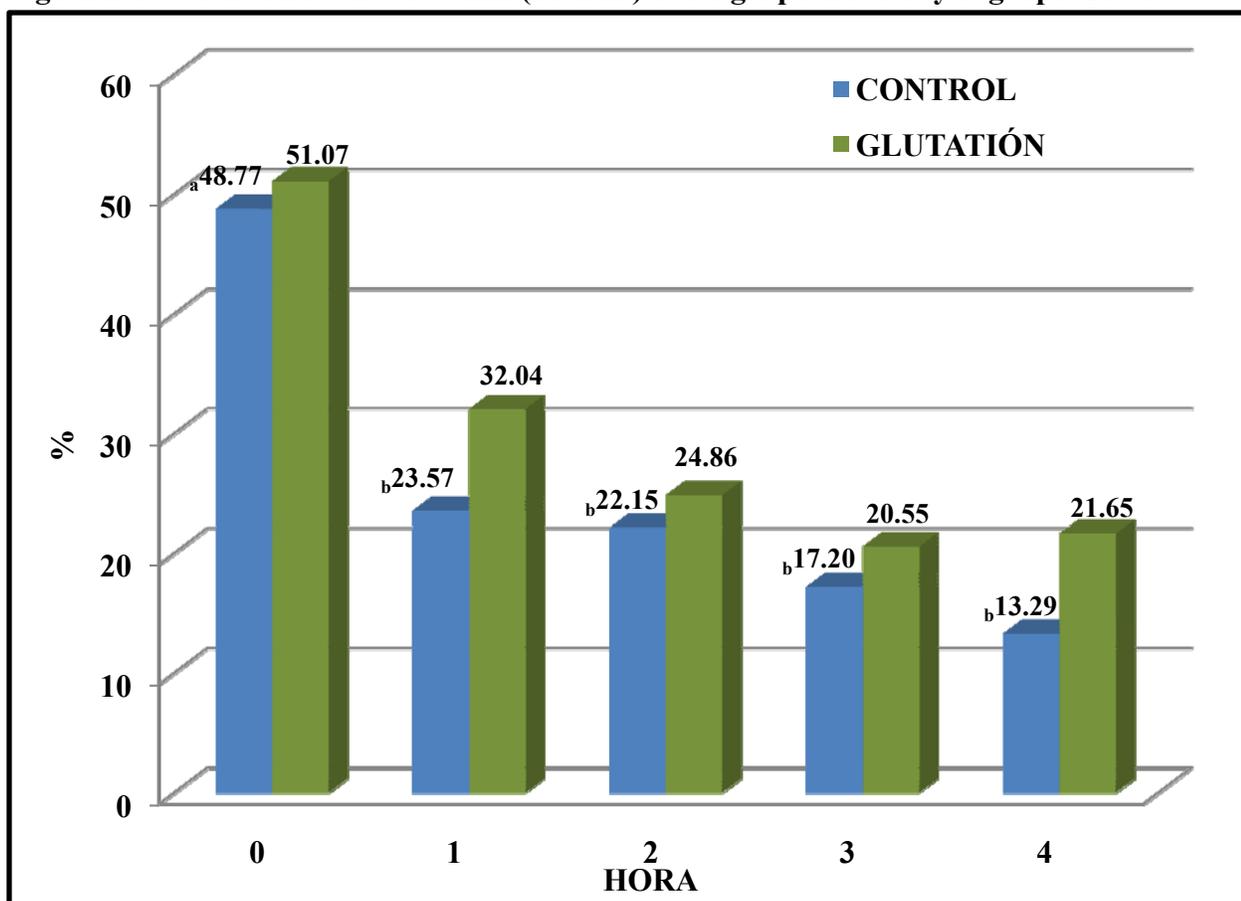
Figura 56. Diferencia en la movilidad (% total) entre el grupo Control y el grupo Vitamina E.



No se encuentra ninguna diferencia estadística significativa entre control y vitamina E.

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de incubación ($p < 0.001$).

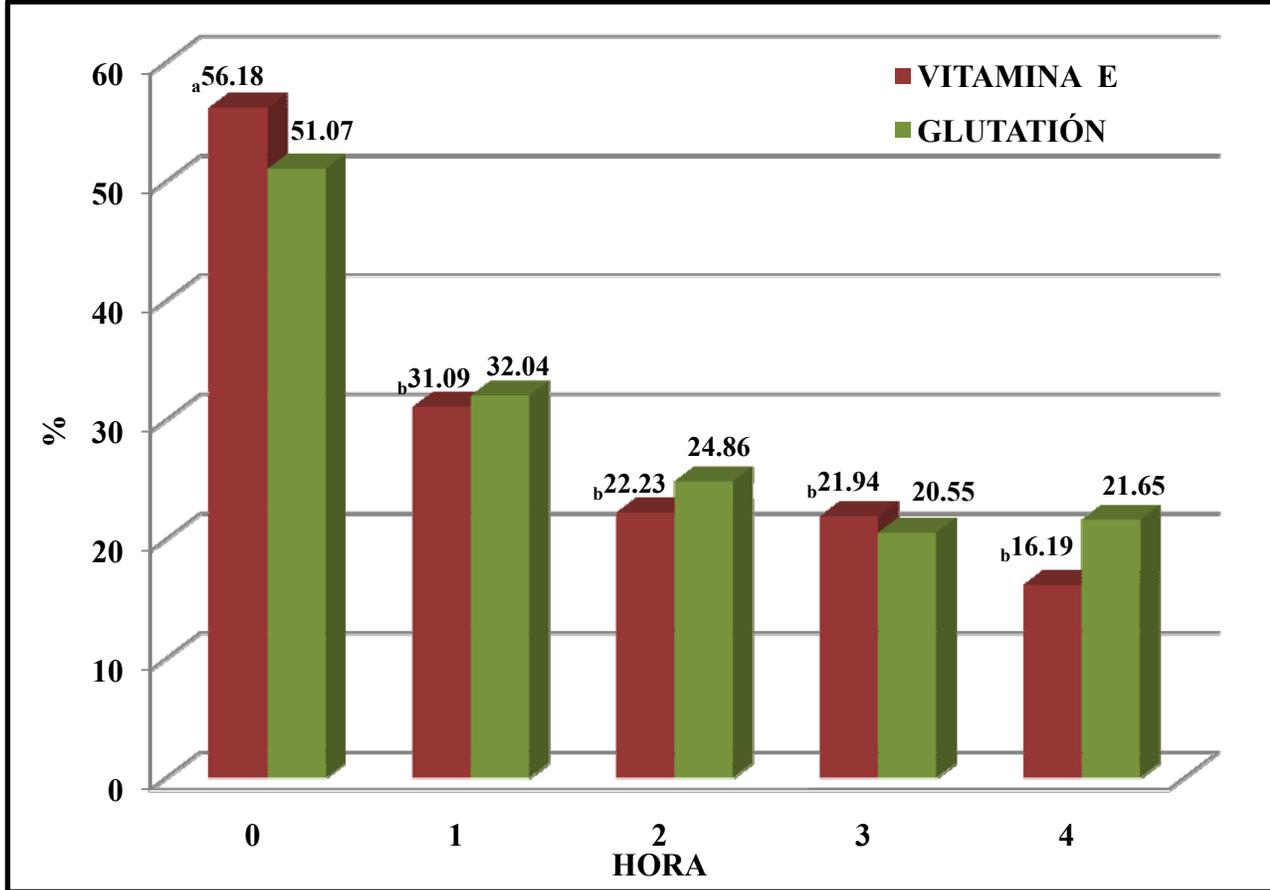
Figura 57. Diferencia en la movilidad (% total) entre grupo Control y el grupo GSH.



No se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa entre control y glutatión.

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de incubación ($p < 0.001$).

Figura 58. Diferencia en la movilidad (% total) entre el grupo Vitamina E y el grupo Glutación.



No se encuentra ninguna diferencia estadística significativa entre vitamina E y glutación. Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.001$).

Las tablas 34 a 38 muestran los resultados de la valoración de los parámetros cinéticos medidos por el programa informático (CASA), en ellas se expresan los valores medios obtenidos en cada una de las horas en las que se miden dichos parámetros, también se muestra según sea el caso la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) obtenida.

Para el caso de la tabla 35, en ella se muestran los valores comparados entre los tres grupos, específicamente de la hora 0, en la que se aprecia una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo GSH y los grupos control y vitamina E para los parámetros VCL, VSL, LIN, STR y ALH, parámetros que se refieren a la distancia total recorrida por el espermatozoide (VCL) y al vigor de la célula espermática (ALH), lo que denota un buen estado de la membrana mitocondrial del espermatozoide promovida por los antioxidantes. En cuanto a VAP solo se aprecia diferencia estadística ($p < 0.05$) entre el grupo control y el grupo GSH, y en el caso de WOB y BCF

4. Resultados

no existe ninguna diferencia en ninguno de los grupos analizados. Los valores individualizados se encuentran en las tablas 81 y 82 de la sección de Anexos.

Tabla 35. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 0 tras la descongelación.

		CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
		N	Media	S.D	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
HORA 0	VCL ($\mu\text{m/s}$)	1804	68,06 ^a	34,56	1909	68,95 ^a	35,06	1867	73,46 ^b	38,32
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	1804	43,99 ^a	28,89	1909	44,99 ^a	29,88	1867	48,32 ^b	30,31
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	1804	54,67 ^a	30,48	1909	55,50 ^{ab}	30,74	1867	58,73 ^b	31,74
	LIN (%)	1804	0,61 ^a	0,25	1909	0,61 ^a	0,25	1867	0,64 ^b	0,24
	STR (%)	1804	0,76 ^a	0,23	1909	0,76 ^a	0,23	1867	0,79 ^b	0,22
	WOB (%)	1804	0,77	0,17	1909	0,78	0,16	1867	0,79	0,16
	ALH (μm)	1804	2,20 ^a	1,19	1909	2,23 ^a	1,22	1867	2,39 ^b	1,40
	BCF (Hz)	1804	7,12	2,95	1909	7,12	3,13	1867	7,25	3,06

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).

La tabla 36 muestra los resultados de los parámetros medidos por el sistema CASA en la hora 1, también se muestran las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) constatadas, en el caso de VCL, VSL, VAP y ALH la cual se aprecia entre el grupo GSH y los grupos control y vitamina E. En el caso de LIN, STR y WOB no se encuentra ninguna diferencia estadística entre ningún grupo y para el caso de BCF la diferencia estadística ($p < 0.05$) se presenta entre los tres distintos grupos. Los valores individualizados se encuentran en las tablas 83 y 84 de la sección de anexos.

Tabla 36. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 1 tras la descongelación.

		CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
		N	Media	S.D.	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
HORA 1	VCL ($\mu\text{m/s}$)	1407	42,21 ^a	30,28	1481	43,22 ^a	27,05	1534	54,39 ^b	30,98
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	1407	31,14 ^a	27,14	1481	31,39 ^a	25,13	1534	39,44 ^b	28,70
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	1407	35,91 ^a	27,91	1481	36,96 ^a	25,78	1534	46,26 ^b	29,67
	LIN (%)	1407	0,66	0,27	1481	0,65	0,27	1534	0,66	0,27
	STR (%)	1407	0,78	0,23	1481	0,78	0,23	1534	0,79	0,22
	WOB (%)	1407	0,81	0,18	1481	0,81	0,17	1534	0,81	0,18
	ALH (μm)	1407	1,37 ^a	0,77	1481	1,36 ^a	0,67	1534	1,56 ^b	0,81
	BCF (Hz)	1407	6,40 ^a	3,41	1481	7,01 ^b	3,34	1534	7,56 ^c	03,17

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).

La tabla 37 recoge los resultados de los parámetros cinéticos en la hora 2 donde podemos observar que no se aprecia ninguna diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los tres grupos analizados en esta prueba. Se aprecia que los valores medios de cada unos de los parámetros son muy similares entre grupos y en parámetros como VCL y BCF que hacer referencia a distancia recorrida y vigorosidad respectivamente en el primero el valor más alto lo tiene el grupo GSH y en el caso del segundo el valor más alto le pertenece al grupo control. Por otra parte en el caso de los dos antioxidantes el grupo que contiene GSH presenta mejor comportamiento en los parámetros que expresan movimiento más recto, así como ganancia neta de espacio y rapidez. (VCL, VSL y VAP). En las tablas 85 y 86 de la sección de anexos, se recogen los valores individualizados

Tabla 37. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 2 tras la descongelación.

		CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
		N	Media	S.D.	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
HORA 2	VCL ($\mu\text{m/s}$)	1382	39,89	24,74	1397	40,52	23,33	1408	41,27	26,09
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	1382	30,50	23,34	1397	30,61	20,93	1408	30,23	22,38
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	1382	34,76	23,89	1397	34,95	21,73	1408	35,29	23,86
	LIN (%)	1382	0,72	0,25	1397	0,71	0,26	1408	0,69	0,26
	STR (%)	1382	0,83	0,19	1397	0,82	0,20	1408	0,81	0,22
	WOB (%)	1382	0,84	0,17	1397	0,84	0,18	1408	0,83	0,17
	ALH (μm)	1382	1,20	0,60	1397	1,22	0,71	1408	1,26	0,71
	BCF (Hz)	1382	7,45	3,37	1397	7,42	3,61	1408	7,38	3,40

No se encuentra ninguna diferencia estadística significativa entre los grupos analizados.

En la tabla 38 se muestran los valores medios obtenidos en la valoración realizada en la hora 3 de los parámetros cinéticos después de la descongelación, donde también se aprecia la única diferencia estadística ($p < 0.05$), la cual se observa en la comparación de WOB, dicha diferencia se encuentra entre el grupo vitamina E y el resto de los grupos analizados. De la misma forma que ocurre en la hora anterior de la incubación los valores que denotan más rapidez, rectitud y distancia recorrida por los espermatozoides son los del grupo GSH. Los valores individualizados se recogen en las tablas 87 y 88 de la sección de Anexos.

Tabla 38. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 3 tras la descongelación.

		CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
		N	Media	S.D.	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
HORA 3	VCL (µm/s)	1278	39,12	23,07	1355	37,30	22,47	1380	40,75	26,34
	VSL (µm/s)	1278	28,53	20,46	1355	28,87	19,82	1380	30,29	21,12
	VAP (µm/s)	1278	33,44	22,04	1355	32,50	20,04	1380	34,99	23,22
	LIN (%)	1278	0,70	0,27	1355	0,73	0,25	1380	0,74	0,25
	STR (%)	1278	0,81	0,21	1355	0,84	0,20	1380	0,84	0,20
	WOB (%)	1278	0,82 ^a	0,20	1355	0,86 ^b	0,16	1380	0,85 ^a	0,17
	ALH (µm)	1278	1,21	0,69	1355	1,14	0,68	1380	1,24	0,84
	BCF (Hz)	1278	7,26	3,43	1355	7,31	3,38	1380	7,53	3,29

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).

En tabla 39 se aprecian los resultados de los parámetros cinéticos evaluados en la hora 4 después de la descongelación, también se aprecian las diferencias estadísticas ($p < 0.05$) encontradas en la prueba, siendo así en el caso de VCL, VSL y VAP entre el grupo GSH y los demás grupos analizados, para el caso de WOB la diferencia estadística ($p < 0.05$) se encuentra entre el grupo vitamina E y el grupo GSH, para ALH entre el grupo control y el grupo GSH, y para LIN, STR y BCF no se constata ninguna diferencia estadísticamente significativa. Los valores individualizados se encuentran en las tablas 89 y 90 de la sección de Anexos.

Tabla 39. Evolución de los parámetros cinéticos entre los tres grupos en la hora 4 tras la descongelación.

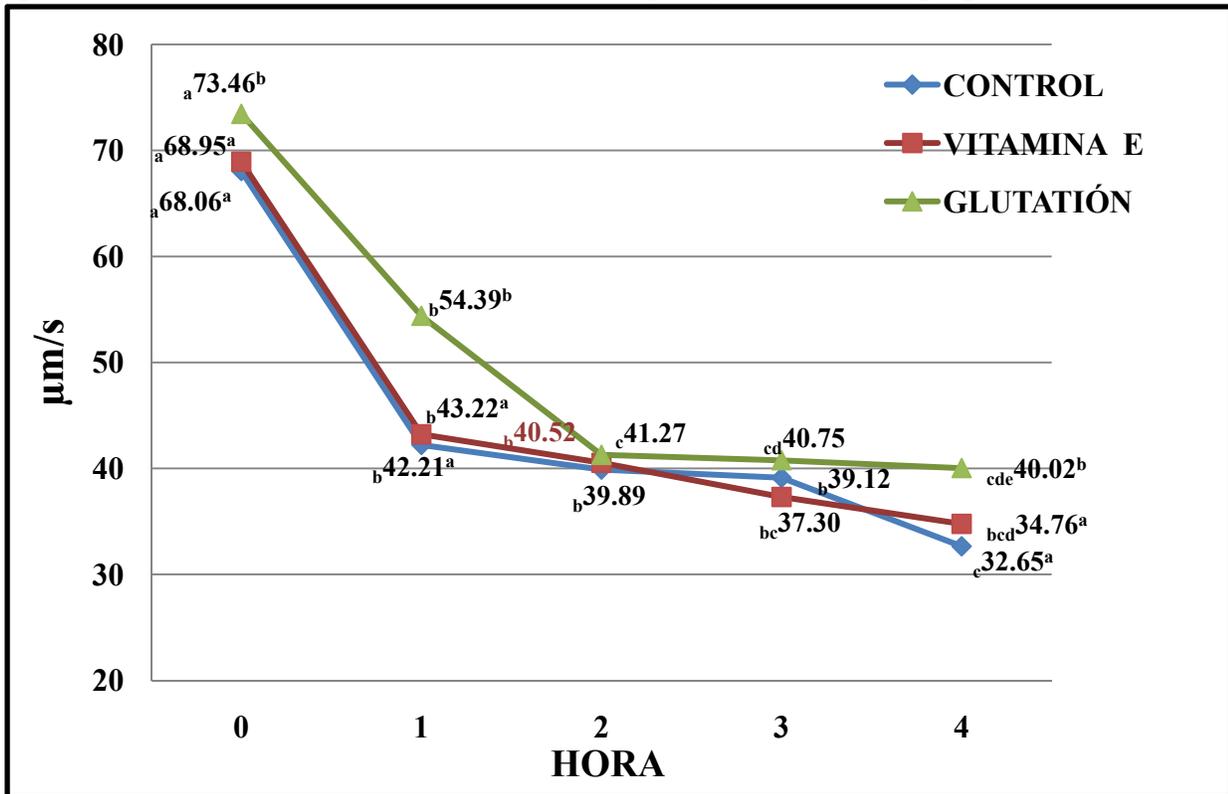
		CONTROL			VITAMINA E			GLUTATIÓN		
		N	Media	S.D.	N	Media	S.D.	N	Media	S.D.
HORA 4	VCL ($\mu\text{m/s}$)	1243	32,65 ^a	20,70	1371	34,76 ^a	21,17	1402	40,02 ^b	24,36
	VSL ($\mu\text{m/s}$)	1243	24,69 ^a	18,85	1371	25,68 ^a	19,11	1402	31,17 ^b	21,91
	VAP ($\mu\text{m/s}$)	1243	28,56 ^a	19,84	1371	29,76 ^a	19,85	1402	35,65 ^b	23,11
	LIN (%)	1243	0,72	0,26	1371	0,70	0,27	1402	0,74	0,25
	STR (%)	1243	0,82	0,21	1371	0,80	0,22	1402	0,83	0,20
	WOB (%)	1243	0,85	0,17	1371	0,83 ^a	0,18	1402	0,86 ^b	0,16
	ALH (μm)	1243	1,06 ^a	0,54	1371	1,15	0,66	1402	1,18 ^b	0,63
	BCF (Hz)	1243	7,03	3,31	1371	6,98	3,35	1402	7,14	3,38

Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).

De la figura 59 a la 66 se muestran de manera más clara las diferencias de cada uno de los parámetros cinéticos que se analizan por el programa CASA entre los tres grupos analizados en este trabajo, se muestran también las diferencias estadísticas entre ellos a lo largo de la horas del análisis.

En la figura 59 se muestran las diferencias entre los distintos grupos, para VCL se constata una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), también se señalan las diferencias entre las horas para cada grupo. Se aprecia nuevamente la tendencia del grupo GSH a presentar mejores resultados en cuanto a este parámetro.

Figura 59. Diferencia en la velocidad curvilínea ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.

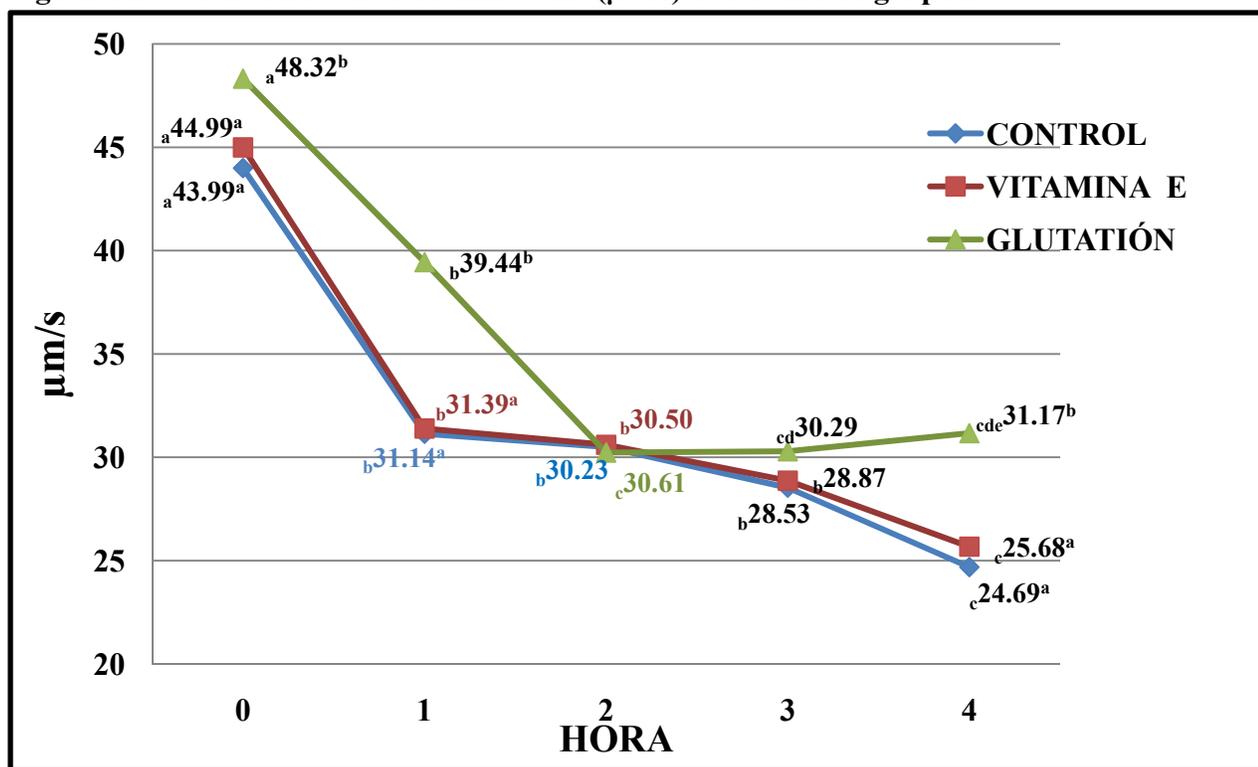


Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.05$).

En la figura 60 se muestran los resultados entre los grupos para el caso específico de VSL, también se muestran las diferencias estadísticas encontradas en dicha comparación y las diferencias estadísticas entre los tiempos de incubación para cada grupo.

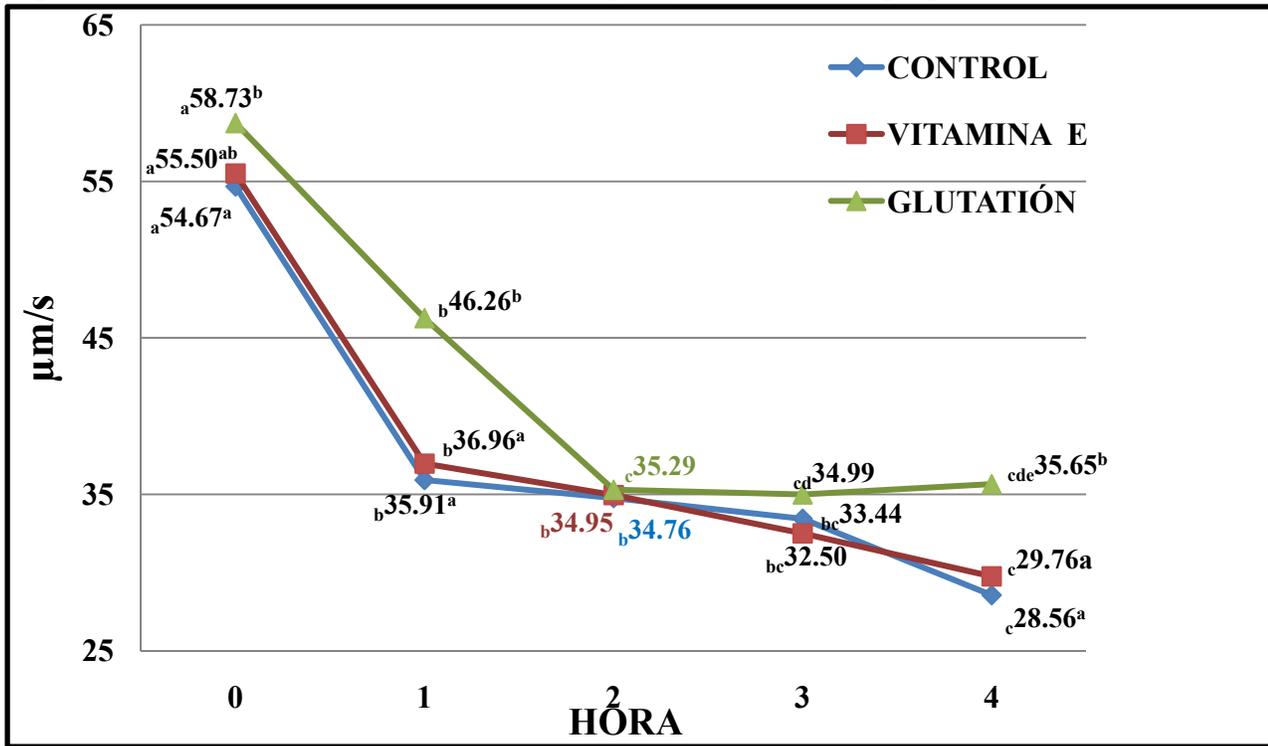
Figura 60. Diferencia en la velocidad lineal ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.05$).

La figura 61 nos muestra las diferencias entre los valores medios de los tres grupos analizados en este trabajo para el caso específico de VAP y entre las horas de incubación en cada uno de ellos ($p < 0.05$). Se ve claramente como el grupo GSH presenta las células espermáticas más veloces en comparación a los demás grupos.

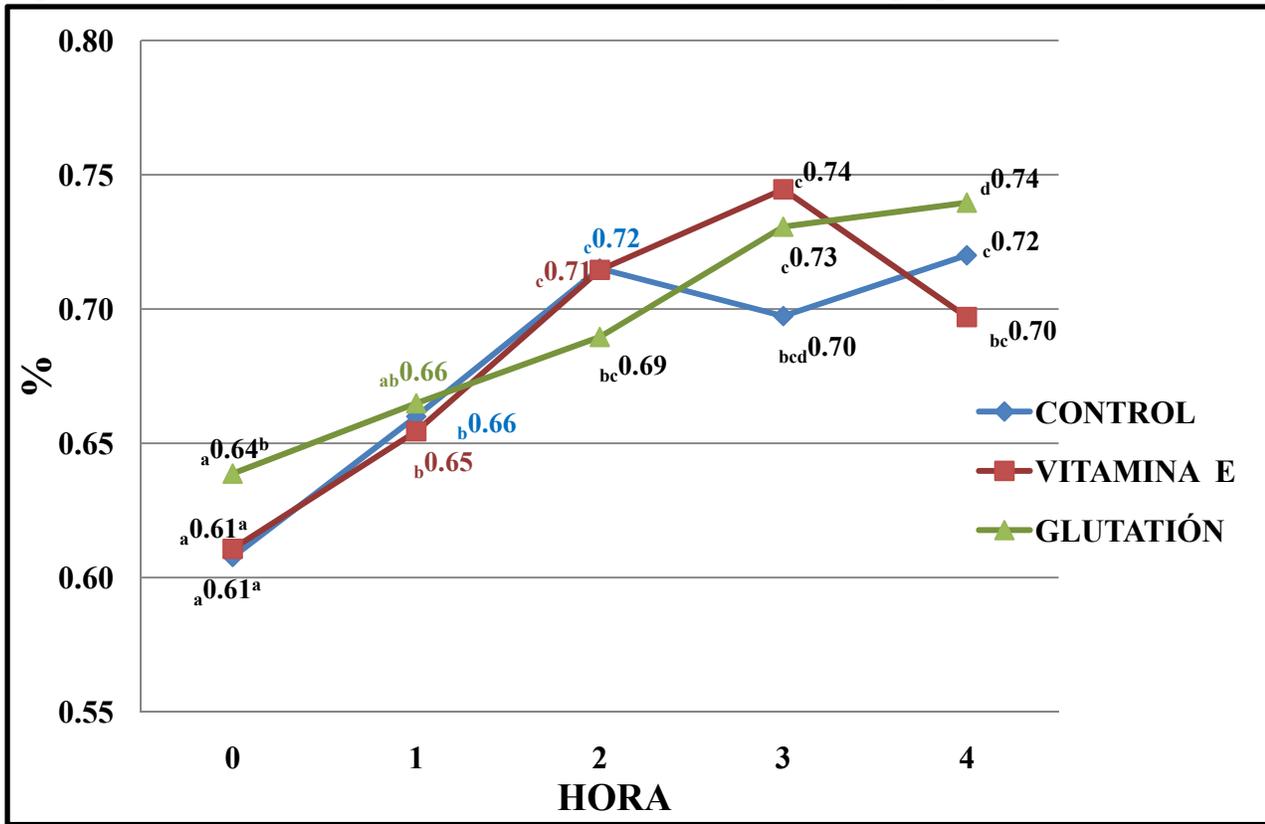
Figura 61. Diferencia en la velocidad media ($\mu\text{m/s}$) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.05$).

La figura 62 nos muestra las diferencias entre los tres grupos analizados para el caso del LIN. El grupo GSH expresa el más alto índice de linealidad lo que denota un desplazamiento más recto de los espermatozoidez al finalizar el periodo de incubación.

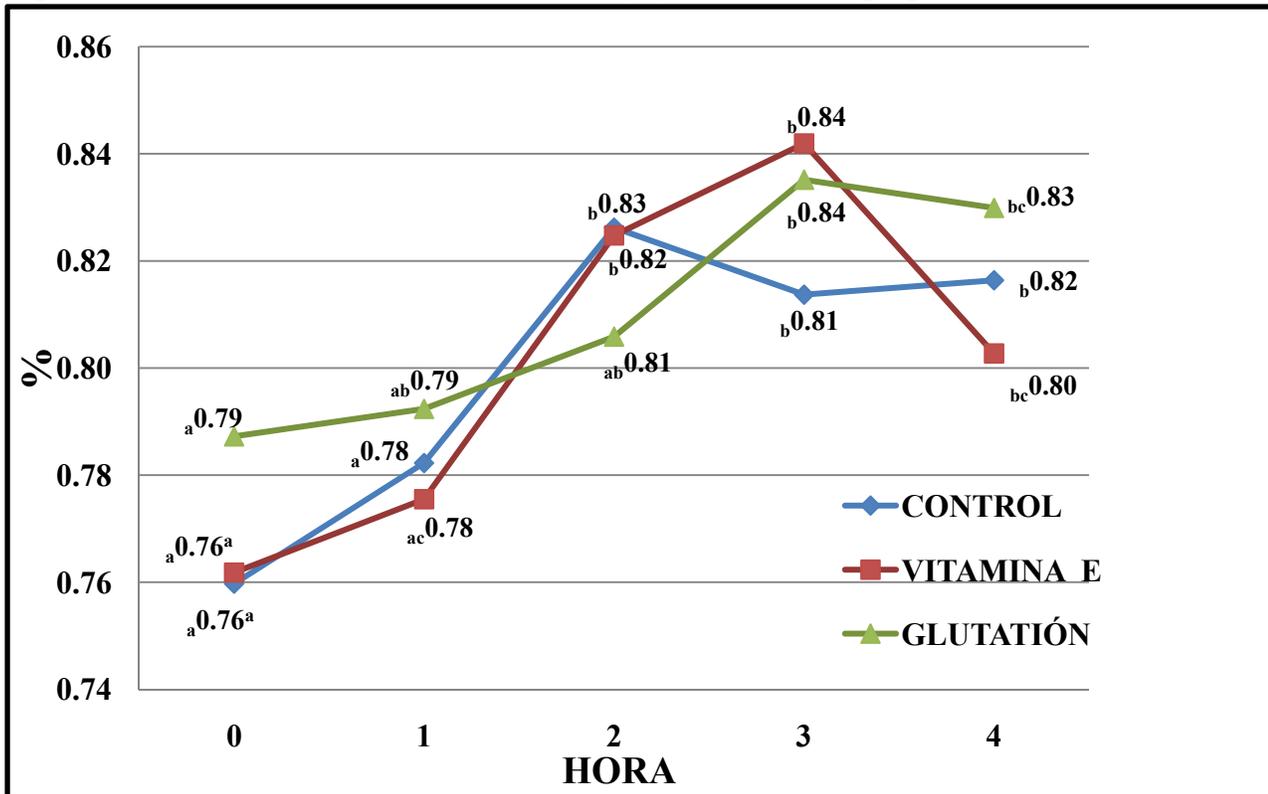
Figura 62. Diferencia en el índice de linealidad (%) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de incubación ($p < 0.05$).

En la figura 63 se muestra las diferencias entre los tres grupos analizados para el parámetro STR y entre las horas analizadas, donde de nuevo se aprecia que el movimiento más recto de los espermatozoides pertenece al grupo GSH al final de la incubación (hora 4).

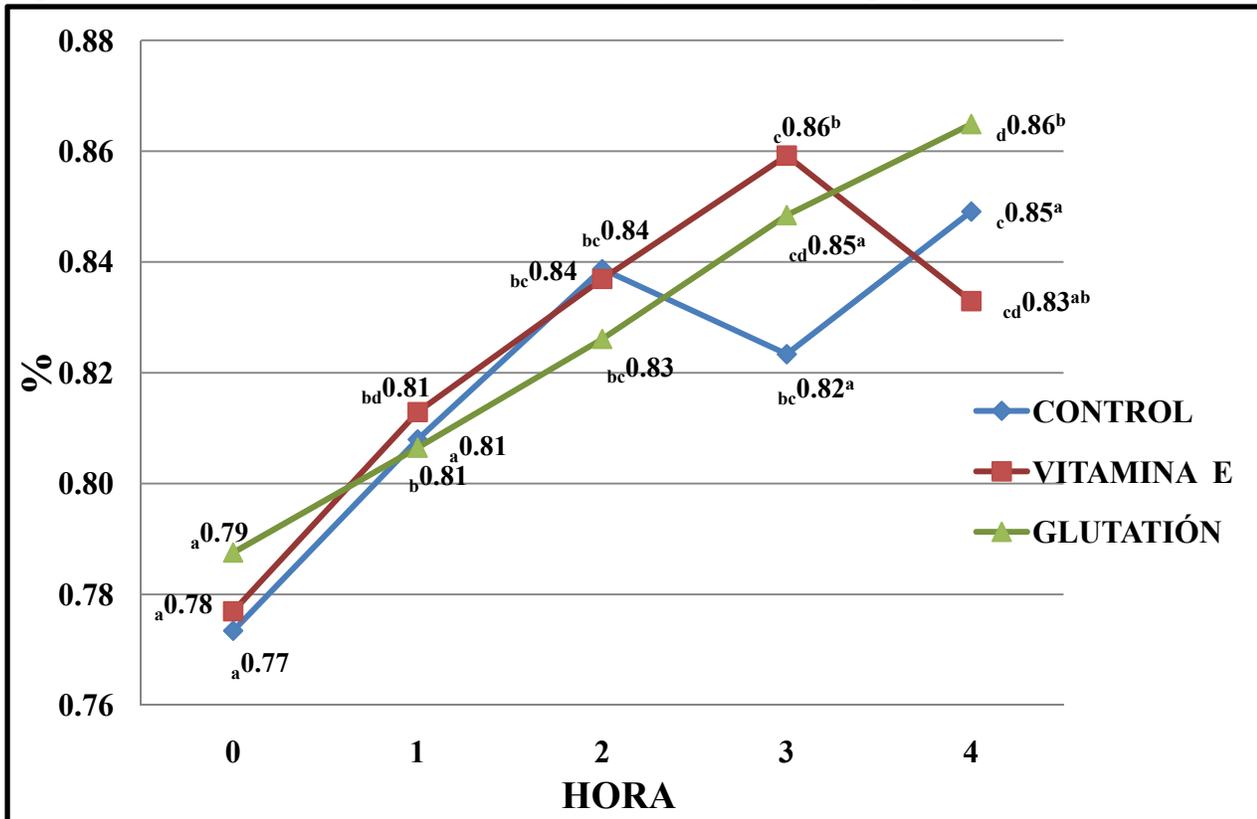
Figura 63. Diferencia en el índice de rectitud (%) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de incubación ($p < 0.05$).

Para el caso de WOB en la figura 64 se muestran de manera grafica las diferencias encontradas en la comparación de los distintos grupos analizados en este trabajo y de cada hora de incubación en cada grupo.

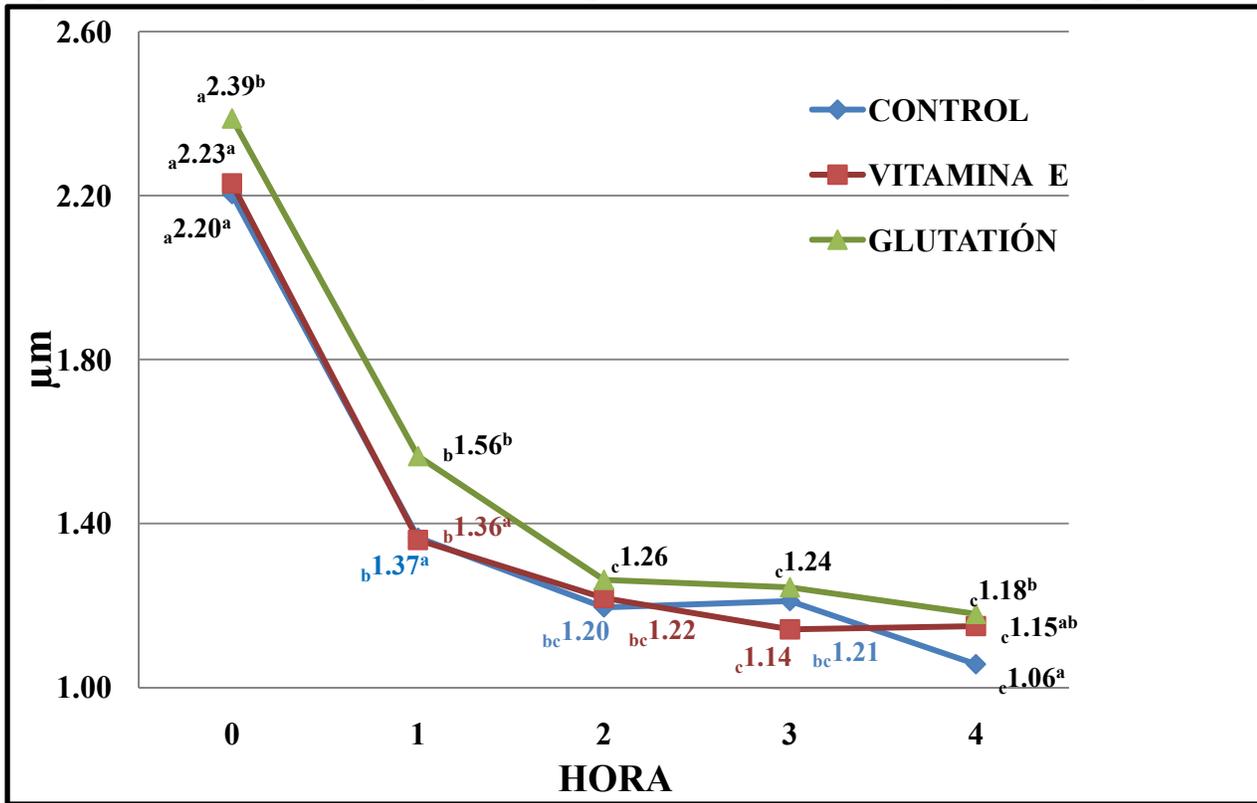
Figura 64. Diferencia del índice de oscilación (%) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de incubación ($p < 0.05$).

En la figura 65 se muestran los resultados de manera gráfica para el caso específico de ALH entre los grupos y entre las horas de incubación, se señalan las diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0.05$).

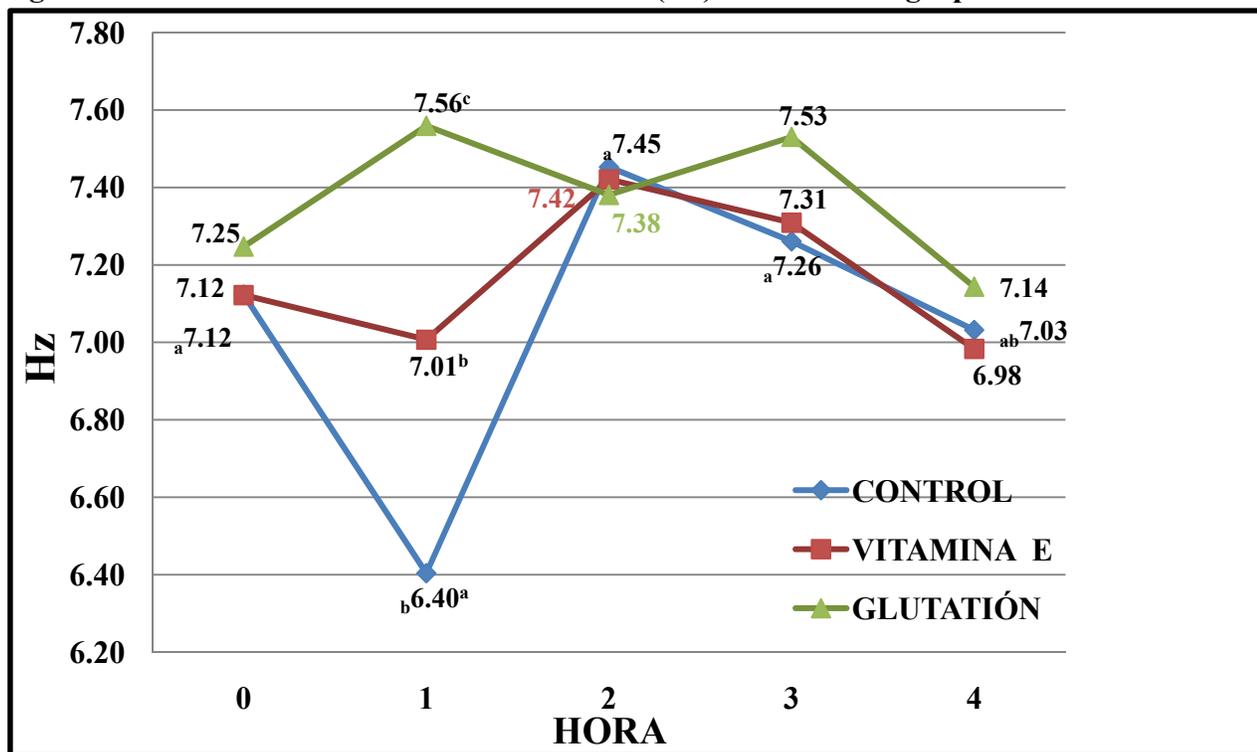
Figura 65. Diferencia de la amplitud de desplazamiento de la cabeza (μm) entre grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).
 Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.05$).

Para el caso específico de BCF, de forma gráfica en la tabla 66 se muestran las diferencias de los valores medios entre los distintos grupos analizados y entre las distintas horas de incubación. Se ve claramente que el grupo GSH presenta los espermatozoides más fuertes, pues la BCF es un indicador del vigor de las células espermáticas.

Figura 66. Diferencia en la frecuencia de batido (Hz) entre los tres grupos.



Distinto superíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.05$).

Distinto subíndice indica diferencia estadísticamente significativa entre horas de la incubación ($p < 0.05$).

4.2.4 Efecto del análogo de la vitamina E y del Glutati3n reducido sobre la Peroxidaci3n Lipídica.

En la tabla 40 se observa la evoluci3n de la PL del semen tras haber sido descongelado, los valores medios comparados de los distintos grupos arrojan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el grupo control y el grupo que contiene GSH, los valores de GSH son los más bajos para esta prueba y aunque los valores de vitamina E también son bajos con respecto al grupo control estos guardan cierta proximidad entre ellos, lo que se ve reflejado en la ausencia de una diferencia estadísticamente significativa entre ambos. Los valores individualizados se encuentran en la tabla 91 de la secci3n de Anexos.

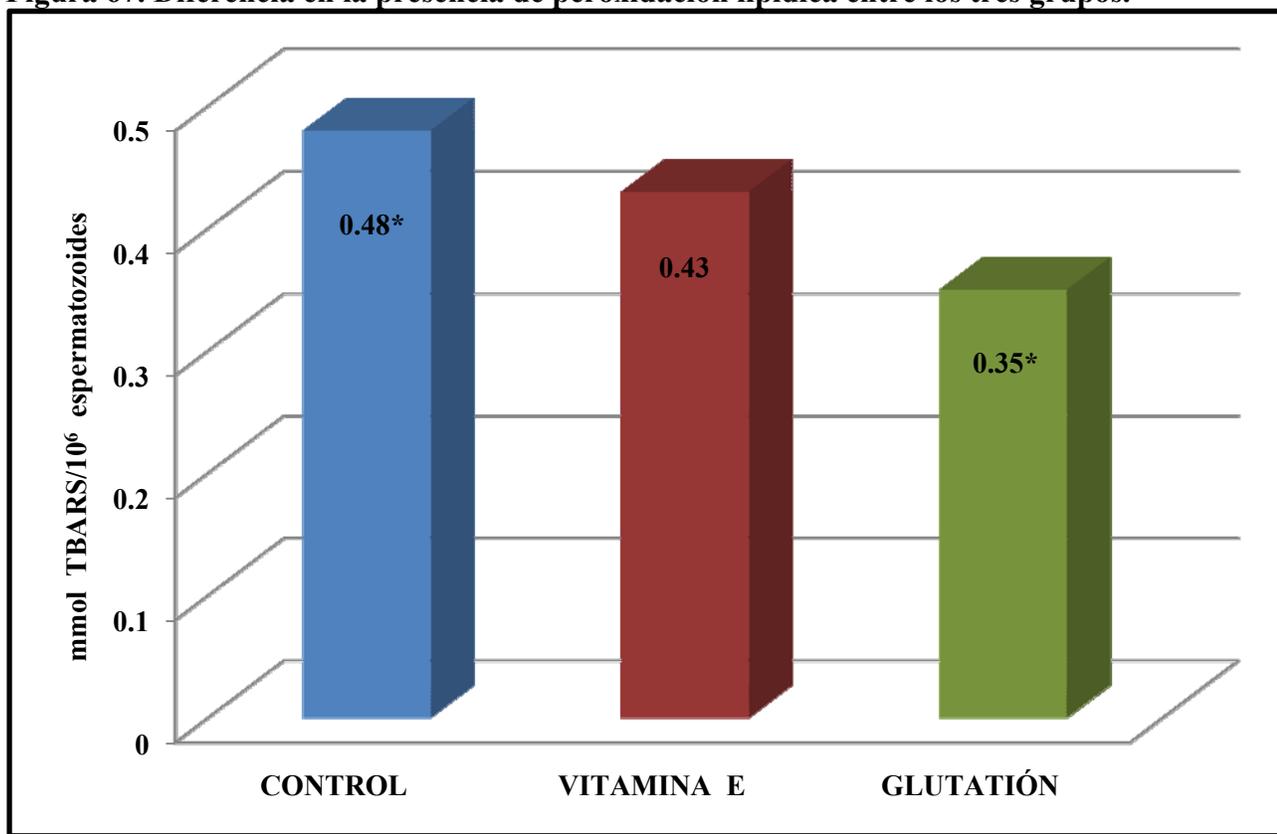
Tabla 40. Evoluci3n de la peroxidaci3n lipídica (mmol TBARS/ 10^6 espermatozoides) entre los tres grupos.

CONTROL			VITAMINA E			GLUTATI3N		
N	Media	S.D	N	Media	S.D	N	Media	S.D
10	0,48*	0,08	10	0,43	0,09	10	0,35*	0,07

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

En la figura 67 se aprecia claramente las diferencias entre los distintos grupos analizados para la PL. El valor más elevado corresponde al grupo control lo que significa una mayor presencia de MDA y por lo tanto mayor presencia de daño oxidativo.

Figura 67. Diferencia en la presencia de peroxidación lipídica entre los tres grupos.



(*) Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos analizados ($p < 0.001$).

4.2.5 Correlaciones de Pearson entre la peroxidación lipídica y la integridad de la membrana, Estado del acrosoma y Movilidad espermática.

La tabla 41 muestra las correlaciones de Pearson encontradas entre los distintos parámetros de calidad espermática medidos en este trabajo y la PL para el caso del grupo control, se aprecia una significación estadística ($p < 0.01$) para el caso de la integridad de la membrana, con el estado del acrosoma y la movilidad. En cuanto a la PL no se encuentra ninguna diferencia estadísticamente significativa con los demás parámetros espermáticos medidos, aunque si se aprecia una correlación negativa.

Tabla 41. Correlaciones de Pearson entre los parámetros de calidad seminal y la peroxidación lipídica en el grupo Control.

		VITALIDAD	ACROSOMA	MOVILIDAD	PEROXIDACIÓN
VITALIDAD	Correlación de Pearson	1	0,694*	0,536*	-0,241
	Sig. (bilateral)		0,000	0,000	0,092
	N	50	50	50	50
ACROSOMA	Correlación de Pearson	0,694*	1	0,521*	-0,165
	Sig. (bilateral)	0,000		0,000	0,253
	N	50	50	50	50
MOVILIDAD	Correlación de Pearson	0,536*	0,521*	1	-0,103
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000		0,476
	N	50	50	50	50
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	-0,241	-0,165	-0,103	1
	Sig. (bilateral)	0,092	0,253	0,476	
	N	50	50	50	50

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

En la tabla 42 se aprecian las correlaciones de Pearson encontradas entre los parámetros de calidad espermática y la PL para el grupo vitamina E, como se aprecia en la tabla solo se observó una correlación significativa ($p < 0.01$) entre los parámetros de integridad de la membrana, estado del acrosoma y la movilidad espermática. En cuanto a PL se aprecia una correlación negativa, aunque no es significativa.

Tabla 42. Correlaciones de Pearson entre los parámetros de calidad seminal y la peroxidación lipídica en el grupo Vitamina E.

		VITALIDAD	ACROSOMA	MOVILIDAD	PEROXIDACIÓN
VITALIDAD	Correlación de Pearson	1	0,882*	0,595*	-0,135
	Sig. (bilateral)		0,000	0,000	0,812
	N	50	50	50	50
ACROSOMA	Correlación de Pearson	0,882*	1	0,713*	-0,113
	Sig. (bilateral)	0,000		0,000	0,931
	N	50	50	50	50
MOVILIDAD	Correlación de Pearson	0,595*	0,713*	1	-0,218
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000		0,128
	N	50	50	50	50
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	0,035	0,013	0,218	1
	Sig. (bilateral)	0,812	0,931	0,128	
	N	50	50	50	50

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

En la siguiente tabla se muestran las correlaciones de Pearson encontradas en el grupo GSH entre la PL y los parámetros de calidad seminal evaluados en este trabajo, dichas correlaciones presentan una significación ($p < 0.01$) entre los parámetros de integridad de la membrana, estado del acrosoma y movilidad, mientras que para el caso de la PL no se apreció diferencia significativa, aunque la correlación se presenta negativa con los demás parámetros espermáticos.

Tabla 43. Correlaciones de Pearson entre los parámetros de calidad seminal y la peroxidación lipídica en el grupo Glutatión.

		VITALIDAD	ACROSOMA	MOVILIDAD	PEROXIDACIÓN
VITALIDAD	Correlación de Pearson	1	0,880*	0,569*	-0,170
	Sig. (bilateral)		0,000	0,000	0,628
	N	50	50	50	50
ACROSOMA	Correlación de Pearson	0,880*	1	0,531*	-0,182
	Sig. (bilateral)	0,000		0,000	0,573
	N	50	50	50	50
MOVILIDAD	Correlación de Pearson	0,569*	0,531*	1	-0,412*
	Sig. (bilateral)	0,000	0,000		0,003
	N	50	50	50	50
PEROXIDACIÓN	Correlación de Pearson	0,070	0,082	0,412*	1
	Sig. (bilateral)	0,628	0,573	0,003	
	N	50	50	50	50

(*) Indica diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$).

5. Discusión

La discusión la vamos a organizar por experimentos realizados, de forma y manera que en primer lugar abordaremos el efecto de los antioxidantes sobre la calidad espermática, donde se incluyen la integridad de la membrana, estado del acrosoma y movilidad total, en otro epígrafe haremos referencia a los parámetros cinéticos medidos con el programa CASA, posteriormente hablaremos de la PL, debemos mencionar que de manera general los apartados y los efectos sobre la células espermática que se refieren en ellos, están relacionados, puesto que la PL, provoca detrimento en todos los parámetros de calidad seminal analizados.

5.1 EXPERIMENTO 1. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN REFRIGERADO DE VERRACO A 15°C MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol /Glutación reducido), Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

5.1.1 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutación Reducido sobre la integridad de la membrana, estado del acrosoma y movilidad en semen refrigerado.

El conjunto de parámetros que permiten caracterizar la viabilidad de la célula espermática y por lo tanto su capacidad para lograr la fecundación, se conjugan en lo que se conoce como calidad espermática, dicha calidad hace referencia a los parámetros que cuantifican puntos específicos en la funcionalidad de la célula (Larsson, 1985; Johnson *et al.*, 2000; Bernal, 2009). La calidad seminal, por tanto, se define como la capacidad del semen para lograr la fecundación, dando viabilidad a la posterior gestación y parto de las hembras.

En la inseminación artificial la calidad espermática se convierte en un punto de gran importancia, ya que sirve como criterio de valoración de la posible respuesta en cuanto a la capacidad fecundante, puesto que sementales que presentan en un examen seminal rutinario una calidad pobre, posteriormente tienen una fertilidad reducida, 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 (Berger y Parker, 1989; Martínez *et al.*, 1993). Hay parámetros que como hemos mencionado no aseguran por completo buenos niveles de fertilidad, pero que son indispensables para que esta tenga lugar, estos parámetros son: el volumen y concentración del eyaculado, la movilidad total e individual

progresiva teniendo más importancia esta última y la morfología espermática (Gonzalez-Urdiales, 2006; Sanchez, 2006; Domínguez *et al.*, 2007).

Existen otros factores que intervienen en la calidad seminal, algunos propios de la genética del animal como la raza y otros que tienen que ver con el ambiente que le rodea como el manejo que se haga de ellos, como puede ser la frecuencia de extracción del semen, estado sanitario y alimentación (Córdova *et al.*, 2004; Domínguez *et al.*, 2007). El estudio de estos parámetros mencionados nos permite hacer una selección de los verracos que pueden ser infértiles y sobre todo y más importante los subfértiles, de este modo se eliminan los ejemplares que no cumplan con los objetivos de los centros de producción.

La utilización de compuestos antioxidantes con la intención de mejorar la calidad espermática, y por tanto mejorar la capacidad fecundante de los espermatozoides se ha intentado de diversas maneras y en distintas especies, Bucak y Tekin (2007) analizan el efecto de compuestos antioxidantes añadidos en el diluyente, entre ellos el GSH, sobre la protección del semen de morueco, Kankofer *et al.* (2005) evaluaron la actividad de enzimas antioxidantes como la GSH peroxidasa y la intensidad de PL en semen equino conservado a 5°C, Zaniboni y Cerloni (2009) en semen de pavo evaluaron el efecto del α -tocoferol, administrado en la dieta, sobre los cambios en la calidad espermática y su susceptibilidad a PL. Marín-Guzmán, *et al.* (1997; 2000a) probaron que el Selenio puede tener un efecto positivo sobre los parámetros definitorios de la calidad seminal; sin embargo, estos autores indican que los suplementos de vitamina E al semen de verraco, carecen de acción sobre dichos parámetros; aunque Brzezinska-Slebodzinska *et al.* (1995), indican que dicha vitamina incrementa la concentración espermática en la misma especie, sugiriendo que puede ser debida a la acción antioxidante de dicha sustancia. De igual forma Shi *et al.* (2010), encontraron que la adición de Selenio en la dieta de los machos cabríos mejora la calidad espermática.

Existen 4 formas distintas de tocoferoles (α , β , γ y δ), de los cuales el compuesto más activo es el α -tocoferol. La vitamina E funciona en general como un antioxidante biológico, previniendo la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de las proteínas, por lo que es considerada como un elemento importante en la protección contra el daño oxidativo, evita la formación de productos

tóxicos como los peróxidos de ácidos grasos no saturados, actuando así como estabilizador de la estructura lipídica en las estructuras del organismo. (Marquez *et al.*, 2002).

Por otro lado el GSH es utilizado como almacenamiento y transporte de cisteína, participa también en la síntesis de proteínas, es la principal defensa no enzimática de las células frente al estrés oxidativo provocado por el propio metabolismo (Rausell y Tarín, 2005).

Sí comparamos nuestros resultados con los obtenidos por Pérez-Llano *et al.* (2009), quienes estudian las subpoblaciones espermáticas definidas de acuerdo a parámetros como la integridad de la membrana y el estado del acrosoma en semen de verraco conservado a 15°C, nos sugieren que la utilización de un análogo de la vitamina E y el GSH mejoran la respuesta de la membrana plasmática y estado del acrosoma en conservación a 15°C, en dicha comparación, tenemos que mencionar factores que pueden repercutir en los resultados, aunque la temperatura de almacenamiento es la misma, el diluyente no lo es, ni tampoco las técnicas empleadas para la valoración de los parámetros, aun así, podemos decir, basados en la diferencia obtenida en los parámetros (células vivas y acrosomas íntegros) que la adición de compuestos antioxidantes en el diluyente mejora sensiblemente la capacidad de los espermatozoides a la conservación en refrigeración. Kumaresan *et al.* (2009), conservan el semen porcino a 18°C, obtienen dichos autores una viabilidad de las células muy baja en comparación a nuestros resultados, para la integridad de la membrana y acrosomas íntegros y; como sucede en la comparación anterior existen en ambos trabajos diferencias que condicionan los resultados, Kumaresan *et al.* (2009), no utilizan ningún compuesto antioxidante, lo que nos refuerza la idea del poder protector de la vitamina E y GSH utilizados en nuestra experiencia, puesto que, aun cuando en nuestro experimento los espermatozoides permanecen más tiempo en conservación (7 días), en comparación a Kumaresan *et al.* (2009) (4 días), mantuvieron niveles de calidad mucho mejores, entre estos autores y nuestro trabajo el punto importante que explica las diferencias puede ser también la temperatura empleada. Conservar espermatozoides a 18°C puede tener en efecto más deprimente sobre la calidad espermática que si se conservan a 15°C, partiendo de la base que a temperaturas más bajas los movimientos laterales de los fosfolípidos que componen la membrana se ven reducidos, impidiendo su movimiento y el de las proteínas manteniendo así más tiempo la estructura de la membrana (Pursel *et al.*, 1973; Sánchez, 2006). El combustible que hace posible la movilidad de la célula espermática es el ATP, por lo tanto, alteraciones en la membrana mitocondrial de los

espermatozoides generan un mala producción de dicho combustible celular, lo que repercute directamente sobre este parámetro (Cummins, 1995), de esta manera si comparamos nuestros resultados con el trabajo realizado por Guthrie *et al.* (2008), que estudian la evolución de las características seminales sin añadir antioxidantes, se aprecia que sus resultados son inferiores comparados con los nuestros, tanto para la movilidad (50% vs. 73%) el día 5 de incubación, e incluso el día 7 de incubación obtuvimos un 64% de movilidad. Tenemos que señalar que estos autores utilizan una incubación a 37°C durante 30 min. previamente a la valoración de la movilidad, mientras que nosotros, utilizamos la misma temperatura pero solo una incubación de 6 min.; a pesar de esta diferencia metodológica, creemos que la diferencia entre los resultados se debe fundamentalmente a la protección de la vitamina E y GSH contra el deterioro de la membrana durante la incubación, que debilita su correcta funcionalidad como hemos mencionado antes y altera la producción de ATP.

El trabajo realizado por De Ambrogi *et al.* (2006), donde evalúan el efecto del almacenamiento de semen porcino con diluyentes comerciales durante 5 días a 15-20°C, encuentran que a las 96 horas de almacenamiento la movilidad total disminuye a cerca del 40%, si comparamos dichos resultados con la movilidad obtenida en nuestro experimento, la cual fue superior al 60% en el caso de los grupos añadidos con antioxidantes en el día 7, nos hace pensar una vez más, en la necesidad de las células de contar con compuestos que disminuyan el daño celular que ocasionan disminución de movilidad, pues De Ambrogi *et al.* (2006) obtienen en torno a un 20% menos que nuestros resultados en cuanto a movilidad, aun realizando una incubación mucho menor que la nuestra y a pesar que la temperatura de dicha incubación es superior, atribuimos dichas diferencias positivas en nuestro trabajo al uso de el análogo de la vitamina E y el GSH. Dubé *et al.* (2004), quienes igualmente analizan la capacidad de diluyentes comerciales en la conservación de semen de verraco a 16-18°C, donde los resultados para la movilidad total fueron sensiblemente inferiores en comparación a los nuestros en presencia de antioxidantes, siendo sus valores ligeramente superiores al 40% en el día 5 de incubación, mientras que nuestros resultados se mostraron superiores al 70% en el mismo día y superiores al 60% en el día 7 de la refrigeración, en este trabajo y en los trabajos anteriormente mencionados las condiciones de los mismos han sido distintos, como el tipo de diluyente, tiempo y temperatura de conservación, así como también la técnica de análisis; a pesar de ello, y guardando las precauciones necesarias, podemos decir, que la utilización del análogo de la

vitamina E y del GSH incrementa sustantivamente la capacidad de las células espermáticas para mantener sus funciones, como son la capacidad de las mitocondrias de producir ATP necesarias para la movilidad, pues estas estructuras son altamente sensibles al proceso de conservación (Ericsson *et al.*, 1993; Cummins, 1994; Satorre *et al.*, 2007), mantienen intacto el acrosoma para que sea capaz de reaccionar y liberar las enzimas necesarias para atravesar la zona pelúcida, y por supuesto, proteger la membrana plasmática manteniendo así la viabilidad de los espermatozoides, dicha protección ejercida posiblemente por el poder antioxidante de los compuestos empleados en este experimento (Peña *et al.*, 2004; Yue *et al.*, 2010) .

Si comparamos nuestros resultados con aquellos en los que sí se ha incluido antioxidantes en el diluyente, como es el caso de Cerolini *et al.* (2000), donde se emplea α -tocoferol en la conservación del semen porcino a 19°C, y Funahashi y Sano (2005), quienes añadieron distintos compuestos antioxidantes, entre ellos el GSH al diluyente de semen porcino y lo conservaron a 10°C, los resultados de estos autores comparados con los nuestros concuerdan en presentar un mejor porcentaje de viabilidad y estado del acrosoma en presencia del antioxidante con respecto al grupo control durante 7 días conservación; los resultados de estos autores nos ayuda a apoyar lo comentado en los párrafos anteriores, donde el semen conservado sin ningún compuesto antioxidante presenta una peor resistencia a la conservación en refrigeración.

Con base a lo mencionado anteriormente, se puede sugerir que el α -tocoferol podría ser incorporado a la estructura de la membrana del espermatozoide, siendo esta, en la especie porcina muy rica en lípidos, manteniendo así por más tiempo la integridad de las células espermáticas, previniendo la disminución progresiva de la viabilidad observada en las condiciones de control, de igual forma la utilización de GSH en conjunto con la enzima GPx combate los daños producidos por el estrés causado por la conservación del semen (Gadea *et al.*, 2005a; Satorre *et al.* , 2007).

Por lo tanto en nuestro trabajo la suplementación de α -tocoferol y GSH (200 μ M y 5mM respectivamente) mejoró la calidad espermática en cuanto a la integridad de la membrana, estado del acrosoma y movilidad en espermatozoides porcinos durante su conservación a 15°C, durante 7 días, con respecto al grupo que no se trató con antioxidantes, siendo el grupo que contiene GSH el que muestra mejor protección de los parámetros de calidad espermática.

Johnson *et al.* (2000), establecen un mínimo del 60% de movilidad para poder obtener una fertilidad aceptable, siguiendo esta primicia podemos decir que el análogo de la vitamina E y el GSH, protegen las características espermáticas que llevan a la conservación de la movilidad en un grado suficiente para poder esperar resultados aceptables en cuando a fertilidad, puesto que la movilidad obtenida en nuestra experiencia para el día 7 fue superior al 60% en el caso de los dos antioxidantes, esto supone un buen avance si tenemos en cuenta que las dosis seminales tienen como fecha de caducidad 5 días, lo que significa que se podrá enviar dosis a distancias más lejanas del centro de producción sin que estas pierdan en exceso su calidad.

5.1.2 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutati6n Reducido sobre los parámetros cinéticos en semen refrigerado.

En el epígrafe anterior, mencionamos la importancia de la valoración de los parámetros de calidad espermática para la detección de subfertilidad de machos donantes de semen utilizados en IA, dentro de dichos parámetros, y en el campo de la conservación espermática, ya sea en refrigeración o congelado, la movilidad de los espermatozoides es el parámetro más utilizado para medir su viabilidad. A nivel comercial, en los centros de inseminación porcina se ha valorado la movilidad de manera subjetiva, que es mucho menos precisa que la técnica asistida por los programas computarizados diseñados para tal motivo, la práctica de estas técnicas asistidas por ordenador no se ha extendido en la práctica comercial debido al alto coste del equipo empleado. (Amann y Katz, 2004; Cremades *et al.*, 2005; Soler *et al.*, 2006; Tejerina *et al.*, 2008).

El verdadero valor de los sistemas CASA se aprecia en el campo de la investigación, tanto sobre semen refrigerado como criopreservado, puesto que en ambos métodos de conservación la investigación tiene como objetivo la constante disponibilidad en espacio y tiempo de calidad espermática que asegure su fertilidad, por lo que es de gran utilidad la información que los sistemas computarizados proporcionan de los sutiles cambios presentes en la movilidad, patrones de movimiento y otras variables cinéticas (Tejerina, 2007; 2008; Bernal, 2009).

En nuestra experiencia hemos encontrado que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y vitamina E, en parámetros como VCL, VAP, LIN y STR. Para el caso del GSH, VCL, VSL, VAP, LIN y ALH, lo que demuestra según las diferencias encontradas, que con la incorporación de antioxidantes los espermatozoides manifiestan movimientos más rectos, pues el LIN es alto así como la STR, además de presentar más desplazamiento y mayor rapidez.

Entre los antioxidantes las diferencias para el día 5 se constataron en los parámetros: LIN y SRT. Para el día 7: VCL, SRT y ALH, dicha diferencia a favor del grupo GSH, en el sentido de presentar mejor movimiento.

Autores como De Ambrogi *et al.* (2006), evalúan dentro de otras cosas la evolución de parámetros cinéticos como VSL, VCL y VAP en distintos diluyentes comerciales, encuentran que los valores más bajos se constatan en el diluyente MR-A (mismo diluyente utilizado por nosotros) alcanzando los valores mínimos de movilidad requeridos para la obtención de una buena fertilidad, según Johnson *et al.* (2000), a las 48 horas en el caso de MR-A, y a las 72 horas en los demás diluyentes empleados, De Ambrogi *et al.* (2006) señalan que las únicas diferencias estadísticas se presentan entre las razas empleadas, según lo obtenido por estos autores, en diluyentes de larga conservación se comienza a apreciar un detrimento en los parámetros cinéticos a partir del día 4, podemos decir que en nuestro trabajo, no hubo tal disminución de la calidad de movimiento para VCL, VSL y VAP, incluso con más tiempo de conservación, siendo así, podemos sugerir que tal fenómeno se debe a la acción de los antioxidantes, resultados que no coinciden con Estienne *et al.* (2007), quienes igual que nosotros emplearon MR-A como diluyente durante 7 días de conservación, estos autores obtuvieron los resultados más altos para VCL, VSL y VAP con el diluyente MR-A, por lo que tenemos que recordar que debido a los distintos programas computarizados empleados, y ecuaciones utilizadas por dichos programas, los resultados son muy distintos en cada experimentación, por otro lado Ball y Vo (2001) adicionan compuestos vitamínicos (α -tocoferol) al semen equino almacenado a 5°C, lo que se traduce en una VSL superior en el grupo que contiene el antioxidante, resultados que concuerdan con lo observado en nuestra experiencia.

Por otra parte Tejerina *et al.* (2008), analizan un nuevo sistema de análisis seminal por ordenador (QualiSperm[®]) en comparación con el sistema CASA convencional, en dicho experimento se pone de manifiesto lo mencionado anteriormente, los múltiples factores que condicionan los resultados, puesto que cada uno de los sistemas computarizados empleados en la experiencia de Tejerina *et al.* (2008), emplean distintas velocidades de captura, además de que analizan un número distinto de espermatozoides, si comparamos los resultados obtenidos por Tejerina *et al.* (2008) con los nuestros, los resultados de dichos autores para VCL, VSL y VAP se muestran muy superiores, tal vez debido a la diferencia en el diluyente empleado, el tiempo de conservación, el equipo y sistema computarizado empleado para el análisis de dichos parámetros, y el tiempo de incubación previos a la evaluación.

Yeste *et al.* (2008) analizan el efecto de la adición del ácido hialurónico y cafeína, en distintas concentraciones, al semen de verraco almacenado a 15°C durante 3 días, sobre el comportamiento de parámetros cinéticos (VCL, VSL y VAP). A lo largo de la experiencia observan que los valores para dichos parámetros se mantuvieron en el mismo rango con respecto al grupo control, los resultados de estos autores se muestran inferiores en comparación a los nuestros. Se conoce el efecto que el ácido hialurónico tiene sobre la activación y mantenimiento de la movilidad, tanto en semen fresco como en semen criopreservado, en especies como la humana y la porcina (Huszar *et al.*, 1990; Sbracia *et al.*, 1997; Peña *et al.*, 2004) y en el caso de la cafeína de igual modo se conoce su efecto sobre el aumento de AMPc que incrementa la movilidad espermática en especies como la bovina y la porcina (Funahashi y Nagai, 2001; Coscioni *et al.*, 2001; Tejerina, 2007). Mencionado lo anterior y en base a nuestros resultados podemos decir que la adición de antioxidantes (vitamina E y GSH) ya sea por su acción a nivel de membrana protegiéndola de daños provocados por la acción de radicales libres durante la conservación, o por su acción en conjunto con ciertas enzimas, protegiendo igualmente la membrana, provocando un correcta función de las mitocondrias (Yue *et al.*, 2010), que son productoras de ATP, que es combustible principal de los espermatozoides para generar la movilidad

Como hemos descrito anteriormente, el parámetro cinético que presenta diferencias significativas entre los grupos que contenían antioxidantes y el grupo control, en todos los días del experimento fue el concerniente a la VCL, que corresponde a la distancia total recorrida por el

espermatozoide, lo que nos sugiere un aumento en el movimiento espermático, atribuido al uso de los antioxidantes, resultados que están en concordancia con Bernal (2009) quien observa el mismo comportamiento al utilizar un compuesto vitamínico (β -caroteno) por vía parenteral, dicho parámetro no carece de importancia, al atribuir muchos autores una correlación entre la VCL y la fertilidad de los eyaculados (Holt y North 1984; Holt *et al.*, 1985; Liu *et al.*, 1991; Marshburn *et al.*, 1992; De Geyter *et al.*, 1998; Shibahara *et al.*, 2004). En nuestro experimento los antioxidantes mostraron un comportamiento similar entre ellos, en cuanto al mantenimiento y/o mejoramiento de los parámetros cinéticos, aunque el grupo que contenía GSH mostró levemente un mejor efecto que el caso de la vitamina E.

Los resultados muestran en los grupos que contienen antioxidantes, que los espermatozoides recorren más distancia y se muestran más vigorosos (alta VCL y VAP), además de manifestar una progresividad mayor (alta VSL), pero muestran a lo largo de la experimentación trayectorias más sinuosas (baja LIN y SRT y elevada ALH), en el resto de los parámetros (WOB y BCF) no se constatan diferencias importantes, resultados que concuerdan Tejerina (2007), en una de sus subpoblaciones identificadas, de igual forma en concordancia con Bernal (2009), y puesto que en los tres trabajos se ha empleado el mismo tiempo de incubación previa a la valoración, nos hace pensar que tal vez dicho tiempo (6 min.) no es suficiente para que los espermatozoides recuperen su movilidad completamente. A pesar de ello, creemos que la adición de antioxidantes al diluyente utilizado en la preparación de las dosis comerciales destinadas a la IA en la especie porcina, podría mejorar los parámetros cinéticos del espermatozoide, lo que se puede traducir en mejores resultados de producción.

5.1.3 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutatión Reducido sobre la peroxidación lipídica en semen refrigerado.

Dado que la producción de radicales libres se lleva a cabo durante el metabolismo normal de las células (Halliwell, 1994), la eliminación total de la PL es un objetivo imposible y una serie de efectos negativos irreversibles en las funciones de los espermatozoides tienen que ser aceptados cuando se les somete a un período de conservación (Hammerstedt, 1993). Aunque la producción excesiva de radicales libres son especialmente perjudiciales para los espermatozoides, existe evidencia que sugiere que niveles bajos de ROS están implicados en el control fisiológico de una serie de funciones como hiperactivación espermática, capacitación y reacción acrosomal en los espermatozoides de los mamíferos (Aitken, 1995; De Lamirande *et al.*, 1997; O'Flaherty *et al.*, 1997).

Esta PL origina especies reactivas de oxígeno, las cuales incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos tanto inorgánicos como orgánicos. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias pueden incrementarse, lo cual puede producir daños significativos en las estructuras celulares. Las especies reactivas dañan la membrana celular y producen en el ADN la ruptura de las cadenas simples; además los radicales libres reaccionan con los ácidos grasos polinsaturados, los nucleótidos y las proteínas intracelulares, causando daño a los tejidos (Chew, 1996).

Teniendo en cuenta lo comentado y en vista de nuestros resultados podemos decir que la adición de α -tocoferol en el diluyente de almacenamiento previene el deterioro de los parámetros de calidad del semen, y en consecuencia protección contra la PL que acarrea una mejor resistencia en la viabilidad de las células espermáticas conservadas hasta 7 días a 15°C, pues se constata una diferencia estadísticamente significativa cuando se añade los antioxidantes empleados en comparación con el grupo control, resultados que concuerdan con los obtenidos por Cerolini *et al.*(2000), quienes emplean α -tocoferol en el diluyente de conservación en semen de verraco, observando una clara respuesta favorable del antioxidante en contra de PL, y como consecuencia, se puede esperar un aumento de la capacidad fecundante del semen almacenado en refrigeración.

De igual forma en semen de gallo, Surai *et al.* (1997a;b) observan que tras inducir PL *in vitro*, la adición de α -tocoferol evita la pérdida de la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfolípidos de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana de los espermatozoides, que como hemos mencionado anteriormente, en blanco de los ROS provocando en daños irreversibles. Además de los estudios con otras especies, el alcance y la forma del efecto protector de α -tocoferol, u otros antioxidantes, muestran variaciones distintas (Pursel, 1979; Watson y Anderson, 1983; Aitken *et al.*, 1989; Blesbois *et al.*, 1993; Griveau y Lannou Le, 1994; Donoghue y Donoghue, 1997).

Los mecanismos por los cuales las especies reactivas de oxígeno alteran el correcto funcionamiento de la célula espermática, son diversos: se sabe que uno de ellos es la PL de los ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana plasmática de espermatozoides (Aitken y Fisher, 1994), y puesto que en la especie porcina hay una gran presencia de ellos, esta especie es particularmente sensible a dicho daño. Este proceso juega un papel importante en la fisiopatología de la infertilidad masculina (Aitken *et al.*, 1993b). Los ROS aumentan la fragmentación del ADN (Lopes *et al.*, 1998), provocan modificaciones en el citoesqueleto (Hindshaw *et al.*, 1986), afectan el desarrollo del axonema (De Lamirande y Gagnon, 1992), e inhiben la fusión del espermatozoide con el ovocito (Aitken *et al.*, 1993a). Debido a estos factores adversos provocados por un desequilibrio en la condición pro/antioxidante, es necesaria la adición de compuestos que mitiguen tal daño, y de esta manera mejorar la calidad de las dosis seminales empleadas en la IA.

Como se hace patente en el trabajo realizado por Bucak *et al.* (2007), quienes utilizan compuestos para disminuir los daños provocados por los ROS en el semen de morueco, entre ellos el GSH, mostrando tener un efecto positivo en la protección contra dichos daños, aunque no fue el compuesto que mejor respondió en el experimento de estos autores, pudiendo esto, ser debido a la temperatura empleada en la conservación, o como hemos mencionado en epígrafes anteriores, a la composición del diluyente utilizado, o a la prueba empleada en la valoración, comparando los resultados de Bucak *et al.* (2007), con nuestro trabajo, en el que el GSH presenta valores inferiores en cuanto a presencia de PL, aunque no suficientes para constatar una diferencia estadística en comparación al grupo de la vitamina E, aunque debemos resaltar que los valores de PL en el grupo GSH fueron los más bajos en toda la experimentación, por lo tanto podemos decir que según

nuestra experiencia el uso de GSH y vitamina E, es una excelente opción en el intento de mantener y prolongar la calidad espermática en las dosis seminales porcinas conservadas durante 7 días. Conclusiones que coinciden con Michael *et al.*, (2009) quienes observan que el semen canino añadido con distintos compuestos antioxidantes, entre ellos vitamina E, presentan una menor cantidad de ROS en comparación al grupo que no contiene ningún antioxidante, además de presentar una mejor calidad espermática en los demás parámetros de la misma forma que ocurre en nuestro trabajo.

El efecto protector de los compuestos antioxidantes que hemos empleado en nuestra experiencia, han funcionado favorablemente debido probablemente a que provocan estabilización de los lípidos y evitan el daño a las mitocondrias pues evita la propagación de los ROS, por otro lado el GSH en interacción con la GPx y a través de una reacción de reducción, convierte los ROS en sustancias inocuas para los espermatozoides. Dicha protección se ha constatado en diversos trabajos, en la especie equina (Aurich *et al.*, 1997; Baumber *et al.*, 2000), en semen de conejo (Alvarez y Storey, 1983) y de otros compuestos protectores en semen de morueco (Maxwell y Stojanov, 1996).

En cuanto a la utilización de compuestos antioxidantes con la intención de aumentar la vida útil de las dosis seminales en la especie porcina, ha sido muy poco estudiada, aun así, y en base a nuestros resultados y a la discusión que sea ha hecho de él en los párrafos anteriores, podemos decir, que en la industria porcina puede ser una acertada acción la utilización de compuestos antioxidantes en su línea de producción, para mejorar y mantener la calidad de las dosis seminales por más tiempo.

5.2 EXPERIMENTO 2. CONTROL DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DEL SEMEN CRIOPRESERVADO DE VERRACO MEDIANTE ANTIOXIDANTES (α -Tocoferol /Glutación reducido), Y SU REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA.

5.2.1 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutación Reducido sobre la integridad de la membrana, estado del acrosoma y movilidad en semen criopreservado.

En los últimos años, nuevos sistemas para envasar las dosis espermáticas (Eriksson y Rodríguez-Martínez, 2000); la optimización del protocolo de criopreservación (Carvajal *et al.*, 2004) y la necesidad de complementar los diluyentes con antioxidantes (Roca *et al.*, 2004; 2005) han repercutido positivamente en mejorar la calidad espermática posdescongelación; sin embargo, sigue siendo un objetivo mejorar los rendimientos productivos del semen criopreservado.

Los parámetros de calidad espermática en general, tras el proceso de criopreservación sufren una disminución, que resulta en un porcentaje de concepción baja tras el uso de espermatozoides criopreservados para inseminación artificial.

La alta sensibilidad de los espermatozoides de verraco frente a los descensos bruscos de temperatura, queda patente por la pérdida de viabilidad que sufren, que responde a los cambios que el proceso de criopreservación causa en estructuras celulares, como son la membrana plasmática, acrosomal o mitocondrial, causando una disminución en la capacidad selectiva de la membrana, lo que provoca dentro de otras cosas, disminución en la capacidad respiratoria y por la tanto en la generación de energía (Watson, 1981; Watson y Plummer, 1985; De Leeuw *et al.*, 1990b; González-Urdiales, 2010), lo que se manifiesta principalmente en la reducción del movimiento espermático.

Con el fin de combatir a los ROS que representan una causa del daño a la célula durante el proceso de conservación, y reducir su acción dañina en condiciones fisiológicas normales, un complejo sistema antioxidante está presente en los espermatozoides y plasma seminal. En semen de verraco, la suplementación de vitamina E protege la viabilidad en los espermatozoides y fue capaz de inhibir la PL (Brzezinska-Slebozinska *et al.*, 1995; Cerolini *et al.*, 2000).

En el proceso de criopreservación del semen, la suplementación de antioxidantes ha demostrado ejercer un efecto positivo sobre la movilidad, el potencial de la membrana mitocondrial y la integridad de la membrana plasmática (Peña *et al.*, 2003; 2004). En nuestro trabajo la adición de compuestos antioxidantes (vitamina E y GSH), en el proceso de congelación de semen de verraco, muestra tener una influencia positiva sobre el mantenimiento de la integridad de la membrana y estado del acrosoma reflejándose en la diferencia estadística encontrada ($p < 0.001$), no siendo así en el caso del porcentaje de movilidad, donde no se constata ninguna diferencia entre los antioxidantes con respecto al grupo control, aunque la tendencia de los resultados muestran menor presencia de PL en los grupos adicionados con antioxidantes.

A lo largo de la incubación realizada poscongelación (0-4 horas a 37°C) se aprecia una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.001$) entre GSH y el control en todas las mediciones realizadas, en el caso de la vitamina E, los únicos momentos en que no se constata diferencia alguna fue en la hora 0 y a la hora 1 en la prueba de integridad de la membrana, y como se menciona en el párrafo anterior, en el caso de la movilidad no se aprecia ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los dos antioxidantes testados.

Si comparamos estos resultados con los que obtienen Yeon-Ji *et al.* (2009), quienes valoran el efecto de la suplementación de vitamina E, en distintas concentraciones, durante el proceso de criopreservación de semen de verraco sobre las características espermáticas, se aprecia una concordancia con nuestros resultados, pues dichos autores obtienen los valores más altos para la movilidad total en el grupo que emplea la misma concentración que nosotros (200µM). De igual forma, en el caso de la valoración de la integridad de la membrana y del estado del acrosoma, aunque no presenta los mejores resultados, estos se encuentran por encima del grupo control; debemos hacer la aclaración que aunque no obtuvimos diferencia significativa en los valores de movilidad en el caso de los grupos que contenían antioxidantes, los valores de dicho parámetro se mostraron por encima del grupo control. En nuestra experiencia se han obtenido valores superiores en relación a los autores mencionados, aun cuando nosotros hemos realizado una incubación más prolongada que Yeon-Ji *et al.* (2009), dichas diferencias pueden ser debidas a la metodología empleada para la valoración de cada una de las pruebas (Tejerina, 2007), a pesar de ello se hace patente el poder protector de los antioxidantes en el proceso de criopreservación, y en nuestro estudio particularmente el poder protector del GSH en comparación con la vitamina E.

De igual forma, Satorre *et al.* (2007) incluyen α -tocoferol en el diluyente de congelación de semen porcino, obtienen los mejores resultados posdescongelación en presencia del antioxidante, de la misma manera se puede apreciar en el trabajo de Breininger *et al.* (2005), quienes también emplean un análogo de la vitamina E, a pesar de que en los trabajos citados anteriormente constatan una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en cuanto a movilidad a favor del antioxidante, en nuestro caso no lo hemos detectado, tal vez debido a diferencias como la raza del verraco y las pruebas de valoración; cabe mencionar en este punto, que a pesar de no constatar ninguna diferencia estadística en cuanto a porcentaje de movilidad, en los demás parámetros como vitalidad y estado del acrosoma si existe ($p < 0.001$), de la misma forma que demostraran Satorre *et al.* (2007) y Breininger *et al.* (2005). Existen reportes contradictorios respecto a los efectos de la suplementación de antioxidantes sobre la movilidad en semen líquido y descongelado como se observa en Askari *et al.* (1994) y de igual forma en la especie humana en Donnelly *et al.* (1999).

Comparando nuestros resultados con Peña *et al.* (2003), quienes emplean el mismo análogo de α -tocoferol y valoran el efecto de dicho antioxidante sobre la movilidad y el potencial de la membrana mitocondrial; podemos decir, que dichos resultados concuerdan con los nuestros al mostrar una mejor calidad espermática posdescongelación en presencia del análogo de la vitamina E; también creemos importante decir que Peña *et al.* (2003) obtienen los mejores resultados cuando emplean la misma concentración de vitamina E que nosotros (200 μ M), dichos resultados se constatan si los comparamos con Peña *et al.* (2004), quienes además de probar el efecto positivo del α -tocoferol en la criopreservación del semen porcino y obtener mejores resultados en presencia de dicho compuesto, sugieren que la efectividad de la protección de la vitamina E depende de la porción del eyaculado en la que se suplemente.

Por otra parte, el proceso de congelación del semen está asociado con una reducción en la concentración de GSH en la especie porcina (Gadea *et al.*, 2004), bovina (Bilodeau *et al.*, 2000) y en semen humano (Molla *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que el GSH es el principal compuesto antioxidante no enzimático, esto supone un desequilibrio en la acción de regulación del daño oxidativo.

Gadea *et al.* (2004), cuantifican la disminución de GSH en el proceso de congelación de semen de verraco, encuentran que con respecto al semen fresco, el semen descongelado cuenta con

un 32% menos de dicho compuesto, dicha disminución puede ser una causa por las cuales el semen porcino criopreservado presenta menos supervivencia que el semen fresco, de igual forma estos autores evalúan el efecto de la adición de GSH en el diluyente de congelación y descongelación, en la misma concentración empleada en nuestro trabajo (5mM), constatan un efecto beneficioso sobre los parámetros de calidad espermática solo cuando se añade el antioxidante al diluyente de descongelación, no apreciándose cuando se añade en el diluyente de congelación, dichos resultados no coinciden con los obtenidos por nosotros, pues constatamos un efecto positivo en cuanto a la protección de la membrana plasmática y el estado del acrosoma del GSH añadido en el diluyente de congelación, aunque se ha comprobado por Gadea *et al.* (2005b) que la adición de GSH en el diluyente de congelación, muestra un mejoramiento en cuanto a la calidad de parámetros como la movilidad, integridad de membrana y estado del acrosoma, dichas contradicciones, pueden ser debidas a la metodología empleada en la valoración de dichos parámetros.

Los autores mencionados en el párrafo anterior también han señalado resultados contradictorios entre sus propios trabajos, en cuanto a cual concentración de GSH tiene mejor efecto en la protección del espermatozoide en el proceso de congelación de semen, pues Gadea *et al.* (2005a) atribuyen los mejores resultados a una concentración de 5mM, y Gadea *et al.* (2005b) afirman que se obtienen mejores resultados con 1mM de GSH. Comentado lo anterior es evidente que es necesario un mayor trabajo en la investigación del proceso por el cual el GSH ejerce su función protectora, para de esta manera poder actuar en consecuencia y obtener el máximo rendimiento de dicho compuesto.

Los resultados anteriores, indican que los antioxidantes utilizados en esta experiencia juegan un papel importante en la protección de la calidad espermática durante la congelación y descongelación del semen porcino, en el caso del análogo del α -tocoferol en nuestro trabajo, que concuerda con Yeon-Ji *et al.* (2009), quienes constatan los mejores resultados de este antioxidante en una dosis de 200 μ M, de la misma forma que Peña *et al.* (2003); mencionan estos autores que la capacidad que tiene la vitamina E de romper los enlaces provocados entre los ROS y los ácidos grasos poliinsaturados de la cadena de lípidos de la membrana, hacen de este compuesto un elemento muy importante en la conservación de la calidad del semen en el proceso de conservación (Yeon-Ji *et al.*, 2009). Por otro lado, y debido a nuestros resultados en relación a la movilidad, debemos mencionar que, existen trabajos contradictorios con respecto al efecto de los antioxidantes

sobre dicho parámetro, tanto en semen fresco como descongelado en varias especies incluida la humana (Askari *et al.*, 1994; Aurich *et al.*, 1997; Donnelly *et al.*, 1999; Maxwell y Stojanov, 1996; Upreti *et al.*, 1997).

Las contradicciones en los resultados mencionadas anteriormente se pueden deber a la fracción del eyaculado empleada por los distintos autores, pues como menciona Peña *et al.* (2003), la composición de las distintas fracciones del eyaculado, y la sensibilidad de los espermatozoides a dichas fracciones puede condicionar el efecto de los antioxidantes añadidos. Por lo tanto, es necesario seguir investigando el efecto de los antioxidantes sobre los parámetros de calidad del semen congelado de verraco, y estandarizar un protocolo de adición de dichos compuestos, para que se pueda incorporar de manera satisfactoria a la biotecnología de la IA.

Los dos tipos distintos de antioxidantes empleados en esta experiencia, ambos muestran un efecto positivo sobre la calidad espermática y presencia de PL con respecto al grupo control, aunque el grupo que presenta y consideramos que tiene los mejores resultados es el grupo que contiene GSH, pues a lo largo de la experiencia presenta mejores valores en las diversas pruebas realizadas.

5.2.2 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutati3n Reducido sobre los parámetros cinéticos en semen descongelado.

Como mencionamos en epígrafes anteriores, el valor real de los programas computarizados que valoran los parámetros cinéticos de los espermatozoides, se aprecia en el campo de la investigación, pues el continuo trabajo que se realiza para conseguir que los espermatozoides resistan mejor el proceso de criopreservación, necesita de técnicas que sean capaces de detectar cambios en los patrones de movimiento que no son perceptibles por el ojo humano.

Un ejemplo claro de lo mencionado en el párrafo anterior lo vemos plasmado en nuestros resultados, pues mientras no obtenemos diferencias significativas en cuanto a movilidad total, entre ninguno de los grupos analizados, si que las hubo en parámetros cinéticos analizados con un programa CASA. En los resultados para la hora 0, se constatan diferencias significativas en todos los parámetros a excepción de WOB y BCF, el caso de la valoración realizada en la hora 1 se constatan diferencias para VCL, VSL, VAP, ALH y BCF, en la hora 2 no se constata ninguna diferencia significativa entre ningún grupo, a las 3 horas posdescongelación solo se aprecia una diferencia significativa para WOB en el grupo que contiene la vitamina E, y para la hora 4 se encuentran diferencias significativas en los parámetros VCL, VSL, VAP, WOB y ALH, todas las diferencias significativas se presentan en el grupo que contiene GSH a excepción de la hora 3, que como se ha señalado, en ese momento la única diferencia se constató en el grupo de la vitamina E. Estos resultados muestran que el GSH claramente y aunque a nivel de porcentaje de movilidad no se aprecian diferencias, el efecto que ejerce dicho compuesto se ve reflejado en los parámetros cinéticos, que reflejan la movilidad individual y progresiva que presentan los espermatozoides, evaluada de manera objetiva.

Según nuestros resultados al momento de la descongelación (hora 0) los espermatozoides en nuestro experimento muestran recorrer mas distancia por unidad de tiempo (alta VCL y VSL), de igual forma se manifiestan más vigorosos (alta VAP), además de presentar una trayectoria mas recta (alta LIN y SRT), aunque presentan un alta ALH que significa un movimiento sinuoso, todas estas diferencias encontradas en la hora 0 solo se apreciaron en el grupo que contenía GSH con respecto a los demás.

El comportamiento de los espermatozoides en la hora 1 se mantiene de manera similar, aunque se pierde la deferencia significativa en cuanto a la rectitud del desplazamiento, pero si se aprecia en la distancia recorrida y en la vigorosidad (alta VCL, VSL y VAP) pues en este momento de la valoración se constata una diferencia significativa en BFC (alta) que significa mayor vigor de los espermatozoides, en este caso particular la diferencia se constata en los dos grupos que contenían antioxidantes con respecto al grupo control, aunque el mejor comportamiento una vez más se apreció en el grupo de GSH. Para el caso de la hora 2 del análisis no se aprecia ninguna diferencia, a las 3 horas de incubación solo se aprecia una sola diferencia significativa en el grupo de la vitamina E para el parámetro WOB lo que indica una trayectoria circular de los espermatozoides, finalmente en la hora 4 de la prueba el grupo que presenta diferencias significativas fue el que contiene GSH, y se constata que los espermatozoides en este momento del análisis manifestaron tener una mayor desplazamiento y vigorosidad (alta VCL, VSL y VAP) aunque también presentaron un desplazamiento circular y sinuoso (alta WOB y ALH) posiblemente debido a que la incubación (6 min.) a 37°C no es suficiente para que la célula recupere totalmente su movimiento.

Flores *et al.* (2009), quienes aunque no emplean ningún compuesto antioxidante, si emplean el mismo sistema CASA y el mismo tipo de diluyente utilizado en nuestra experiencia, dichos autores pretenden valorar el grado de resistencia de los espermatozoides porcinos al proceso de congelación. Muestran en sus resultados que los espermatozoides descongelados sufren, en cuanto a movilidad total, una disminución muy similar a la observada por nosotros, dichos autores constatan diferencias significativas en los parámetros VCL, VAP, STR y WOB que indican que los espermatozoides presentan movimientos no progresivos, aunque con cierta vigorosidad al tener una alta VAP. Si comparamos estos resultados con los nuestros podrían parecer muy similares, aunque tal vez la diferencia más interesante es que nosotros constatamos una diferencia en cuanto a VSL y LIN (más elevadas), lo cual indica una mayor ganancia neta de espacio y un desplazamiento más recto, e implica un mejor movimiento progresivo de los espermatozoides, dichas diferencias pueden ser atribuidas a la protección de los antioxidantes, que en el caso de nuestro experimento se puede atribuir a GSH, dicha protección se aprecia en tres de las 5 valoraciones realizadas por nosotros durante la incubación de los espermatozoides posdescongelación.

Por otra parte Casas *et al.* (2009), señalan valores muy similares a los obtenidos por nosotros en el mismo tiempo de incubación (4 horas) posdescongelación, para los parámetros cinéticos valorados, debemos tener en cuenta que ellos no utilizan ningún compuesto antioxidante en su experimentación, y aun así obtienen valores similares a los nuestros en los grupos añadidos con antioxidantes, tal vez esto debido a las características del experimento, aunque creemos que la comparación entre dichos trabajos es interesante, desde el punto de vista de la necesidad de seguir experimentando con la utilización de compuestos que amortigüen el daño provocado por el proceso de congelación a las células espermáticas, probar nuevas concentraciones y combinaciones de dichos compuestos.

Peña *et al.* (2003), añaden el mismo análogo de la vitamina E que el empleado en nuestro trabajo, dichos autores obtienen en sus resultados, un desplazamiento más recto, en comparación a su grupo control con el que contenía antioxidante a las 2 horas posincubación, comparando estos resultados con los nuestros y aunque específicamente en ese momento de valoración nosotros no constatamos ninguna diferencia, si la encontramos en el resto de la incubación. Podemos decir igual que Gadea *et al.* (2004), quien usa GSH en distintas concentraciones, una de ellas la misma que en nuestro trabajo, que con la adición de antioxidantes al diluyente en el proceso de congelación se puede ayudar a mantener la movilidad espermática (Lindemann *et al.*, 1989; Bilodeau *et al.*, 2000, Foote *et al.*, 2002; Funahashi y Sano, 2005). Aunque debemos mencionar que según Gadea *et al.* (2005a), el mejor momento de adición del GSH es en el diluyente de descongelación, resultados que discrepan de los nuestros, pero sin embargo concuerdan con un trabajo realizado por los mismo autores mencionados ese mismo año (Gadea *et al.*, 2005b), donde los mejores resultados se obtienen añadiendo el GSH en el diluyente de congelación.

Es muy claro, en base a los resultados obtenidos en nuestra experiencia, que la valoración subjetiva de la movilidad, no es un indicador fiable de la calidad espermática posdescongelación (Verstegen *et al.*, 2002), programas computarizados como los sistemas CASA nos permiten valorar de manera objetiva diferentes características presentes en el movimiento de los espermatozoides, además de poder medir otras parámetros espermáticos (Peña *et al.*, 2003).

Como se ha mencionado anteriormente en la revisión bibliográfica el proceso de congelación causa un desequilibrio en el intercambio de iones entre el medio intra y extra celular, lo que altera de manera severa aspectos del metabolismo celular.

Una de esas alteraciones se causa al metabolismo energético, produciéndose una menor incorporación de fructosa y de oxígeno, acompañados de una caída importante en los niveles de ATP (White, 1993), como consecuencia de un funcionamiento deficiente de las mitocondrias, ya sea por las lesiones a nivel de la membrana mitocondrial, o por la falta del equilibrio iónico indispensable para el correcto funcionamiento de esta estructura celular, por lo tanto una deficiencia en la correcta funcionalidad de las mitocondrias va a tener como consecuencia una paulatina disminución en el movimiento espermático, que culminará con el total cese de movimiento.

En el caso de las alteraciones del acrosoma, pueden ser provocadas de igual forma que en el caso de la movilidad, por el mal funcionamiento del plasmalema, por lo tanto una deficiencia en la función selectiva de la membrana causa un aumento en la concentración de calcio intracelular que ocurre durante el enfriamiento, ya que estimula procesos dependientes de él, como la capacitación espermática y la posterior reacción acrosomal (Yanagimachi, 1994, González-Urdiales, 2010), hecho que se ha comprobado al inducir la reacción acrosómica mediante el empleo de ionóforos de Ca^{2+} (Januskauskas *et al.*, 2000).

Las alteraciones antes mencionadas son de gran importancia puesto que sin el correcto funcionamiento de la membrana acrosomal la fecundación no es posible, de igual forma sin la existencia de movimiento por parte de los espermatozoides, el encuentro y fusión con el ovocito no se llevara a cabo. Por lo tanto, las diferencias encontradas en este trabajo a favor de los grupos que contenían Vitamina E y GSH, se pueden atribuir a la protección que ejercen contra los ROS, que causan un desequilibrio en la estructura del plasmalema como consecuencia de la PL, y que provocan una reacción en cadena que tiene como consecuencia la pérdida de las funciones de la célula y finalmente su muerte.

5.2.3 Efecto del Análogo de la Vitamina E y del Glutati6n Reducido sobre la Peroxidaci6n Lipídica en semen criopreservado.

En el presente estudio la adici6n de antioxidantes durante el proceso de congelaci6n del semen porcino muestra ejercer un efecto positivo en los parámetros espermáticos, además de disminuir la presencia de PL en el semen.

Uno de los efectos deletéreos del proceso de criopreservaci6n es la generaci6n de ROS (Álvarez y Storey, 1992; O'Flaherty *et al.*, 1997; Chatterjee *et al.*, 2001), se ha demostrado que en la especie bovina la presencia de α -tocoferol en el diluyente de congelaci6n disminuye los niveles de PL (Dalvit *et al.*, 2005). Otros autores han empleado otros compuestos con la intenci6n de proteger al espermatozoide en el proceso de congelaci6n, y por lo tanto conseguir mejores índices de fertilidad, Roca *et al.* (2004) emplean un antioxidante sintético en semen de verraco, dichos autores encuentran que en presencia del antioxidante el MDA presente disminuye, Sari6zkan *et al.* (2009), utilizan compuestos como cisteína y taurina, estudian su efecto sobre el estrés oxidativo en semen de toro, constatando que en el caso de la taurina no se aprecia ning6n efecto positivo en el semen bovino, como lo mencionara tambi6n Bucak y Uysal, (2008), aunque contradicen a lo aportado por Atessahin *et al.* (2008), quienes mencionan que la presencia de taurina en el proceso de congelaci6n de semen de morueco disminuye la concentraci6n de MDA.

Bucak *et al.* (2008), valoran en semen descongelado de morueco, la presencia de MDA como indicador de los niveles de PL, en dicho trabajo emplean antioxidantes, dentro de los cuales se encuentra el GSH, dichos autores constatan que la adici6n de GSH no condujo a una disminuci6n de los niveles de PL, además no observan una disminuci6n significativa de la movilidad provocada por los niveles de PL, lo que les hace pensar que la PL no es al parecer un factor importante e influyente en la supervivencia espermática durante el proceso de criopreservaci6n, resultados que contrastan con los de Baumber *et al.*, (2000), que han demostrado una marcada disminuci6n en la movilidad espermática asociada a los ROS en la especie equina, tambi6n en contradicci6n con estudios realizados en humanos y ratones donde el deterioro del movimiento de los espermatozoides se observa cuando se realiza una incubaci6n en presencia de ROS (De Lamirande y Gagnon, 1992; Baiardi *et al.*, 1997); de igual forma no concuerdan los resultados de Bucak *et al.* (2008), con los nuestros puesto que constatamos que en presencia de GSH los niveles de PL se mantuvieron

significativamente por debajo de los observados en el grupo control, asimismo en la especie porcina Gadea *et al.* (2005a), señalan que en la presencia de GSH, los espermatozoides presentan una tendencia a mejorar la calidad espermática con respecto al grupo que no contiene antioxidante. Las diferencias entre los experimentos mencionados pueden deberse a la especie y a la metodología de valoración de la PL, pues debemos recordar que los espermatozoides en la especie porcina poseen la peculiaridad de contar con una gran cantidad de AGP en su membrana plasmática, característica que les hace especialmente sensible al proceso de congelación y al ataque de los ROS.

Gadea *et al.* (2004) indican en su trabajo que se aprecia una disminución en el contenido de GSH observado en los espermatozoides de verraco y se observa también una tendencia a aumentar su capacidad fecundante tras la adición de GSH al diluyente de congelación. Una relación entre el contenido de GSH en el esperma y en el plasma seminal e infertilidad ha sido previamente investigada en semen humano (Ochsendorf *et al.*, 1998; Raijmakers *et al.*, 2003), también entre el contenido de GSH en el esperma y su habilidad para penetrar el moco cervical en la especie bovina (Ochsendorf *et al.*, 1998).

Por otra parte Yue *et al.* (2010), concluyen en su trabajo que la suplementación con vitamina E puede mejorar la calidad seminal y aumentar la resistencia antioxidante de las mitocondrias en la especie ovina. Breininger *et al.* (2005) emplean un análogo de la vitamina E en semen porcino añadido al diluyente de congelación, encontrando dichos autores que la adición del antioxidante se traduce en una protección en contra de PL, lo que significa encontrar una mejor calidad espermática en los espermatozoides descongelados, los resultados de estos autores apoyan los obtenidos por nosotros, puesto que en nuestra experiencia tras la adición del análogo de la vitamina E al diluyente de congelación no se constata diferencia significativa en la disminución de PL, en comparación al grupo control, aunque si se aprecian valores inferiores en cuanto a presencia de MDA, lo que indica la tendencia de la vitamina E a disminuir la PL; dicha comparación, nos indica la necesidad de emplear distintas concentraciones de antioxidante para estudiar su efecto protector en el proceso de congelación, pues como hemos reflejado en nuestros resultados la presencia de antioxidantes en el diluyente de congelación muestra tener un efecto positivo sobre los parámetros espermáticos, como la integridad de la membrana y estado del acrosoma.

Yeon-Ji *et al.* (2009), mencionan que los antioxidantes pueden proteger contra los efectos de los ROS, específicamente la vitamina E, compuesto empleado por dichos autores en su trabajo, el α -tocoferol puede romper los enlaces covalentes que forman los ROS con los ácidos grasos presentes en la cadena lipídica, además de ser uno de los principales protectores de la membrana contra los ROS y PL. Aunque como hemos mencionado en el párrafo anterior en nuestra experiencia la utilización de un análogo de la vitamina E no presenta diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la protección contra la PL; sin embargo, sí que se constata dicha diferencia estadística cuando empleamos GSH en el proceso de criopreservación. Además de la protección contra la PL de los antioxidantes durante la criopreservación, ofrece en efecto positivo sobre la movilidad, potencial de resistencia de la membrana mitocondrial, e integridad de la membrana (Peña *et al.*, 2003; 2004).

Yeon-Ji *et al.* (2009) concluyen en su trabajo, que la suplementación de α -tocoferol en el diluyente de congelación se traduce en un efecto positivo sobre la supervivencia de los espermatozoides descongelados, además de proteger a la célula contra la apoptosis ya que el empleo de antioxidantes reduce la expresión de los genes apoptóticos por disminuir la fragmentación del ADN.

A lo largo de nuestra experiencia, y como se ha discutido anteriormente, el uso de antioxidantes ha reflejado tener un efecto positivo sobre los parámetros de calidad, como son la integridad de la membrana, el estado del acrosoma y la movilidad, aunque en la movilidad total no se aprecia diferencia significativa, sí que la hay en cuanto a parámetros cinéticos que denotan movimiento progresivo y fuerza en los espermatozoides como son VSL y VAP (Tejerina, 2007). Por lo tanto, creemos que la utilización de antioxidantes en el proceso de congelación del semen porcino es una buena opción para mitigar los daños producidos por dicho proceso a las células espermáticas.

De igual forma, basándonos en los resultados de nuestra experiencia podemos decir que los dos compuestos empleados (análogo de vitamina E y GSH), muestran tener una capacidad protectora sobre la viabilidad de los espermatozoides descongelados, en cuanto a la protección contra los ROS principales causantes de la PL, hemos encontrado que solo el GSH protege de

manera más eficiente los parámetros de calidad seminal así como también protege mejor a las celula espermáticas contra la PL.

6. Conclusiones

Teniendo en cuenta el planteamiento y el desarrollo experimental que se ha seguido en este trabajo de investigación, y una vez analizado los resultados obtenidos, podemos formular las siguientes conclusiones.

PRIMERA: En el semen refrigerado a 15° C de verraco se aprecia una disminución, altamente significativa desde el punto de vista estadístico ($p < 0,001$), tanto en el día 5 como en el día 7 de su conservación de la peroxidación lipídica de la membrana espermática, cuando se añaden de forma independiente dos antioxidantes no enzimáticos (análogo de α -tocoferol -200 μ M-, o glutatión reducido -5 mM-) al diluyente empleado en la elaboración de las dosis seminales.

SEGUNDA: En el caso del semen criopreservado, solamente el glutatión reducido añadido al diluyente de refrigeración, produce una disminución estadísticamente con una alta significación en el control de la peroxidación lipídica, tras someter a las dosis seminales a un test de termorresistencia de cuatro horas de duración una vez que se realiza la descongelación.

TERCERA: Tanto en el semen refrigerado como criopreservado la adición de ambos antioxidantes testados producen un incremento, estadísticamente con una alta significación, de la integridad de membrana (porcentaje de espermatozoides vivos ó vitalidad) con respecto al control. Además, en el semen criopreservado, se aprecia también que el efecto protector del glutatión reducido es superior, y con carácter desde el punto de vista estadístico altamente significativo, con respecto al α -tocoferol al final del test de termorresistencia.

CUARTA: En cuanto a la integridad del acrosoma, ambos antioxidantes producen un efecto protector, siendo altamente significativo estadísticamente, en el caso del semen refrigerado, tanto en el día quinto como en el séptimo de la conservación a 15°C. De igual forma, en el semen criopreservado ambos antioxidantes mejoran la integridad de membrana con respecto al control, pero solamente el glutatión reducido lo hace con carácter estadísticamente significativo en todas las horas del test de termorresistencia, mientras que el α -tocoferol solamente en las tres últimas.

QUINTA: Los antioxidantes incrementan de forma significativa el porcentaje total de movilidad espermática, con respecto al control, en el día cinco y siete de conservación en el caso del semen

refrigerado, no apreciándose ninguna diferencia estadísticamente significativa, en ninguna de las horas del test de termorresistencia en el caso del semen criopreservado.

SEXTA: El análisis de los parámetros cinéticos mediante un sistema computarizado (CASA), muestran para el semen refrigerado, que ambos antioxidantes cambian dicha cinética con respecto a los controles, toda vez que los espermatozoides se muestran más vigorosos (VAP), e incrementan su velocidad curvilínea (VCL), utilizando, sin embargo, trayectorias más sinuosas (baja LIN y STR, y elevada ALH).

SEPTIMA: En el caso del semen criopreservado, las variaciones cinéticas inducidas por los antioxidantes son menos intensas que en el refrigerado, constatándose significación estadística únicamente para el caso del glutatión reducido. Así, en el primer control realizado después de la descongelación, es el glutatión reducido el único que eleva casi todos los parámetros cinéticos de forma significativa ($p \leq 0,05$), con excepción del WOB y BCF, tanto con respecto al control como con respecto al α -tocoferol, efecto que se pierde a medida que avanza el test de termorresistencia, de forma y manera que desaparece prácticamente hasta el último control realizado en que nuevamente el glutatión reducido es capaz de elevar los parámetros cinéticos estudiados, a excepción de la linealidad (LIN), índice de rectitud (STR) y frecuencia de batido de cola (BCF).

7. Resumen

La utilización del semen porcino en la IA se ha decantado sobre todo, del lado del semen refrigerado, debido a que las características de la membrana del espermatozoide porcino, hacen que la congelación y descongelación del semen provoque una marcada disminución en la viabilidad de las células espermáticas. Por lo tanto las ventajas que supone la congelación de material seminal, como; mayor control sanitario que se puede ejercer, una mayor capacidad de almacenamiento en espacio y tiempo, además de la capacidad de mantener posible la IA con semen de alto valor genético a lo largo de mucho tiempo aun cuando el macho donante no se encuentre en el mismo sitio o ya no exista pierdan cierto valor. En cuanto al semen refrigerado, la conservación de las dosis seminales a 15°C supone menos complejidad en el momento de IA, además de que la preparación es más fácil y la pérdida de la calidad espermática no es tan acusada como en el caso del semen criopreservado.

El centro tecnológico de inseminación (CENTROTEC), donde se realiza este trabajo, prepara un gran número de dosis seminales todas las semanas, estas dosis son refrigeradas a 15°C, dichas dosis tienen una fecha límite de uso, esta fecha de caducidad viene dada en función de las pruebas que se realizan para determinar hasta qué punto en el tiempo, los espermatozoides de las dosis seminales mantienen su calidad, en cuanto a la integridad de la membrana plasmática, integridad del acrosoma y una movilidad, parámetros que deben presentar niveles aceptables. La disminución de dichos parámetros determina hasta qué fecha es prudente o no emplear la dosis en la IA. Esta situación repercute directamente sobre el número de granjas a las cuales se les pueden enviar las dosis, dependiendo de la distancia del centro de producción.

Ya sea en semen refrigerado o congelado-descongelado, existen fenómenos que determinan la resistencia de las células espermáticas a la conservación, provocando daño a los espermatozoides, en este trabajo, se ha considerado al proceso de PL como uno de los más importantes, puesto que ocurre de manera inevitable, pues el propio metabolismo (respiración) de los espermatozoides es precursor de este proceso dañino.

Por tal motivo es que el objetivo principal de este trabajo es, intentar mediante la incorporación de compuestos antioxidantes (vitamina E-200µM- y glutatión reducido-5mM-), en el diluyente de las dosis refrigeradas a 15°C y en el diluyente de refrigeración empleado en el proceso

de congelación del semen, con la finalidad de disminuir el daño que se produce, en los dos tipos de conservación, a los parámetros de calidad seminal y de la misma forma la presencia de PL.

Para lograr realizar los objetivos planteados, se distribuyó el trabajo experimental en dos experimentos, el primero de ellos se basa en la valoración del efecto de los antioxidantes sobre dosis comerciales, elaboradas de la misma manera que se hace para su comercialización y conservadas mediante refrigeración a 15°C durante 7 días, las concentraciones utilizadas son 200µM en el caso del análogo de la vitamina E y para el caso del glutatión reducido de 5mM. Se realizaron pruebas de la integridad de la membrana mediante su análisis con tinción con yoduro de propidio/carboxifluoresceína clasificando a los espermatozoides como vivos o muertos si presentaban coloración verde o roja respectivamente, los resultados se expresan como porcentaje de células vivas, en el caso del análisis del estado del acrosoma se empleo contraste de fases negativo, cuantificando en número de células sin ningún tipo de alteración en el acrosoma, de igual forma los resultados se expresan en porcentaje de células con el acrosoma intactos, en cuanto a la movilidad esta se evaluó con la ayuda de un programa informático (ISAS[®]), con el cual se analiza el porcentaje de movilidad, y la evolución de los parámetros cinéticos (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF).

En cuanto a la presencia de peroxidación lipídica, esta se valora mediante la cuantificación de MDA, que es un producto de la PL, empleando la técnica de los TBARS, los resultados se expresan como mmoles de TBARS/10⁶ de espermatozoides. Todas las valoraciones realizadas con la finalidad analizar en efecto de los antioxidantes sobre las dosis seminales porcinas, se realizaron en el día 0, día 5 y día 7 después de la extracción del semen.

Para la realización del segundo experimento, se emplearon los mismos antioxidantes y en las mismas concentraciones que en el caso del primer experimento. La incorporación de dichos antioxidantes se realiza en el diluyente de refrigeración durante el proceso de congelación del semen de verraco, con la intención de proteger a las células espermáticas, desde el inicio del descenso de temperatura.

Se emplearon las mismas técnicas que en el primer experimento para valorar los distintos parámetros de calidad seminal y PL, una vez hecha la descongelación se sometió a las células

espermáticas a un estrés por calor, mediante una incubación a 37°C durante 4 horas, las valoraciones se realizaron al momento de la descongelación y hasta 4 horas siguientes. Por otra parte la cuantificación del MDA se realizó a los 30 min tras la descongelación.

Los resultados obtenidos tras la realización de todas las pruebas, muestran el efecto protector que los antioxidantes tienen sobre los parámetros de calidad espermática, durante los 7 días de incubación de las dosis seminales y durante las 4 horas de incubación del semen descongelado en un test de termorresistencia, los grupos que contienen ya sea el análogo de la vitamina E o GSH, presentan los valores más altos en cuanto a porcentaje de células espermáticas que mantenían intacta su membrana y así mismo mantenían intacto su acrosoma, en cuanto al mantenimiento de la movilidad espermática, los grupos suplementados con antioxidantes presentaron los porcentajes de movilidad más altos y mejor calidad de movimiento durante la incubación.

A pesar de que los dos antioxidantes empleados funcionaron favorablemente en comparación al grupo control, es importante destacar que los mejores resultados a lo largo de la experiencia, en semen refrigerado y en semen descongelado, se aprecian en el grupo que contiene GSH. En cuanto a la presencia de PL los antioxidantes muestran claramente un efecto positivo, pues los grupos que contenían el análogo de la vitamina E o GSH, presentaron los niveles más bajos de MDA, en semen refrigerado y descongelado, aunque específicamente el semen descongelado entre el grupo que contenía vitamina E y el control no se constata diferencia estadísticamente significativa los valores del grupo que contiene antioxidante muestra valores más bajos de MDA. Siendo una vez más el GSH el que presenta los mejores resultados para los dos tipos de conservación seminal.

Por lo tanto la adición de los antioxidantes en el diluyente para la preparación de dosis comerciales manifestó tener un efecto positivo sobre la disminución de la PL y como consecuencia mantener los parámetro de calidad seminal en niveles aceptables, por lo tanto se podría plantear la posibilidad de poder ampliar la fecha límite de utilización de las dosis.

En cuanto a la incorporación de antioxidantes previamente a la congelación del semen, se comprobó que funciona de manera favorable en el mantenimiento de la calidad espermática y

presencia de PL, lo que puede ser una adecuada acción en el campo de la criopreservación de semen porcino.

8. Summary

The use of pig semen in AI has opted mostly on the side of chilled semen, because the characteristics of pig sperm membrane, make the semen freezing and thawing resulted in a marked decrease in cell viability sperm. Therefore the advantages of freezing of seminal material, such as, increased disease control can be exercised, greater storage capacity in space and time, plus the ability to maintain IA possible with semen from high genetic merit to long period of time even when the male donor is not on the same site or no longer exists, lose value. As the cooled semen, the conservation of semen doses at 15 ° C is less complexity at the time of IA, in addition to the easier preparation and the loss of sperm quality is not charged with in the case of semen cryopreserved.

The technology center is insemination (CENTROTEC), where this work is done, prepare a large number of semen doses every week, these doses are chilled to 15 ° C, these doses have a time limit for use, this expiration date is given according to tests done to determine to what point in time, sperm from seminal doses maintain their quality, in terms of plasma membrane integrity, acrosome integrity and mobility, parameters that should be at levels acceptable. The decrease of these parameters determined until the date it is prudent or not the dose used in the IA. This situation has a direct impact on the number of farms to which they can send doses, depending on the distance of the production.

Whether cooled semen or frozen-thawed, there are phenomena that determine the resistance of sperm cells to the conservation, causing damage to sperm, in this work, has been considered the process of PL as one of the most important, since inevitably occurs because the own metabolism (respiration) of the sperm acts as a precursor of the damaging process.

For this reason is that the main objective of this paper is trying through the incorporation of antioxidant compounds (vitamin E-200 μ M and glutathione reduced-5mM) in the diluent doses refrigerated at 15 ° C and cooling diluent employed in the freezing process semen, in order to minimize the damage that occurs in both types of maintenance to the parameters of semen quality and in the same way the presence of PL.

To achieve the objectives, experimental work was distributed in two experiments, the first of which is based on the assessment of the effect of antioxidants on commercial dose, prepared in the same manner as for marketing, the concentrations used are 200 μ M in the case of analog of vitamin E and 5mM for the case of glutathione. Tests were conducted on the integrity of the membrane analysis with propidium iodide staining / carboxyfluorescein classifying living or dead sperm as if they had green or red color respectively, the results are expressed as percentage of live cells, in the case of analysis of the integrity of the acrosome was employed negative phase contrast, quantifying the number of cells without any alteration in the acrosome, the same way the results are expressed as a percentage of cells with intact acrosome, as this mobility is evaluated with the help of a computer program (ISAS[®]), which analyzes the rate of mobility, and the evolution of the kinetic parameters (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF).

In the case of presence of lipid peroxidation, this is measured by quantification of MDA, a product of PL, using the technique of TBARS, the results were expressed as mmol TBARS/106 sperm. All assessments carried out in order to analyze the effect of antioxidants on the pig semen doses were performed on day 0, day 5 and day 7 after the extraction of semen.

To achieve the second experiment, we used the same antioxidants and in the same concentrations as in the case of cooled semen. The incorporation of these antioxidants is made in the diluent cooling during the freezing process, with the intention to protect sperm cells from the start of temperature decrease.

We used the same techniques as in the first experiment to evaluate the different parameters of semen quality and PL, once made thawing underwent sperm cells to heat stress by incubation at 37 ° C for 4 hours, Assessments were done at the time of thawing and up to 4 hours. Moreover, the quantification of MDA was performed at 30 min after thawing.

The results obtained after the completion of all tests show the protective effect of antioxidants have on sperm quality parameters during the days of incubation of the semen doses and during the hours of incubation of thawed semen, containing groups analogue of vitamin E or GSH, have the highest values in percentage of sperm cells that remained intact membrane and so it

remained intact acrosome, in the maintenance of sperm motility, antioxidant-supplemented groups had rates higher mobility and better quality of movement during the incubation.

Although the two antioxidants worked favorably compared to the control group, it is important that the best results with long experience in cooled semen and frozen-thawed semen, can be seen in the group containing GSH. As for the presence of antioxidants PL clearly show a positive effect, as groups containing analog of vitamin E or GSH, had the lowest levels of MDA in refrigerated and thawed semen, but specifically the thawed semen from containing vitamin E group and the control is not a statistically significant difference noted the values of the sample containing antioxidant lowest values of MDA. As GSH once again that the better outcomes for both types of seminal conservation.

Therefore the addition of antioxidants in the diluent for the preparation of commercial doses, was shown to have a positive effect on the reduction of PL and consequently maintain the parameter of semen quality at acceptable levels, so it could raise the possibility be able to extend the deadline for the use of doses.

The addition of antioxidants prior to the freezing of semen, was found to work favorably in the maintenance of sperm quality and presence of PL, which may be an appropriate action in the field of cryopreservation of boar semen.

9. Bibliografía

Aalseth, E.P. and Saacke, R.G. (1986). Vital staining and acrosomal evaluation of bovine sperm. *Gamete Res.* 15: 73-81.

Abad, M.; García, J.; Sprecher, D. and Kirkwood, R. (2006). Timing and supplemental seminal plasma effects on fertility of cryopreserved boar spermatozoa. *Reprod. Domest. Animals.* 41(4): 323.

Academia Biomédica Digital. Representación de los daños producidos por la peroxidación lipídica a la célula y producción de Malondialdehído. <http://vitae.ucv.ve/>. Consultado 15 junio 2010.

Aitken, R.J.; Clarkson, J.S. and Fisher, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod.* 40:183–187.

Aitken, R.J.; Buckingham, D. and Harkiss, D. (1993a). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 97:441–450.

Aitken, R.J.; Harkiss, D. and Buckingham, D.W. (1993b) Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 35:302–315

Aitken, R.J. and Fisher, S. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioassays.* 16: 259-267.

Aitken, R.J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev.* 7: 659–668.

Aitken, R.J and Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 122: 497 – 506.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J.D. (1989). *Molecular biology of the cell.* Second Edition. Garland Publishing. New York, EEUU.

Almlid, T. and Hofmo, P.O. (1996). A brief review of frozen semen applications under Norwegian AI swine conditions. *Reprod. Domest. Anim.* 31: 169–173.

Althouse, G.C. and Hopkins, S.M. (1995). Assessment of boar sperm viability using a combination of two fluorophores. *Theriogenology.* 43: 595-603.

Althouse, G.C. (1997). Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. *Compend. Cont. Educat. Pract. Vet.* 19: 777-782.

Althouse, G.C; Wilson, M.E; Kuster, C. and Parsley, M. (1998). Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology.* 50: 535-543

Alvarez, J.G. and Storey, B.T. (1983) Taurine, hypotaurine, epinephrine, and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod.* 29: 548–555.

Álvarez, J.G. and Storey, B.T. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.* 13: 232-241.

Alvarez, J.G. (2006) Estrés oxidativo, fisiología espermática y reproducción asistida. *Rev Iberoamericana de fertilidad.* XXVI Congreso Nacional SEF. Zaragoza, España.

Amann, R.P. (1989). Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. *J. Androl.* 10: 89-98.

Amann, R.P. and Katz, D.F. (2004). Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25: 317-325.

Aparicio, I.M. (2006). Estudio de la implicación de diferentes quinasas en la regulación de la función celular del espermatozoide de *Suis domesticus*. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Cáceres, España.

Askari, H.A.; Chec, J.H.; Peymer, N. and Bollendorf, A. (1994). Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze thaw process. *Arch Androl.* 33:11-5.

Atessahin, A.; Bucak, M.; Tuncer, B.P. and Kızıl, M. (2008). Effects of anti-oxidant additives on microscopic and oxidative parameters of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small. Ruminant. Research.* 77: 38-44.

Aurich, J.E.; Schönherr, U.; Hoppe, H. and Aurich, C. (1997). Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology.* 48: 185-192.

Baiardi, G.; Ruiz, R.D.; Fiol de Cuneo, M.; Ponce, A.A.; Lacuara, J.L. and Vincenti, L. (1997). Differential effects of pharmacologically generated reactive oxygen species upon functional activity of epididymal mouse spermatozoa. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75: 173-178.

Bailey, J.L. and Buhr, M.M. (1995). Regulation of internal Ca^{++} by chilled bull and boar spermatozoa. *Cryobiology.* 32: 259-269.

Ball, B.A. and Vo, A. (2001). Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. *J. Androl.* 22: 1061-1069.

Bamba, K. (1988). Evaluation of acrosomal integrity of boar spermatozoa by bright field microscopy using an eosin-nigrosin stain. *Theriogenology.* 29: 1245-1251.

Baumber, J.; Ball, B.A.; Gravance, C.G.; Medina, V. and Davies-Morel, M.C.G. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21. 6: 895-902.

Beckman, K.B. and Ames, B. (1998). The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev.* 78: 547-581.

Bell, M.; Wang, R.; Hellstrom, W.J. and Sikka, S.C. (1993). Effect of cryoprotective additives and cryopreservation protocol on sperm membrane lipid peroxidation and recovery of motile human sperm. *J. Androl.* 14: 472-478.

Berger, B. and Fischerleitner, F. (1992). On deep freezing of boar semen: investigations on the effects of different straw volumes, methods of freezing and thawing extenders. *Reprod. Dom. Anim.* 27: 266-270.

Berger, T. and Parker, K. (1989). Modification of the zona-free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with in vivo fertility. *Gamete. Res.* 22: 385-397.

Berger, T.; Turner, K.O.; Meizel, S. and Hedrik, J.L. (1989). Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol. Reprod.* 40: 525-530.

Bernal, S. (2009). Influencia del β -caroteno en la libido y calidad seminal del verraco. Tesis Doctoral. Universidad de León. España.

Bilodeau, J.F.; Chatterjee, S. and Sirard, M.A. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molec. Reprod. Dev.* 55: 282-288.

Blanco, O.M. (1998). Análisis objetivo de la motilidad espermática: evaluación de los espermatozoides de verraco y su relación con la fertilidad. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Murcia. España.

Blesbois, E.; Grasseau, I. and Blum, J.C. (1993). Effects of vitamin E on fowl semen storage at 4°C. *Theriogenology.* 39: 771-779.

Blokhina, O.; Virolainen, E. and Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany.* 91:179-194.

Bolarín, A.; Roca, J.; Rodríguez-Martínez, H.; Hernández, M.; Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. (2006). Dissimilarities in sows' ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology.* 65: 669-80.

Bonet, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; García, N.; Badía E.; Bassols, J.; Pruneda, A.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Casas, I. y Carreras, A. (2006). Análisis de la morfología espermática al microscopio electrónico de barrido y al microscopio electrónico de transmisión. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*”. Eds.: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona, Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España: 39-50.

Boyers, S.P.; Davis, R.O. and Katz, D.F. (1989) Automated semen analysis. *Curr.Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.* 12: 165-200.

- Breininger, E.; Beorlegui, N.B.; O'Flaherty, C.M. and Beconi, M.T.** (2005). Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. 63: 2126-2135.
- Brouwers, J.F.; Silva, P.F. and Gadella, B.M.** (2005). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*. 63: 458-469.
- Brzezinska-Slebodzinska, E.; Slebodzinski, A.B.; Pietras, B. and Wieczorek, G.** (1995). Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. *Biological. Trace. Element. Research*. 47: 69-74.
- Bucak, M. and Tekin, N.** (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small. Ruminant. Research*. 73:103–108.
- Bucak, M.; Atessahin, A. and Yüce, A.** (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze–thawing process. *Small. Ruminant. Research*. 75: 128–134.
- Bucak, N. and Uysal, O.** (2008). The role of antioxidants in freezing of Saanen goat semen. *Indian. Vet. J.* 85: 148–150.
- Buhr, M.M.; Canvin, A.T. and Bailey, J.L.** (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. *Gamete. Res.* 23: 441-449.
- Bwanga, C.O.; De Braganca, M.M.; Einarsson, S. and Rodríguez-Martínez, H.** (1990). Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *J. Vet. Med. A.* 37: 651-658.
- Bwanga, C.O.** (1991). Cryopreservation of boar semen. I: a literature review. *Acta Vet. Scand.* 32: 431-453.
- Bwanga, C.O.; Einarsson, S. and Rodríguez-Martínez, H.** (1991a). Deep freezing of boar semen packaged in plastic bags and straws. *Reprod. Dom. Anim.* 26: 117-125.
- Bwanga, C.O.; Hofmo, P.O.; Grevle, I.S.; Einarsson, S. and Rodríguez-Martínez, H.** (1991b). In vivo fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in plastic bags and maxi-straws. *J. Vet. Med. A.* 38: 281-286.
- Cárdenas, R.N. and Pedraza, C.J.** (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química*. 17(2):164-173.
- Carvajal, G.; Cuello, C.; Ruiz, M.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A. and Roca, J.** (2004). Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J. Androl.* 25: 389-396.
- Casas, I.; Sancho, S.; Briz, M.; Pinart, E.; Bussalleu, E.; Yeste, M. and Bonet, S.** (2009). Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*. 72.7: 930-948.

Casey, P.J.; Gravance, C.G.; Davis, R.O.; Chabot, D.D. and Liu, I.K. (1997). Morphometric differences in sperm head dimensions of fertile and subfertile stallions. *Theriogenology*. 47: 575-582.

Castillo, C.; Benedito, L.J.; López-Alonso, M.; Miranda, M. y Hernández, J. (2001). Importancia del estrés oxidativo en el ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Arch. Med. Vet.* 33 (1): 204 – 218

Cerolini, S.; Maldejian, A.; Surai, P. and R. Noble. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Reprod. Sci.* 58:99–111.

Cerolini, S.; Maldjian, A.; Pizzi, F. and Gliozzi, T.M. (2001). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121: 395-401.

Chatterjee, S.; De Lamirande, E. and Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.* 60: 498–506.

Cheng, T.T. (1985). In vitro fertilization of farm animal oocytes. PhD Thesis, Council for National Academic Awards. UK

Chew, P.B. (1996). Importance of antioxidant vitamins in immunity and health. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 59: 103-114.

Chihuailaf, R.H.; Contreras, P.A. y Wittwer F.G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*. 33(3).

Cisale, H.; Fernández, H.; Rivolta, M.; Ausín, O.G.; Domínguez, T.J.C. y Gledhilp, B. (2001). Inseminación artificial con semen de cerdo mejorado: prueba de campo. *Veterinaria Argentina*. 18:172.

Colenbrander, B.; Puyk, H.; Zandee, A.R. and Parlevliet, J. (1992). Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet. Scand.* 88: 29-38.

Colenbrander, B. (1993). Optimizing semen production for artificial insemination in swine. *J. Reprod. Fertil.* 48: 207-215.

Colenbrander, B.; Gadella, B.M. and Stout, T. (2003). The predictive value of semen analysis in the valuation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 38: 305-311.

Cooper, T.G. (1986). *The epididymis, sperm maturation and fertilisation. 1a Ed.* Eds. Springer. Verlag.. Heidelberg, Alemania.

Cooper, T.G. (1998). The epididymis: cellular and molecular aspects. En: “Interactions between epididymis secretions and spermatozoa”. Eds: Jones, R.C.; Holland, M.K.; Doberska, C. J. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 53: 119-136.

Córdova, A.; Pérez, J.F.; Lleó, B.; García-Artiga, C. and Martín-Rillo, S. (2001). In vitro fertilizing capacity of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Reprod. Dom. Anim.* 36: 199-202.

Córdova, A.; Pérez, J.F.; Lleó, B.; García-Artiga, C.; Álvarez A. and Drobchak, V. (2002). In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. *Theriogenology*: 57: 2119-2128.

Córdova, A.; Pérez, J.F. y Martín-Rillo, S. (2003). Fases previas y postcongelación del semen de verraco en pajillas de 5 ml y capacidad de fecundación de los espermatozoides. *Universidad y Ciencia*. 20(40): 61-68.

Córdova, A.; Saltijeral, J.A; Ruiz, C.G; Medina, R. y Muñoz, R. (2004). Tiempo de reacción y calidad espermática en verracos. *Revista Virtual Veterinaria*, 3 (10):<http://www.visionveterinaria.com> (acceso a la página en Abril 2009)

Córdova, A.; Córdova, C.A. y Córdova, M.S. (2007). Control reproductivo del verraco. *Rev. Vet.* 18: 1: 65–69,

Córdova, A.; Ruiz, C.G.; Córdova, C.A.; Córdova, M.S.; Guerra, J.E. and Arancibia, K. (2009). Oxidative stress and antioxidants in the spermatic conservation. *Revista Complutense de Ciencias. Veterinarias*. 3(1): 01-38

Cormier, N.; Sirard, M.A. and Bailey, J.L. (1997). Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J. Androl*: 18: 461-468.

Coscioni, A.C.; Reichenbach, H.D.; Schwartz, J.; LaFalci, V.S.N.; Rodrigues, J.L. and Brandelli, A. (2001). Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Anim. Reprod. Sci.* 61: 59–67.

Cox, J.F.; Fernández, P.; Saravia, F. y Santa-María, A (1998). Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad del acrosoma en espermatozoides caprinos. *Arch. Med. Vet*: 93-99.

Crabo, B.G. (1991). Preservation of boar semen: a worldwide perspective. En: *Boar semen preservation II*. Eds. Johnson, L.A and Rath, D. *Paul. Parey. Sci. Publ*; Berlin, Alemania: 3-9.

Cremades, T.; Roca, J.; Rodríguez-Martínez, H.; Abaigar, T.; Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. (2005). Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J. Androl*. 26: 610-618.

Cross, N.L. and Watson, S.K. (1994). Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins. *Theriogenology*. 42: 89-98.

Cummins, J. M. (1994). Diagnostic use and techniques of acrosome reaction evaluation. Male Factor in Human Infertility. *Frontiers in Endocrinology*. 8 (1): 101-153.

Cummins, J.M. (1995). Tests of sperm function. En: Grudzinskas JG and Yovich JL (eds.). Cambridge reviews in human reproduction. Gametes: the spermatozoon. *Cambridge University Press*, Cambridge, UK; pp. 70-103.

Curry, M.R. (2000). Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Reviw. Reprod.* 5: 46-52.

Dalvit, G.; Llanes, S.P.; Descalzo, A.; Insani, M.; Beconi, M. and Cetica, P. (2005). Effect of Alpha-Tocopherol and Ascorbic Acid on Bovine Oocyte *in Vitro* Maturation. *Repr. Domest. Anim.* 40 (2): 93 – 97.

David, G.; Serres, C. and Jouannet, P. (1981). Kinematic of human spermatozoa. *Gamete Res.*, 4: 83-95.

De Ambrogi, M.; Ballester, J.; Saravia, F.; Caballero, I.; Johannisson, A.; Wallgren, M.; Andersson, M. and Rodríguez-Martínez, H. (2006). Effect of storage in short- and long-term commercial extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.* 29: 543-552.

De Geyter, C.; De Geyter, M. and Nieschlag, E. (1998). Diagnostic accuracy of computer-assisted sperm motion analysis. *Hum. Reprod.*, 13: 2512-2520.

De Lamirande, E. and Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* 13(5): 368-78.

De Lamirande, E.; Leclerc, P. and Gagnon, C. (1997). Capacitation as a regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.* 3:175-194.

De Leeuw, E.; Chen, H.C.; Colenbrander, B.; and Verkleij, A.J. (1990a). Cold induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology.* 27: 171-183.

De Leeuw, E.; Colenbrander, B.; and Verkleij A.J. (1990b). The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. En: *Proc. 2nd Int. Conf. boar semen preservation.* US Department of Agriculture, Beltsville, USA: 95-104.

Dobrinsky, J.R. (1997). Cryopreservation of pig embryos. *J. Repro. And Fertility.* 52: 301-312.

Dominguez, J.C.; Cisale, H.; Alegre, B.; Gonzalez, R.; Pelaez, J.; Tejerina, F.; Bernal, S.; Cárdenas, S.; Abad, M.; Abad, F. y García, J.C. (2007). Calidad seminal del verraco (*Concepto y factores que afectan la calidad seminal*). Cursos de formación continuada. *Revista Suis.* 36: 34-44.

Donnelly, E.T.; McClure, N. and Lewis, S.E. (1999). Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil. Steril.* 72:484–6.

Donoghue, A.M. and Donoghue, D.J. (1997). Effects of water and lipid soluble antioxidant on turkey sperm viability, membrane integrity and motility during liquid storage. *Poult. Sci.* 76(10): 1440-1445.

Dorota, S. and Maciej, K. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2:12.

Dos Reis, G.R.; Wentz, I.; Scheid, I.R.; Fialho, F.B.; and Bortolozzo, F. (1995). Inseminação pre-ovulatoria em suínos com semen congelado e resfriado. *Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS.* 23: 77-88.

Dostolava, Z.; Calvete, J.J.; Sanz, L. and Topfer-Petersen, E. (1994). Quantitation of boar spermadhesins in accessory gland fluids and on the surface of epididymal, ejaculated and capacitated spermatozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 120: 48-54.

Drobnis, E.Z.; Yudin, A.I.; Cherr, G.M. and Katz, D.F. (1988). Kinematic of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete Res.* 21: 367-383.

Dubé, C.; Beaulieu, M.; Reyes-Moreno, C.; Guillemette, C. and Bailey, L. (2004). Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology.* 62: 874-886.

Edidin, M. (2003). Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nature reviews in molecular and cell biology.* 4: 414-418.

Ericsson, S.A.; Garner, D.L.; Thomas, C.A.; Downing, T.W. and Marshall, C.E. (1993). Interrelationships among fluorometric analyses of spermatozoal function, classical semen quality parameters and the fertility of frozen-thawed bovine spermatozoa. *Theriogenology,* 39: 1009-1024.

Eriksson, B. y Rodríguez-Martínez, H. (1999). Viabilidad y fertilidad del semen de verraco congelado en envases planos (single-dose pet-flat bags). En: *II Cong. Ibérico Reprod. Anim.* Libro de ponencias y comunicaciones: 364-368.

Eriksson, B. and Rodríguez-Martínez, H. (2000). Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPacks and Maxi-straws. *Anim. Reprod. Sci.* 63: 205-220.

Eriksson, B.; Petersson, H. and Rodriguez-Martinez, H. (2002). Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology.* 58: 1065-1079.

Esterbauer, H. and Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods. Enzymol.* 186: 407-421.

Estienne, J.; Harper, A. and Day, J. (2007). Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod. Biology.* 7(3).

Evenson, D.P.; Thompson, L. and Jost, L. (1994). Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*, 41: 637-651.

Evenson, D.P.; Larson, L. and Jost, L. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.* 23: 25-43.

Farlin, F.M.; Jasko, D.J.; Graham, J.K. and Squires, E.L. (1992). Assessment of *Pisum sativum* agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 32: 23-27.

Fenech, M.; DReosti, I. and Aitken C. (1997). Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*.18 (2): 359–364.

Fiser, P.S. and Fairfull, R.W. (1990). Combined effect of glycerol concentration and cooling velocity on motility and acrosomal integrity of boar spermatozoa frozen in 0.5 ml straws. *Mol. Reprod. Dev.* 25: 123-129.

Fiser, P; Hansen, C; Underhill, L. and Marcus, G (1991). New thermal stress test to assess the viability of crypreserved boar sperm. *Cryobiology*. 28:454-459.

Fiser, P.S.; Fairfull, R.W.; Hansen, C.; Panich, P.L.; Shrestha, J.N.B. and Underhill, L. (1993). The effect of warming velocity on motility and acrosomal integrity of boar sperm as influenced by the rate of freezing and glycerol level. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 190-195.

Flesch, F.M.; Voorhout, W.F.; Colenbrander, B.; van Golde, L.M. and Gadella, B.M. (1998). Use of lectins to characterize plasma membrane preparations from boar spermatozoa: a novel technique for monitoring membrane purity and quantity. *Biol. Reprod.* 59: 1530-1539.

Flores, E.; Fernández-Novell, J.M.; Peña, A. and Rodríguez-Gil, J.E. (2009). The degree of resistance to freezing-thawing is related to specific changes in the structures of motile sperm subpopulations and mitochondrial activity in boar spermatozoa. *Theriogenology*. 72: 784–797

Foote, R.H.; Brockett, C.C. and Kaproth, M.T. (2002). Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*. 71: 13-23.

Fraser, L. and Strzezek, J. (2007). Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing?. *Theriogenology*. 68: 248-257.

Fuentes, A. (2000). Inseminación artificial porcina en Venezuela. *Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Serie C.* 47. Maracay, Venezuela.

Funahashi, H. and Nagai, T. (2001). Regulation of in vitro penetration of frozen-thawed boar spermatozoa by caffeine and adenosine. *Mol. Reprod. Dev.* 58: 424–431.

Funahashi, H. and T. Sano. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*. 63: 1605-1616.

Gadea, J. (2001). La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación *in vitro* (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* 16 (1): 62-77.

Gadea, J. (2003). Semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish. J. Agric. Res.* 1: 17-27.

Gadea, J. (2004). El uso de semen porcino congelado. *Mundo Ganadero*. 169: 60-62.

Gadea, J.; Selles, E.; Marco, Ma.; Coy, P.; Matás, C.; Romar, R. and 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*. 62: 690-701.

Gadea, J. (2005). Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology*. 63: 431-44.

Gadea, J.; Gumbao, D.; Matás, C. and Romar, R. (2005a). Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of boar spermatozoa alter cryopreservation. *J. Androl*, 26:749-756.

Gadea, J.; García-Vazquez, F.A.; Matás, C.; Gardón, J.C.; Cánovas, S. and Gumbao D. (2005b) Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J. Androl.* 26 (3).

Gagnon, C. (1995). Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 847-855.

García-Artiga, C.; Fontanillas, J.C.; Pérez, J.; García-Cuenca, I.; Martín-Rillo, S. y Pérez-García, T. (1994). Técnicas de tinción espermática. *Porci.* 21: 11-18.

García-Herreros, M.; Aparicio, I.M.; Baron, F.J.; García-Marín, L.J. and Gil, M.C. (2006). Standardization of sample preparation, staining and sampling methods for automated sperm head morphometry analysis of boar spermatozoa. *Int. J. Androl.* 29: 553-563.

Garde, J.; Gutiérrez, A.; García-Artiga, C. and Vázquez, I. (1993). Influence of freezing process on “*in vitro*” capacitation of ram semen. *Theriogenology*. 39: 225.

Garner, D.L.; Pinkel, D.; Johnson, L.A. and Pace, M.M. (1986). Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod.* 34: 127-138.

Garner, D.L.; Johnson, L.A.; Yue, S.T.; Roth, B.L. and Haugland, R.P. (1994). Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15: 620-629.

Garner, D.L. and Johnson, L.A. (1995). Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53: 276-284.

Gil, J.; Januskauskas, A.; Haard, M.G.M.; Johannisson, A. and Söderquist, L. (2000). Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biociphos-Plus and Triladyl. *Reprod. Dom. Anim.* 35: 69-77.

Gillan, L.; Gareth, E. and Maxwell, W. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology.* 63: 445-457.

González-Urdiales, R.; Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; Alegre, B.; Ferreras, A.; Peláez, J.; Bernal, S. y Cárdenas, S. (2006). Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*”. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España: 19-38.

González-Urdiales, R. (2010). Valoración de la capacidad de criopreservación del semen porcino mediante técnicas de choque a *frigore* y termorresistencia. Tesis Doctoral. Universidad de León. España.

Gottardi, L.; Brunel, L.; and Zanelli, L. (1980). New diluent media for artificial insemination in pig. En: *9th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Madrid. España. 3:275

Graham, J.K. (2001). Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 249-265.

Green, C.E. and Watson, P.F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction.* 122: 889-898.

Griveau, J.F and Le Lannou, D. (1994) Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. *Inter. J. Andrology.* 17: 225–231.

Guillan, L.; Evans, G. and Maxwell, W.M. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology.* 63: 445-457.

Guthrie, H.D.; Welch, G.R. and Long, J.A. (2008). Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology* 70 1209–1215.

Hafez, E. (2002). Anatomía del aparato reproductor del macho. Parte I. Anatomía funcional de la reproducción. En: “*Reproducción e inseminación artificial en animales. Séptima edición.*”. Eds: Hafez, E.S.E. y Hafez, B. Mc Graw-Hill, México: 3-12.

Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause, or consequence?. *Lancet.* 344: 721-724.

Hamamah, S.; Royère, D.; Nicolle, J.C.; Paquignon, M. and Lansac, J. (1990). Effects of freezing-thawing on the spermatozoon nucleus: a comparative chromatin cytophotometric study in the porcine and human species. *Reprod. Nutr. Dev.* 30: 59-64.

Hammerstedt, R.H.; Graham, J.K and Nolan, J.P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 73-88.

Hammerstedt, R.H. (1993). Maintenance of Bioenergetic Balance in Sperm and Prevention of Lipid Peroxidation - A Review of the Effect on Design of Storage Preservation Systems. *Reprod Fert Develop.* 5: 675-690.

Hammitt, D.G. and Martin, P.A. (1989). Fertility of frozen-thawed porcine semen following controlled-rate freezing in straws. *Theriogenology.* 32: 359-368.

Hancock, J.L. and Howell, G. (1959). The collection of boar semen. *Vet. Res.* 71:664.

Harkema, W.; Harrison, R.A.P.; Miller, N.G.A.; Topper, E.K. and Woelders, H. (1998). Enhanced binding of zona pellucida proteins to the acrosomal region of inact boar spermatozoa in response to fertilizing conditions: a flow cytometric study. *Biol. Reprod.* 58: 421-430.

Harrison, R.A. and Vickers, S.E. (1990). Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 88: 343-352.

Hedger, M.O. and Meinhardt, A. (2003). Cytokines and the immune-testicular axis. *J. Reprod. Immunol.* 58: 1-26.

Hernández, M.; Bolarín, A.; Gil, M.A.; Almiñana, C.; Cuello, C.; Parrilla, I.; García, E.; Caballero, I.; Sánchez-Osorio, J.; Lucas, X.; Vázquez, J.M.; Martínez, E.A. y Roca, J. (2006). "Criopreservación espermática". En: "Manual de Técnicas de Reproducción Asistida en Porcino". Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. Pp 185-200

Hernandez, P.J.E.; Fernández, R.F. and Mejía, R. (2008) Effect of natural mating and he use of different types of semen on the productivity of sow. *Rev. Salud. Anim.* 30 (2).

Hicks, J.J. (2001) Bioquímica Especial. Parte V. En: *Bioquímica. 2da Ed.* McGraw- Hill. México: 900.

Hicks, J.J.; Torres, R.Y. y Sierra, V.M. (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 14(4): 223-226

Hingst, O.; Blottner, S. and Franz, C. (1995). Chromatin condensation in cat spermatozoa during epididimal transit as studied by aniline blue and acridine staining. *Andrologia.* 27: 275-279.

Hinshaw, D.B.; Sklar, L.A.; Bohl, B.; Schraufstatter, I.U.; Hyslop, P.A.; Rossi, M.W.; Spragg, R.G. and Cochrane, C.G. (1986). Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Anim. J. Pathol.* 123: 454 -464.

Hofmo, P.O. and Andersen, K. (1989). Electron microscopical studies of membrane injuries in blue fox spermatozoa subjected to the process of freezing and thawing. *Cryobiology*. 26: 124-131.

Hofmo, P.O. and Almid, T. (1991). Recent development in freezing of boar semen with special emphasis on cryoprotectants. *Repro. Dom. Anim. Suppl.* 1: 111-122.

Holt, W.V. and North, R.D. (1984). Partially irreversible cold induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.* 230: 473-483.

Holt, W.V.; Moore, H.D. and Hillier, S.G. (1985). Computer-assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: correlation of results with in vitro fertilization assays. *Fertil. Steril.* 44: 112-119.

Holt, W.V. and North, R.D. (1991). Cryopreservation, actin localization and thermotropic phase transitions in ram spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 91: 451-461.

Holt, W.V.; Head, M.F. and North, R.D. (1992). Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing: observations with experimental cryomicroscopy. *Biol. Reprod.* 46: 1086-1094.

Holt, W.V. and North, R.D. (1994). Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51: 414-424.

Holt, W.V. and Medrano, A. (1997). Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 52: 213-222.

Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*. 53: 47-58.

Huszar, G.; Willetts, M. and Corrales, M. (1990). Hyaluronic acid (sperm select) improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil. Steril.* 54: 1127-1134.

Hyang Song, J.; Fujimoto, K. and Miyazawa, T. (2000). Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J. Nutr.* 130: 3028 – 3033.

Ito, T.; Niwa, T.; and Kudo, A. (1948). Studies on artificial insemination in swine. *Zootech. Exp. Sta. Res. Bull.* 55: 1-74. Citado en Sanchez, 2006.

Januskauskas, A. and Rodríguez-Martínez, H. (1995). Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet. Scand.*, 36: 571-574.

Januskauskas, A.; Gil, J.; Söderquist, L.; Haard, M.G.; Haard, M.C. and Johannisson, A. (1999). Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*. 52: 641-658.

Januskauskas, A.; Johannisson, A.; Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. (2000). Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. *Theriogenology*. 53: 859-875.

Januskauskas, A.; Johannisson, A. and Rodríguez-Martínez, H. (2001). Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*. 55: 947-961.

Jeyendran, R.S.; Van der Ven, H.H.; Pérez-Peláez, M.; Grabo, B.G. and Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 70: 219-228.

Johnson, L.A.; Aalbers J.G. and Grooten H. (1988). Artificial insemination of swine: fecundity of boar semen gored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthygiene*. 23:49.

Johnson, L.A. (1998). Current developments in swine semen: preservation, artificial insemination and sperm sexing. *Proc. 15th Cong. Int. Pig. Vet. Soc.* 1: 225-230.

Johnson, L.A. (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci.* 60(61): 93–107.

Johnson, L.A.; Weize, K.F.; Fiser, P. and Maxwell, W. (2000). Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.

Juonala, T.; Salonen, E.; Nurttila, T. and Andersson, M. (1999). Three fluorescence methods for assessing boar sperm viability. *Reprod. Dom. Anim.* 34: 83-87.

Kankofer, M.; Kolm, G.; Aurich J. and Aurich, C. (2005). Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 degrees C, *Theriogenology*. 63: 1354–1365

Karov, H.H.; Sawai, K.; Wang, W.H.; Im, K.S. and Niwa, K. (1997). Amino acids in maturation media and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol Reprod.* 57: 1478-1483.

King, G. and MacPherson, J. (1967). Boar semen studies ii. laboratory and fertility results of a method of deep freezing. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.* 31:46-47.

Kirchhoff C. (1998). Molecular characterization of epididymal proteins. *Reviews of Reproduction*. 3: 86 – 95.

Kumaresan, A.; Kadirvel, G.; Bujarbaruah, K.M.; Bardoloi, R.K.; Das, A.; Kumar, S. and Naskar, S. (2009). Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *A. Reprod. Science.* 110: 162–171.

Kozumplik, J. and Sosnová, J. (1985). The thermoresistance test of spermatozoa and fertility in bulls. *Vet. Med.* 30(7):385-92.

Kozumplík, J. and Roubal, M. (1990). Relation of heat resistance tests and sperm survival to pregnancy and fertility in sows. *Vet. Med.* 35(12):725-732.

Larsson, K.; Einarsson, S. and Swensson, T. (1977). The development of a practicable method for deep freezing of boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.* 29: 113-118.

Larsson, K. (1985). Boar sperm viability after freezing and thawing. In: Johnson LA, Larsson K(eds), Deep Freezing of Boar semenproc 1st Int Conf Deep Freezing of Boar Semen. *University of Agricultural Sciences:* 177-187.

Lasso, J.L.; Noiles, E.E.; Álvarez, J.G. and Storey, B.T. (1994). Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. *J. Androl.* 15: 255-265.

Lindemann, C.B. and Kanous, K.S. (1989). Regulation of mammalian sperm motility. *Arch. Androl.* 23: 1-22.

Liu, D.Y.; Clarke, G.N. and Baker, H.W. (1991). Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton-Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *J. Androl.* 12: 231-239.

Lopes, S.; Sun, J.G and Jurisicova, A. (1998). Sperm DNA fragmentation is increased in poor quality semen samples and correlates with failed fertilization in ICSI. *Fertil Steril:* 69: 528–532.

Lopez, A.M.; Miranda, M.; Hernandez, J.; Castillo, C. and Benedito, J.L. (1997). Glutathión peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 29(2): 171-180.

López, M.L. and de Souza, W. (1991). Distribution of filipin-sterol complexes in the plasma membrane of stallion spermatozoa during the epididymal maturation process. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 158-168.

Maldjian, A.; Pizzi, F.; Gliozzi, T.; Cerolini, S.; Penny, P. and Noble, R. (2005). Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology.* 63: 411-421.

Marin-Guzman, J.; Mahan, D.C.; Chung, Y.K.; Pate, J.L. and Pope, W.F. (1997). Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. *J. Anim. Sci.* 75:2294-3003.

Marin-Guzman, J.; Mahan, D. C. and Pate, J. L. (2000a). Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars. *J. Anim. Sci.* 78:1537–1543.

Marin-Guzman J.; Mahan D. C. and Whitmoyer, R. (2000b). Effect of dietary selenium and vitamin E on the ultrastructure and ATP concentration of boar spermatozoa, and the efficacy of added sodium selenite in extended semen on sperm motility. *J. Anim. Sci.* 78:1544–1550.

Márquez, M.; Yopez, C.E.; Sutil-Naranjo, R. y Rincón. M. (2002). Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. *Invest. Clín.* 43(3): 191-204.

Marshburn, P.B.; McIntire, D.; Carr, B.R. and Byrd, W. (1992). Spermatozoal characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 58: 179-176.

Martínez, E.A.; Vázquez, J.M.; Matás, C.; Roca, J.; Coy, P. and Gadea, J. (1993). Evaluation of boar spermatozoa penetrating capacity using pig oocytes at the germinal vesicle stage. *Theriogenology.* 40: 547-557.

Martinez, E.A.; Vazquez, J.M.; Roca, J.; Lucas, X.; Gil, M.A. and Vazquez, J.L. (2001) Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reprod. Suppl.* 58: 301-311.

Martín-Rillo, S. (1984). How AI is progressing in Spain. *Pig Intern.* 24-28.

Martín-Rillo, S.; Martínez, E.; García-Artiga, C. and De Alba, C. (1996). Boar semen evaluation in practise. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 519-526.

Martín-Rillo, S.; de Alba-Romero, C.; Corcuera, B.; García-Artiga, C. y Lleó-Casanova, B. (1999). Efecto del semen congelado porcino sobre el desarrollo embrionario. En: “*II Congreso Ibérico de Reproducción Animal*”. Lugo, España. Libro de ponencias y comunicaciones: 396-376.

Mattioli, M.; Barboni, B.; Lucidi, P. and Seren, E. (1996). Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology.* 45: 373-381.

Maxwell, W.M. and Stojanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reproduction, Fertility and Development.* 8: 1013-1020.

Maxwell, W.M. and Johnson, L.A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology.* 48: 209-219.

Maxwell, W.M.; Long, C.R.; Johnson, L.A.; Dobrinsky, J.R. and Welch, G.R. (1998). The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in presence or absence of seminal plasma. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 347-357.

Mazur, P. (1985). Basic concepts in freezing cells. En: “*Deep freezing of boar semen*”. Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish University of agricultural sciences, Uppsala, Suecia: 91-111.

McKenzie, F.F. (1931). A method for collection of boar semen. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 78: 244–246.

Membrillo, O.A.; Córdova, I.A.; Hicks, G.J.J.; Olivares, C.I.M.; Martínez, T.V.M. y Valencia, M.J.J. (2003). Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Interciencia*. 28(12): 699-704.

Michael, A.J.; Alexopoulos, C.; Pontiki, E.A.; Hadjipavlou-Litina, D.J.; Saratsis, P.; Ververidis, H.N. and Boscos, C.M. (2009). Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 112: 119–135

Milavanov, V.K. (1932). The present position of artificial insemination in the pig. *Anim. Breed.* 2:112. Citado por Sanchez, 2006.

Milovanov, V.K. (1938). Isskustvenoye Ossemenebie Selsko-Khoziasvennykh Jivotnykh [The Artificial Insemination of Farm Animals] En: *New in agricultura. Bulletin 23*. Ed. Seljhozgiz, Moscú Rusia. Citado por Parks, 1997.

MMARM. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Censo del Ganado Porcino en España. Estadística Noviembre de 2009. <http://www.marm.es/> Consultada 15 Abril de 2010

Minotti, G. and Aust, S. (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lip.* 44: 199-208.

Minotti, G. and Aust, S. (1992). Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*. 27:129-226.

Mixner, J.P. and Saroff, J. (1954). Interference by glycerol with differential staining of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* 37: 652.

Mollá, M.; Sellés, E.; Marco, M.A.; Remohi, J.; Ballesteros, A. and Gadea, J. (2004). Freezing procedure produces a reduction in the human spermatozoa glutathione content. *J. Andrology*. 25 (Suppl.) 45. abstr.

Moore, H. and Hibbitt, K. (1977). Fertility of boar spermatozoa after freezing in the absence of seminal vesicles protein. *J. Reprod Fertil.* 50: 349-352.

Moretti, J. (1981). Artificial insemination of swine: fertility using several liquid semen diluents. In: *8th IPVS Congress*. Ghent, Belgica: 293.

Mortimer, S.T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movements in mammals. *Hum. Reprod.* 3: 403-409.

Mortimer, S.T.; Swan, M.A. and Mortimer, D. (1998). Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13: 2139-2146.

Mortimer, S.T. and Swan, M.A. (1999a). The development of smoothing-independent kinematic measures of capacitating human sperm movement. *Hum. Reprod.* 14: 986-996.

Mortimer, S.T. and Swan, M.A. (1999b). Effect of image sampling frequency on established and smoothing-independent kinematic values of capacitating human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 14: 997-1004.

Mortimer, S.T. (2000). CASA—practical aspects. *J. Androl.* 21: 515-524.

Nagy, S.; Jansen, J.; Topper, E.K. and Gadella, B.M. (2003). A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol. Reprod.* 68: 1828-1835.

Nolan, J.P. and Hammerstedt, R.H. (1997). Regulation of membrane stability and the acrosome reaction in mammalian sperm. *FASEB J.* 11: 670-682.

O'Flaherty, C.; Meconi, M. and Beorlegui, N. (1997). Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia.* 29: 269-275

Ochsendorf, F.R.; Buhl, R.; Bästlein, A. and Beschmann, H. (1998). Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum Reprod.* 13: 353–359.

Oldfield, J.E. (2003). Some recollections of early swine research with selenium and vitamin E. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2): 145–148.

Olguín, C.G.; Guiller, G.M.; Zúñiga, R.R.A. y Pasquetti, P.A. (2004). Antioxidantes y aterosclerosis. *Revista de Endocrinología y Nutrición.* 12(4): 199-206.

Ortman, K. and Rodríguez-Martínez, H. (1994). Membrane damage during dilution, cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packaged in plastic bags. *J. Vet. Med. A.* 41: 37-47.

Pace, M.M. (1980). Fundamentals of assay of spermatozoa. En: *Proc. 9th Int. Cong. Anim. Reprod. A. I.* 1: 133-146.

Paquignon, M. and Courot, M. (1976). Fertilizing capacity of frozen boar spermatozoa. En: *Proc. 8th Int. Cong. Anim. Reprod. A. I.* 4: 1041-1044.

Parks, J.E. and Graham, J.K. (1992). Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology.* 38: 209-222.

Parks, J.E. and Lynch, D.V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* 29: 255-266.

Parks, J.E. (1997). Hypothermian and mammalian gametes. En: *“Reproductive tissue banking: scientific principles.”* Eds: Karow, A.M. y Critser, J.K. Academic Press, San Diego, EEUU: 229-261.

Pasteur, X.; Sabido, O.; Maubon, I.; Perrin-Cottier, M. and Laurent, J.L. (1991). Quantitative assessment of chromatin stability alteration in human spermatozoa induced by freezing and thawing. A flow cytometric study. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 13: 383-390

Peláez, J. (2003). Criopreservación de semen porcino: aportaciones al estudio de la calidad seminal y la capacidad fecundante. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de León, España.

Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren, M. and Rodríguez-Martínez, H. (2003). Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.* 78: 85–98.

Peña, F.J.; Johannisson, A.; Wallgren M. and Rodríguez-Martínez, H. (2004). Effect of hyaluronan supplementation on boar sperm motility and membrane lipid rchitecture status after cryopreservation. *Theriogenology.* 61: 63–70.

Pérez, L.J.; Valcárcel, A.; De las Heras, M.A.; Moses, D. and Baldassarre, H. (1996). Evidence that frozen/thawed ram spermatozoa show accelerated capacitation in vitro as assessed by chlortetracycline assay. *Theriogenology.* 46: 131-140.

Pérez-Llano, B.; González, J.L. y García-Casado, P. (1998a). Nueva técnica de ORT corta para su evaluación. *Albéitar.* 21: 6-7.

Pérez-Llano, B.; García-Casado, P.; Lorenzo, J.L. and Sánchez-Sánchez, R. (1998b). The response of boar sperm to the HOS test and relationship between HOST and ORT results. En: *Proc. 15th Cong. Int. Pig Vet. Soc.* 3: 69.

Pérez-Llano, B.; Sala, R.; Reguera, G. and García-Casado, P. (2009). Changes in subpopulations of boar sperm defined according to viability and plasma and acrosome membrane status observed during storage at 15 °C. *Theriogenology.* 71:311–317

Plisko, N.T. (1965). A method of prolonging the viability and fertilizing ability of boar spermatozoa. *Svinovodstvo.* 19: 37-41.

Polge, C. (1956). Artificial insemination of pigs. *Vet. Rec.* 68: 62-76.

Polge, C. (1985). Sperm freezing; past, present and future. In: *Deep Freezing of Boar Semen.* Eds. L.A. Johnson and K. Larrson. *Proc. 1st Int. Conf. on Deep Freezing of Boar*

Polge, C.; Salamon, S. and Wilmut, I. (1970). Fertilizing capacity of frozen boar semen following surgical insemination. *Vet. Rec.* 87: 424-429.

Pratap, N.; Reddy, V.N.V.; Sarma, P.A. and Honnappa, T.G. (2000). Employment of the hypoosmotic swelling test (HOST) to evaluate sperm membrane integrity of fresh and frozen buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Buffalo J.* 16: 207-213.

Pursel, V.G.; Johnson, L.A. and Rampacek, G.B. (1972). Acrosome morphology of boar spermatozoa incubated before cold shock. *Journal of Animal Science.* 34: 278-283.

Pursel, V.G. and Johnson. L.A. (1973). Recovery of fresh and frozen boar spermatozoa after insemination. *J. Anim. Sci.* 37:325.

Pursel, V.G. and Johnson, L.A. (1974). Glutaraldehyde fixation of boar spermatozoa for acrosome evaluation. *Theriogenology*. 1: 63-67.

Pursel, V.G. and Johnson, L.A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated Semen and a new thawing procedure. *J Anim Sci*. 40: 99-102.

Pursel, V.G. (1979). Effect of cold shock on boar sperm treated with butylated hydroxytoluene. *Biol. Reprod*. 21: 319-324.

Pursel, V.G. and Park, C.S. (1985). Freezing and thawing procedures for boar spermatozoa. In: Deep freezing of boar semen. (eds.). Johnson L.A and Larsson K. (Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden: 147-166.

Quintero-Moreno, A. (2003). Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. España

Raijmakers, M.T.; Roelofs, H.M.; Steegers, E.A.; Steegers-Theunissen, R.R.P.; Mulder, T.P. and Knapen, M.F. (2003). Glutathione and glutathione S-transferases A1-1 and P1-1 in seminal plasma may play a role in protecting against oxidative damage to spermatozoa. *Fertil Steril*. 79:169-72.

Rausell, F. y Tarín, J.J. (2005). Función del glutatión reducido durante la maduración y fecundación de ovocitos y desarrollo preimplantatorio de embriones in vitro en mamíferos. *Revista Iberoamericana de fertilidad*. 22: 415-429.

Reed, H. (1985). Current use of frozen boar semen-Future need of frozen boar semen. In: "Deep freezing of boar semen". Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Suecia: 225-237.

Revell S.G. and Glossop C.E. (1989). A long-time ambient temperature diluent for boar semen. *Anim. Prod*. 48: 579-584.

Reylli, P.M. and Burkley, G.B. (1990). Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br. J. Surg*. 77: 1324-1325.

Roca, J.; Carvajal, G.; Cremales, T.; Vazquez, J.M.; Lucas, X. y Martínez, E. (2002). Estrategias para mejorar la viabilidad, fertilidad y prolificidad de los espermatozoides criopreservados de porcino. *Porci. Aula Veterinaria. Monografía de actualidad. Tratado de ganado porcino*. 72: 61-75.

Roca, J.; Carvajal, G.; Lucas, X.; Vazquez, J.M. and Martinez, E.A. (2003). Fertility of weaned sows after deep intrauterine insemination with a reduced number of frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*. 60: 77-87.

Roca, J.; Gil, M.A.; Hernández, M.; Parrilla, I.; Vázquez, J.M. and Martínez, E.A. (2004). Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology*. 25: 91-99.

Roca, J.; Corbalan, Gil.; Hernández, M.A.; Meroño, M.; Vazquez, J.M. and Martínez. E.A. (2005). Butylated hydroxytoluene improves survival and in vitro embryo development of cryopreserved boar spermatozoa. *Theriogenology*. 63: 485—486.

Rodríguez-Gil, J.E.; Montserrat, A. and Rigau, T. (1994). Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. *Theriogenology*. 42: 815-829.

Rodríguez-Martínez, H.; Eriksson, B. and Lundenheim, N. (1996). Freezing boar semen in flat plastic bags, membrane integrity and fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 31 (Suppl. 1): 161-168.

Rodríguez-Martínez, H. (2003a). El transporte espermático en la cerda: ¿Qué nos enseña para la evaluación y uso de espermatozoides en la inseminación artificial?. En: “*Memorias del IV congreso ibérico de reproducción animal*”. Las Palmas de Gran Canaria, España: 19-29.

Rodríguez-Martínez, H. (2003b). Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? *Reprod.Dom. Anim.* 38: 312-318.

Rodríguez-Martínez, H. (2005). Predicción *in vitro* de la fertilidad de los verracos. *Porci.* 85: 7-19.

Rodríguez-Martínez, H. (2006). Can we increase the estimative value of semen assessment?. *Reprod. Dom. Anim.* 41: 2-10.

Rota, A.; Peña, A.I.; Linde-Forsberg, C. and Rodríguez-Martínez, H. (1999). In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim. Reprod. Sci.* 57: 199-215.

Royère, D.; Hamamah, S.; Nicolle, J.C.; and Lansac, J. (1991). Cryopreservation and chromatin alterations during freezing-thawing human sperm. In: Comparative spermatology twenty years after. (ed.). Baccetti B. Serono symposia publications from Raven Press. 75: 893-897.

Ryan, T.P. and Aust, S. (1992). The role of iron in oxygen mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.* 22: 119–141.

Saezet, F.; Motta C.; Boucher D. and Grizard, G. (1998). Antioxidant capacity of prostasomes in human semen. *Molecular Human Reproduction*. 4(7): 667–672.

Sáiz, C.F. y Marigorta, V.P. (2003). Resultados bioquímicos de la analítica seminal. En: “*Memorias del XXVI curso internacional de reproducción animal*”, Instituto nacional de investigación agraria y alimentaria, Madrid, España: 285-297.

Sanchez, S. (2006). Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*”. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España: 19-38.

Sanocka, D. and kurpisz, M. (2004). Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 23: 2-12.

Saravia, F.; Wallgren, M.; Nagy, S.; Johannisson, A. and Rodríguez-Martínez, H. (2005). Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. *Theriogenology.* 63(5): 1320-1333.

Sariözkan, S.; Tuncer, P.B.; Bucak, N.M. and Ulutaş, P. A. (2009). Influence of various Antioxidants on Microscopic-Oxidative Stress Indicators and Fertilizing Ability of Frozen-Thawed Bull Semen. *Acta Vet .Brno.* 78: 463-469

Satorre, M.M.; Breininger, E.; Beconi, M.T. and Beorlegui, N.B. (2007). Alpha-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology.* 68: 958-65.

Sbracia, M.; Grasso, J.; Syame, N.; Stronk, J. and Huszar, G. (1997). Hyaluronic acid substantially increases the retention of motility in cryopreserved/thawed human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 12: 1949–1954.

Schilling, E.; Vengust, M. and Smidt, D. (1984). ORT - A new test to predict the freezeability and storage of boar spermatozoa. In: *Congress of the International Pigs Veterinary Society.* Ghent. Belgica: 296

Schilling, E. and Vengust, M. (1985). Determination of osmotic resistance of boar spermatozoa and its relationship with the storage ability of semen samples. *Zuchthygiene.* 20: 61-78.

Schilling, E.; Vengust, M.; Bajt, G. and Tomcic, M. (1986). The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. En: “*Proc. 9th IPVS Congress*”, Barcelona, España: 77.

Schmidt, H. and Kamp, G. (2004). Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computerassisted sperm analysis. *Reproduction.* 128: 171-179.

Schwarz, M. (1993). Bedeutung des besamungs-ovulations-intervalls nach insemination mit gefriersperma bei jungsau. Thesis. Tierärztliche Hochschule Hannover. Alemania.

Schwarz, M. (1994). Neueste Ergebnisse mit tiefgefrorenem Ebersperma. *Zuchtwahl und Besamung.* 131: 37-41.

Sellés, E. (2001). Estudio de diferentes factores que afectan a la calidad y capacidad fecundante de los espermatozoides crioconservados en la especie porcina. Cátedra de fisiología animal. Tesis de grado. Universidad de Murcia. España.

Sellés, E.; Gadea, J.; Romar, R.; Matas, C. and Ruiz, S. (2003). Analysis of in vitro fertilizing capacity to evaluate the freezing procedures of boar semen and to predict the subsequent fertility. *Reprod Domest Anim.* 38: 66–72.

Serres, C.; Jouannet, P. and David, G. (1984). Influence of the flagellar wave development and propagation on the human sperm movement in seminal plasma. *Gamete Res.* 9: 183-185.

Shi, L.; Zhanga, C.; Yue, W.; Shi, L.; Zhu, X. and Lei, F. (2010). Short-term effect of dietary selenium-enriched yeast on semen parameters, antioxidant status and Se concentration in goat seminal plasma. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157 (1-2): 104-108.

Shibahara, H.; Obara, H.; Ayustawati, T.; Hirano, Y.; Suzuki, T.; Ohno, A.; Takamizawa, S. and Suzuki, M. (2004). Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male facto infertility. *Int. J. Androl.* 27: 63-68.

Sikka, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front Biosc.* 1:78–86

Silva, P.F. and Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 65: 958-978.

Simmet, C. (1993). Cryophysical aspects of the freezing of boar semen and the effects of freezing on semen quality and conception rate. Tesis Doctoral. Tierärztliche Hochschule Hannover. Alemania.

Skinner, M.K. (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocrine Rev.*12: 45-77.

Soler, C.; Núñez, J.; Núñez, M.; Sancho, M. and Gutiérrez, R. (2006). Técnicas de análisis computerizado de semen. En: “*Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino*”. Eds: Bonet, S.; Martínez, E.; Rodríguez, J.E.; Barrera, X. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina. Gerona, España: 51-68.

Stornelli, M.C; Tittarelli, C.; Savignone, C. and Stornelli, M.A (2005). Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. *Analecta Veterinaria.* 25 (2): 28-35

Strzezek, J. (2002). Secretory activity of boar seminal vesicles glands. *Reproductive. Biol.* 2(3): 243-266.

Sukardi, S.; Curry, M.R. and Watson, P.F. (1997). Simultaneous detection of the acrosomal status and viability of incubated ram spermatozoa using fluorescent markers. *Anim. Reprod. Sci.* 46: 89-96.

Surai, P.; Kutz, E.; Wishart, G.J.; Noble, R.C.; and Speake, B.K. (1997a). The relationship between the dietary provision of a-tocopherol and the concentration of this vitamin in the semen of the chicken: effects on lipid composition and susceptibility to peroxidation. *Journal of Reproduction and Fertility.* 110: 47–51.

Surai, P.; Cerolini, S.; Noble, R.; Speake, B.; Sparks, N. and Cloughley, J. (1997b) Spermatozoan lipids: protection from peroxidation by a-tocopherol. *PLEFA.* 57: 263.

- Suzuki, K.; Geshi, M.; Yamauchi, N. and Nagai, T.** (2003). Functional changes and motility characteristics of Japanese Black Bull spermatozoa separated by Percoll. *Anim. Reprod. Sci.* 3-4: 157-172.
- Swierstra, E.E.** (1968). Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoon transit through the epididymis, *Anatomical Record.* 161:171–186.
- Tamer, M. S.; Ashok, A.; Rakesh, K.; Anthony, J. and Sikka, C.** (2005). Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertility and Sterility.* 83:95–103.
- Tardif, S.; Laforest, J.; Cormier, N. and Bailey, L.** (1999). The importance of porcine sperm parameters on fertility *in vivo*. *Theriogenology.* 52:447-459.
- Tejerina, F.** (2007). Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco. Tesis Doctoral. Universidad de León. León. España.
- Tejerina, F.; Buranaamnuay K.; Saravia, F.; Wallgren, M. and Rodriguez-Martinez, H.** (2008). Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology.* 69: 1129–1138.
- Tejerina, F.; Domínguez, J.C.; González Urdiales, R.; Alegre, B.; Alegre, E.; Castejón, M.; Ferreras, A.; Cárdenas, S.; Bernal, S. and Campos, J.** (2005). Morphometric characterization of the boar sperm head by using a Computer-Assisted Semen Analysis (CASA) programme. *Reprod. Dom. Anim.* 40: 368-369.
- Tonieto S.; Gonçalves, C.; Nunes, M.; Lucia, T.; and Bianchi, I.** (2003). Composição e funções de diluentes para o acondicionamento de semen suino. *Rev. Téc. Suinocultura.* 5: 14-16
- Trisini, T.A.; Narendra, B.S.; Singh, P.; Susan, M. Duty. and Russ, H.** (2004). Relationship between human semen parameters and deoxyribonucleic acid damage assessed by the neutral comet assay. *Fertility and Sterility.* 82: 1623 – 32.
- Turner, R.M.** (2003). Tales from the tail: what do we really know about sperm motility?. *J. Androl.* 24: 790-803.
- Turner, R.M.** (2006). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 25-38.
- Upreti, G.C.; Jensen, K.; Oliver, J.E.; Duganzich, D.M.; Munday, R. and Smith, J.F.** (1997). Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 269-278.
- Ursini, F.; Heim, S.; Kiess, M.; Maiorino, M.; Roveri, A.; Wissing, J. and Leopold, F.** (1999). Dual Function of the Selenoprotein PHGPx During Sperm Maturation. *Science.* 285 (5432):1393-1396.

- Valcárcel, A.; de las Heras, M.A.; Pérez, L.; Moses, D.F. and Baldassarre, H.** (1997). Assessment of the acrosomal status of membrane-intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/hoeschst 33258 staining. *Anim. Reprod. Sci.* 41: 483-489.
- Van der Schans, G.P.; Haring, R.; Van Dijk-Knijenburg, H.C.; Bruijnzeel, P.L. and Den Ders, N.H.** (2000). An immunochemical assay to detect DNA damage in bovine sperm. *J. Androl.* 21: 250-257.
- Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Martínez, P.; García-Artiga, C. and Roca, J.** (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology.* 47: 913-922.
- Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Roca, J.; Lucas, X.; Parrilla, I. y Gil, M.A.** (1999). Métodos y estrategias en la evaluación de espermatozoides criopreservados de verraco. En: *II Cong. Ibérico Reprod. Anim.*, Libro de ponencias y comunicaciones: 377-381.
- Venereo, G.J.** (2002). Daño Oxidativo, Radicales Libres Y Antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit.* 31(2): 126-33.
- Verma, A. and Kanwar, K.C.** (1999). Effect of vitamin E on human sperm motility and lipid peroxidation in vitro. *Asian J Androl.* 1: 151-154.
- Verstegen, J.; Iguer-Ouada, M. and Onclin, K.** (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57: 149-179.
- Waberski, D.; Weitze, K.F.; Gleumes, T.; Schwarz, M.; Willmen, T. and Petzoldt, R.** (1994). Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. *Theriogenology.* 42: 831-840.
- Wagner, H.G. and Thibier, M.** (2000). World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. In: "*Proc. 14th Int. Cong. Anim. Reprod.*". Estocolmo, Suecia. 2: 77.
- Watson, P.F.** (1981) The effects of cold shock on sperm cell membranes. In *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*, Eds G. J. Morris & A. Clark. Academic Press, London: UK. 189-218.
- Watson, P.F and Anderson, W.** (1983). Influence of butylated hydroxytoluene (BHT) on the viability of ram spermatozoa undergoing cold shock. *J Reprod Fertil.* 69: 229-235.
- Watson, P.F. and Plummer, J.M.** (1985). The responses of boar sperm membranes to cold shock and cooling. In: "*Deep freezing of boar semen*". Eds: Johnson, L.A. y Larsson, K. Swedish University of agricultural sciences, Uppsala, Suecia: 113-127.
- Watson, P.F.** (1990). Artificial insemination and the preservation of semen. En: "*Marshall's physiology of reproduction. 4th edition. Vol. 2: Reproduction in the male*". Ed: Lamming, G.E. Churchill Livingstone, New York, EEUU: 747-869.

Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.

Watson, P.F. (1996). Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod. Dom. Anim.* 3(1): 135-140.

Watson, P.F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* 60(61): 481-492.

Way, A.L.; Henault, M.A.; and Killian, G.J. (1995). Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididimal bull spermatozoa. *Theriogenology.* 43: 1301-1316.

Weitze, K.F.; Rath, D. and Leps, H. (1988). Influence of volume / surface ratio of plastic packages upon freeze-thaw rate and fertility of boar semen. En: *Proc. 11th Int. Cong. Anim. Reprod. A. I.* Dublin. Irlanda. 3: 312.

Weitze, K.F.; Rabeler, J.; Willmen, T. and Waberski, D. (1990). Interaction between inseminate, uterine and ovarian function in the sow. I: Influence of seminal plasma and strogens in the inseminate on intragenital transport, time of ovulation and fertility in gilts. *Reprod. Dom. Anim.* 25: 191-196.

Westendorf, P.; Richter, L. and Treu, H. (1975). Zur tiefgefrierung von ebersperma Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hulsengerger Pailletten-Verfahren. *Dtsch. Terarztl. Wschr.* 82: 261-300.

Westhoff, D. and Kamp, G. (1997). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is bound to the fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *J. Cell. Sci.* 110: 1821-1829.

Wheeler, M.B. and Seidel, G.E. (1986). Time course of in vitro capacitation of frozen and unfrozen bovine spermatozoa. *Theriogenology.* 29: 216.

White, I.G. (1993). Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fert. Dev.* 5: 639-658.

Williams, A.C. and Ford, W.C. (2001). The role of glucose in supporting motility and capacitation in human spermatozoa. *J. Androl.* 22: 680-695.

Wilson, J.D.; George, F.W. and Griffin, J.E. (1981) The hormonal control of sexual development. *Science.* 211: 1278-1284.

Woelders, H. (1991). Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. *Reprod. Dom. Anim. Suppl.* 1: 145-164.

Woelders, H. (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet.Quart.* 19: 135-138.

Wrobel, K.H y Dellmann H.D. (1993). Sistema reproductor masculino. En: “*Histología veterinaria. Segunda edición.*” Eds: Dellmann H-D . Acribia S.A., Zaragoza, España: 245-266.

Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. In: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E, Neil JD, 2nd ed. New York: E.U. Raven Press: 189-317.

Yeon-Ji, J.; Kyeong, K.; Hye-Jin, S.; Eun-Ju, K.; Sun-A, O.; Kumar, B.; Balasubramanian, S. and Gyu-Jin, R. (2009) Effect of a-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*. 58: 181–189.

Yeste, M.; Briz, M.; Pinart, E.; Sancho, S.; Garcia-Gil, N.; Badia, E.; Bassols, J.; Pruneda, A.; Bussalleu, E.; Casas, I. and Bonet. S. (2008). Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15 °C. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 236–250.

Yue, D.; Yan, L.; Luo, H.; Xu, X. and Jin, X. (2010). Effect of Vitamin E supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in Aohan fine-wool sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 217–222.

Zaniboni, L. and Cerolini, S. (2009). Liquid storage of turkey semen: changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 112(1-2): 51-65.

Zorrilla, G. y Fernández, A. (1999). Diabetes mellitus y estrés oxidativo. *Bioquímica*. 24(3):75-79.

Zorrilla, G. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev. Cubana. Invest. Biomed.* 21(3): 178-185.

10. Anexos

Macho	Volumen ml	Concentración X10⁶
G9282	293	510
H0915	256	490
H2449	172	573
I9761	281	500
I9360	219	451
T475	322	547
W2622	310	235
W3048	306	271
W3267	283	510
W5070	328	438

Tabla 44. Volumen y concentración espermática/ml en los eyaculados de cada verraco.

Tabla 45. Valoración morfológica de los eyaculados.

Macho	Normales	Gota proximal	Gota distal	Cabeza	Cola
G9282	71	5	19	0	5
H0915	75	3	15	0	7
H2449	82	6	11	0	1
I9761	78	3	17	0	2
I9360	70	7	13	0	13
T475	79	6	13	7	7
W2622	79	2	17	0	2
W3048	83	10	7	0	0
W3267	88	4	6	1	1
W5070	80	11	7	0	2

Tabla 46. Valoración subjetiva del porcentaje de movilidad y calidad de movimiento.

Macho	Movilidad (%)	Calidad de movimiento
G9282	85	3
H0915	85	3
H2449	95	3
I9761	85	3
I9360	80	3
T475	90	3
W2622	85	3
W3048	95	3
W3267	85	3
W5070	85	3

Tabla 47. Valoración de la Resistencia Osmótica.

Macho	ORT
G9282	95.25
H0915	97.59
H2449	90.50
I9761	94.00
I9360	91.75
T475	97.00
W2622	93.75
W3048	96.50
W3267	89.50
W5070	93.25

Tabla 48. Valoración de la Integridad de la membrana el día 0 en semen refrigerado 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	96.09	96.09	96.09
H0915	96.89	96.89	96.89
H2449	85.98	85.98	85.98
I9761	89.78	89.78	89.78
I9360	90.09	90.09	90.09
T475	82.30	82.30	82.30
W2622	79.71	79.71	79.71
W3048	83.12	83.12	83.12
W3267	86.67	86.67	86.67
W5070	90.67	90.67	90.67

Tabla 49. Valoración de la Integridad de la membrana el día 5 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	61.53	79.48	73.24
H0915	63.29	72.71	68.82
H2449	74.04	82.45	80.65
I9761	75.46	83.01	79.35
I9360	78.65	82.82	82.67
T475	71.12	78.67	81.09
W2622	73.04	77.24	78.93
W3048	70.02	76.87	76.34
W3267	74.23	82.54	83.67
W5070	75.98	80.62	80.98

Tabla 50. Valoración de la Integridad de la membrana el día 7 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	58.02	70.64	71.73
H0915	60.34	67.76	71.65
H2449	65.76	80.02	79.07
I9761	69.08	78.13	74.07
I9360	66.78	79.06	80.13
T475	60.67	69.32	77.89
W2622	71.08	71.13	76.49
W3048	67.65	72.34	73.78
W3267	68.56	78.02	75.37
W5070	67.90	74.52	78.83

Tabla 51. Valoración del Estado del acrosoma el día 0 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	90.50	90.50	90.50
H0915	88.16	88.16	88.16
H2449	93.23	93.23	93.23
I9761	95.81	95.81	95.81
I9360	92.65	92.65	92.65
T475	93.80	93.80	93.80
W2622	87.65	87.65	87.65
W3048	87.29	87.29	87.29
W3267	78.43	78.43	78.43
W5070	95.82	95.82	95.82

Tabla 52. Valoración del Estado del acrosoma el día 5 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	68.20	74.70	80.40
H0915	70.63	80.17	79.26
H2449	78.68	84.91	81.54
I9761	73.18	88.98	80.65
I9360	71.87	81.21	76.65
T475	70.73	75.02	77.05
W2622	81.85	83.41	88.01
W3048	79.28	85.09	87.31
W3267	73.91	75.72	75.54
W5070	66.19	74.71	78.21

Tabla 53. Valoración del Estado del acrosoma el día 7 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	54.30	71.60	72.40
H0915	65.90	73.40	75.90
H2449	60.18	69.73	72.92
I9761	66.29	70.13	73.34
I9360	63.98	78.34	76.99
T475	55.82	60.20	65.56
W2622	60.15	76.56	77.14
W3048	56.01	70.76	76.12
W3267	59.75	60.53	63.54
W5070	54.17	69.14	70.45

Tabla 54. Valoración de la movilidad (% total) el día 0 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	96.54	96.54	96.54
H0915	90.83	90.83	90.83
H2449	89.86	89.86	89.86
I9761	85.83	85.83	85.83
I9360	96.98	96.98	96.98
T475	71.37	71.37	71.37
W2622	83.49	83.49	83.49
W3048	74.45	74.45	74.45
W3267	88.18	88.18	88.18
W5070	80.34	80.34	80.34

Tabla 55. Valoración de la movilidad (% total) el día 5 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	71.15	79.22	80.10
H0915	75.71	74.23	77.27
H2449	58.13	67.47	71.16
I9761	70.33	74.33	73.03
I9360	71.03	76.96	77.37
T475	57.53	63.49	66.36
W2622	69.14	72.99	71.91
W3048	56.20	63.49	66.36
W3267	68.79	78.65	80.12
W5070	66.87	69.13	70.39

Tabla 56. Valoración de la movilidad (% total) el día 7 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	56.94	64.78	65.64
H0915	61.08	67.80	62.94
H2449	52.77	59.44	66.05
I9761	50.33	61.80	64.11
I9360	21.14	52.72	62.95
T475	53.85	57.36	61.73
W2622	49.77	63.07	67.72
W3048	53.85	57.36	61.73
W3267	53.26	65.79	70.05
W5070	54.86	62.78	64.20

Tabla 57. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 0 en semen refrigerado a 15°C.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	47.80	47.80	47.80
	VSL	25.40	25.40	25.40
	VAP	38.20	38.20	38.20
	LIN	0.55	0.55	0.55
	STR	0.68	0.68	0.68
	WOB	0.80	0.80	0.80
	ALH	1.81	1.81	1.81
	BCF	7.17	7.17	7.17
H0915	VCL	57.11	57.11	57.11
	VSL	29.69	29.69	29.69
	VAP	45.05	45.05	45.05
	LIN	0.53	0.53	0.53
	STR	0.65	0.65	0.65
	WOB	0.80	0.80	0.80
	ALH	2.04	2.04	2.04
	BCF	7.41	7.41	7.41
H2449	VCL	56.38	56.38	56.38
	VSL	29.24	29.24	29.24
	VAP	44.96	44.96	44.96
	LIN	0.52	0.52	0.52
	STR	0.65	0.65	0.65
	WOB	0.79	0.79	0.79
	ALH	1.97	1.97	1.97
	BCF	7.32	7.32	7.32
I9761	VCL	47.50	47.50	47.50
	VSL	30.83	30.83	30.83
	VAP	39.05	39.05	39.05
	LIN	0.64	0.64	0.64
	STR	0.78	0.78	0.78
	WOB	0.80	0.80	0.80
	ALH	1.62	1.62	1.62
	BCF	7.96	7.96	7.96
I9360	VCL	61.60	61.60	61.60
	VSL	25.78	25.78	25.78
	VAP	43.89	43.89	43.89
	LIN	0.43	0.43	0.43
	STR	0.60	0.60	0.60
	WOB	0.70	0.70	0.70
	ALH	2.29	2.29	2.29
	BCF	8.61	8.61	8.61

Tabla 58. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 0 en semen refrigerado a 15°C.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutati3n
T475	VCL	45.42	45.42	45.42
	VSL	19.86	19.86	19.86
	VAP	34.54	34.54	34.54
	LIN	0.43	0.43	0.43
	STR	0.59	0.59	0.59
	WOB	0.71	0.71	0.71
	ALH	1.66	1.66	1.66
	BCF	6.44	6.44	6.44
W2622	VCL	43.89	43.89	43.89
	VSL	20.02	20.02	20.02
	VAP	35.05	35.05	35.05
	LIN	0.45	0.45	0.45
	STR	0.58	0.58	0.58
	WOB	0.77	0.77	0.77
	ALH	1.56	1.56	1.56
	BCF	6.79	6.79	6.79
W3048	VCL	57.90	63.32	64.75
	VSL	23.21	26.44	27.42
	VAP	41.95	47.01	47.12
	LIN	0.41	0.44	0.44
	STR	0.58	0.58	0.60
	WOB	0.70	0.74	0.73
	ALH	2.11	2.20	2.33
	BCF	8.05	8.70	8.24
W3267	VCL	49.74	49.74	49.74
	VSL	25.36	25.36	25.36
	VAP	41.51	41.51	41.51
	LIN	0.51	0.51	0.51
	STR	0.63	0.63	0.63
	WOB	0.80	0.80	0.80
	ALH	1.61	1.61	1.61
	BCF	7.03	7.03	7.03
W5070	VCL	41.95	41.95	41.95
	VSL	20.90	20.90	20.90
	VAP	34.19	34.19	34.19
	LIN	0.48	0.48	0.48
	STR	0.61	0.61	0.61
	WOB	0.76	0.76	0.76
	ALH	1.47	1.47	1.47
	BCF	6.48	6.48	6.48

Tabla 59. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 5 en semen refrigerado a 15°C.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	84.53	84.05	92.38
	VSL	36.20	35.82	42.77
	VAP	61.34	60.28	66.50
	LIN	0.43	0.45	0.45
	STR	0.60	0.61	0.63
	WOB	0.71	0.72	0.71
	ALH	3.08	2.97	3.38
	BCF	7.95	8.99	7.37
H0915	VCL	57.05	95.22	73.86
	VSL	28.96	30.09	25.02
	VAP	44.86	64.30	48.83
	LIN	0.52	0.35	0.35
	STR	0.64	0.50	0.52
	WOB	0.79	0.68	0.66
	ALH	2.06	3.43	2.79
	BCF	7.40	9.34	7.13
H2449	VCL	53.78	75.28	73.52
	VSL	20.93	26.76	29.40
	VAP	31.86	47.74	44.89
	LIN	0.35	0.37	0.38
	STR	0.60	0.57	0.62
	WOB	0.57	0.64	0.59
	ALH	2.25	2.73	2.83
	BCF	7.64	10.18	9.23
I9761	VCL	78.11	74.32	81.05
	VSL	32.41	25.34	39.20
	VAP	57.20	56.60	59.23
	LIN	0.43	0.35	0.46
	STR	0.60	0.46	0.63
	WOB	0.71	0.73	0.71
	ALH	2.70	2.47	3.03
	BCF	8.92	6.72	7.16
I9360	VCL	78.00	83.70	66.33
	VSL	26.99	18.11	25.20
	VAP	52.78	40.39	41.94
	LIN	0.35	0.24	0.38
	STR	0.52	0.47	0.59
	WOB	0.65	0.50	0.62
	ALH	2.85	3.36	2.53
	BCF	8.16	7.83	8.62

Tabla 60. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 5 en semen refrigerado a 15°C.

Verraco	Parámetros	Control	Vitamina E	Glutación
T475	VCL	79.83	71.13	84.14
	VSL	27.51	22.85	34.88
	VAP	51.39	48.57	56.51
	LIN	0.35	0.32	0.42
	STR	0.54	0.51	0.62
	WOB	0.64	0.65	0.66
	ALH	3.07	2.77	3.10
	BCF	9.60	7.02	9.30
W2622	VCL	87.49	86.74	64.83
	VSL	28.10	21.32	18.79
	VAP	57.42	55.46	43.52
	LIN	0.34	0.25	0.32
	STR	0.53	0.40	0.49
	WOB	0.64	0.61	0.65
	ALH	3.24	3.31	2.51
	BCF	9.24	7.82	7.91
W3048	VCL	57.05	84.05	81.05
	VSL	28.96	35.82	39.20
	VAP	44.86	60.28	59.23
	LIN	0.52	0.45	0.46
	STR	0.64	0.61	0.63
	WOB	0.79	0.72	0.71
	ALH	2.06	2.97	3.03
	BCF	7.40	8.99	7.16
W3267	VCL	74.63	79.29	80.06
	VSL	31.84	37.11	30.19
	VAP	50.20	53.98	44.95
	LIN	0.44	0.46	0.37
	STR	0.65	0.68	0.64
	WOB	0.66	0.67	0.56
	ALH	2.91	2.91	3.32
	BCF	9.12	9.62	8.33
W5070	VCL	44.14	65.87	78.93
	VSL	21.50	22.43	31.32
	VAP	30.01	45.48	52.81
	LIN	0.48	0.36	0.40
	STR	0.70	0.53	0.61
	WOB	0.67	0.67	0.65
	ALH	1.68	2.45	3.00
	BCF	9.44	7.90	8.98

Tabla 61. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 7 en semen refrigerado a 15°C.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	74.09	77.18	87.67
	VSL	28.57	31.14	32.47
	VAP	53.23	57.24	59.33
	LIN	0.39	0.44	0.36
	STR	0.54	0.59	0.54
	WOB	0.70	0.73	0.65
	ALH	2.74	2.76	3.25
	BCF	7.27	8.41	8.25
H0915	VCL	62.06	83.45	79.88
	VSL	26.13	25.96	25.77
	VAP	40.72	54.64	46.51
	LIN	0.44	0.35	0.32
	STR	0.65	0.51	0.53
	WOB	0.66	0.66	0.57
	ALH	2.40	3.20	3.39
	BCF	8.97	7.89	7.21
H2449	VCL	53.77	81.10	73.76
	VSL	21.23	26.34	31.54
	VAP	32.06	48.98	46.95
	LIN	0.36	0.34	0.44
	STR	0.60	0.55	0.67
	WOB	0.57	0.59	0.64
	ALH	2.24	3.33	2.91
	BCF	7.58	7.58	8.35
I9761	VCL	40.39	73.10	79.93
	VSL	18.23	26.26	39.27
	VAP	26.70	52.01	58.97
	LIN	0.44	0.35	0.47
	STR	0.66	0.51	0.63
	WOB	0.64	0.67	0.71
	ALH	1.70	2.64	2.95
	BCF	7.27	7.38	7.15
I9360	VCL	53.15	87.29	64.32
	VSL	16.21	22.01	21.05
	VAP	33.61	49.74	37.42
	LIN	0.30	0.25	0.33
	STR	0.49	0.45	0.55
	WOB	0.58	0.56	0.58
	ALH	2.08	3.40	2.63
	BCF	6.13	7.70	7.22

Tabla 62. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos el día 7 en semen refrigerado a 15°C.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
T475	VCL	87.44	74.70	86.09
	VSL	30.38	26.49	30.50
	VAP	53.91	45.48	52.90
	LIN	0.34	0.35	0.37
	STR	0.57	0.56	0.59
	WOB	0.60	0.61	0.61
	ALH	3.37	3.05	3.26
	BCF	9.29	7.18	10.32
W2622	VCL	72.16	65.15	80.87
	VSL	28.15	18.75	24.52
	VAP	50.30	46.19	51.88
	LIN	0.40	0.32	0.34
	STR	0.57	0.45	0.52
	WOB	0.68	0.71	0.65
	ALH	2.85	2.53	3.04
	BCF	7.28	8.00	8.97
W3048	VCL	62.06	77.18	79.93
	VSL	26.13	31.14	39.27
	VAP	40.72	57.24	58.97
	LIN	0.44	0.44	0.47
	STR	0.65	0.59	0.63
	WOB	0.66	0.73	0.71
	ALH	2.40	2.76	2.95
	BCF	8.97	8.41	7.15
W3267	VCL	63.66	76.59	98.11
	VSL	26.32	28.90	31.73
	VAP	41.75	46.81	51.44
	LIN	0.43	0.38	0.34
	STR	0.63	0.60	0.61
	WOB	0.67	0.62	0.54
	ALH	2.60	3.22	4.23
	BCF	8.23	8.47	7.11
W5070	VCL	54.89	53.72	73.76
	VSL	24.73	21.02	31.54
	VAP	39.20	37.69	46.95
	LIN	0.45	0.39	0.44
	STR	0.63	0.56	0.67
	WOB	0.70	0.69	0.64
	ALH	2.05	2.05	2.91
	BCF	7.78	8.45	8.35

Tabla 63. Valoración de la Peroxidación Lipídica el día 0 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	0.32	0.32	0.30
H0915	0.38	0.36	0.34
H2449	0.32	0.30	0.30
I9761	0.36	0.34	0.32
I9360	0.27	0.23	0.18
T475	0.32	0.32	0.30
W2622	0.30	0.23	0.20
W3048	0.31	0.32	0.25
W3267	0.34	0.30	0.30
W5070	0.36	0.34	0.32

Tabla 64. Valoración de la Peroxidación Lipídica el día 5 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	0.41	0.36	0.34
H0915	0.47	0.41	0.40
H2449	0.49	0.41	0.36
I9761	0.45	0.38	0.36
I9360	0.40	0.34	0.23
T475	0.41	0.36	0.34
W2622	0.36	0.32	0.25
W3048	0.49	0.43	0.32
W3267	0.43	0.41	0.36
W5070	0.52	0.38	0.36

Tabla 65. Valoración de la Peroxidación Lipídica el día 7 en semen refrigerado a 15°C.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	0.52	0.58	0.43
H0915	0.60	0.47	0.50
H2449	0.54	0.45	0.38
I9761	0.56	0.47	0.43
I9360	0.50	0.41	0.40
T475	0.52	0.58	0.43
W2622	0.47	0.40	0.43
W3048	0.58	0.45	0.41
W3267	0.60	0.45	0.40
W5070	0.58	0.52	0.49

Tabla 66. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 0 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	75.30	78.10	79.60
H0915	71.40	79.90	78.50
H2449	67.50	71.60	75.40
I9761	65.90	72.60	76.30
I9360	68.30	71.20	73.90
T475	50.00	70.30	75.40
W2622	75.20	65.90	72.60
W3048	63.40	70.40	79.10
W3267	80.20	78.10	80.90
W5070	69.40	77.10	80.30

Tabla 67. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 1 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	65.10	75.20	76.10
H0915	65.80	70.10	73.40
H2449	63.20	67.30	73.60
I9761	60.20	68.20	71.40
I9360	61.40	70.70	71.20
T475	58.00	68.60	72.60
W2622	70.70	75.30	73.60
W3048	60.90	72.80	69.70
W3267	70.10	75.80	75.20
W5070	65.20	75.70	74.50

Tabla 68. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 2 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	57.20	65.10	70.20
H0915	60.60	68.30	71.10
H2449	55.80	61.90	67.20
I9761	56.40	62.40	68.20
I9360	56.90	60.00	67.10
T475	40.40	61.10	62.20
W2622	62.40	70.80	61.40
W3048	47.30	60.50	65.60
W3267	64.10	66.40	71.70
W5070	58.90	68.40	72.60

Tabla 69. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 3 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	45.20	58.10	60.60
H0915	42.80	58.30	62.40
H2449	50.20	58.20	65.10
I9761	39.40	58.40	62.40
I9360	50.20	55.20	62.40
T475	32.70	50.10	60.50
W2622	58.30	60.50	57.40
W3048	30.60	35.50	50.30
W3267	45.60	57.40	63.30
W5070	50.10	61.30	68.40

Tabla 70. Valoración de la Integridad de la membrana a la hora 4 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	30.00	52.60	56.10
H0915	36.70	45.10	58.20
H2449	41.10	50.40	58.90
I9761	33.80	43.80	55.10
I9360	40.40	49.70	56.10
T475	22.30	48.30	58.70
W2622	41.30	55.00	61.80
W3048	23.90	30.40	45.70
W3267	40.70	48.20	55.30
W5070	33.50	50.30	58.30

Tabla 71. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 0 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	89.20	90.60	92.70
H0915	88.90	90.40	93.60
H2449	85.40	91.10	94.30
I9761	83.70	90.10	94.50
I9360	89.90	85.70	88.00
T475	85.20	87.40	90.60
W2622	80.80	87.10	91.10
W3048	73.60	82.20	85.20
W3267	85.60	85.40	89.70
W5070	90.30	91.30	88.90

Tabla 72. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 1 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	81.90	85.50	89.10
H0915	80.10	86.70	90.20
H2449	80.10	87.70	89.20
I9761	76.70	85.40	88.20
I9360	72.40	82.50	85.30
T475	70.40	80.70	80.10
W2622	73.40	81.30	88.30
W3048	69.20	75.70	85.80
W3267	23.80	80.70	81.30
W5070	77.30	86.70	90.50

Tabla 73. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 2 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	69.20	76.20	83.40
H0915	71.40	75.50	83.60
H2449	73.90	80.90	81.30
I9761	69.20	75.70	82.60
I9360	67.20	70.40	80.80
T475	68.40	74.30	78.60
W2622	71.60	78.20	83.40
W3048	60.90	68.10	73.90
W3267	70.10	73.30	75.80
W5070	70.20	79.20	83.70

Tabla 74. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 3 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	61.60	72.40	77.60
H0915	60.90	63.70	71.60
H2449	65.40	85.60	78.80
I9761	61.20	70.80	78.70
I9360	60.30	68.20	77.00
T475	64.70	73.50	75.40
W2622	68.20	74.00	81.90
W3048	48.50	61.80	69.20
W3267	61.30	72.70	72.30
W5070	63.10	72.10	78.90

Tabla 75. Valoración del Estado del acrosoma a la hora 4 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	54.10	60.80	68.20
H0915	44.50	57.20	63.30
H2449	62.60	70.20	76.10
I9761	54.20	64.30	73.40
I9360	55.10	64.70	72.50
T475	55.20	68.70	67.40
W2622	58.30	66.60	71.20
W3048	32.30	50.40	60.40
W3267	56.70	65.50	69.20
W5070	55.50	65.90	72.10

Tabla 76. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 0 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	68.16	63.68	64.81
H0915	54.97	76.43	68.24
H2449	77.55	76.06	78.13
I9761	36.17	45.31	45.45
I9360	27.63	38.41	35.12
T475	67.43	66.67	50.00
W2622	46.43	48.91	48.45
W3048	11.11	40.46	18.42
W3267	65.99	66.84	71.00
W5070	32.26	39.06	31.09

Tabla 77. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 1 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	27.66	42.11	54.02
H0915	17.06	41.32	29.11
H2449	18.92	41.86	32.89
I9761	17.65	15.25	25.58
I9360	13.41	13.33	17.31
T475	41.44	51.83	22.82
W2622	41.44	42.55	45.71
W3048	1.73	11.45	7.84
W3267	39.74	25.31	68.75
W5070	16.67	25.86	16.36

Tabla 78. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 2 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	30.41	34.13	27.03
H0915	14.97	36.18	27.03
H2449	38.20	48.47	39.60
I9761	8.16	9.92	20.31
I9360	7.95	6.00	17.45
T475	31.67	16.99	20.13
W2622	21.15	22.64	31.48
W3048	3.63	12.10	2.40
W3267	46.43	23.81	48.45
W5070	18.90	12.08	16.56

Tabla 79. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 3 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	16.67	28.57	35.46
H0915	9.42	26.74	17.20
H2449	35.98	48.91	47.65
I9761	4.88	13.51	10.27
I9360	6.94	2.76	13.33
T475	20.65	27.74	5.56
W2622	15.33	16.44	13.29
W3048	3.09	8.18	7.14
W3267	43.37	28.14	36.55
W5070	15.65	18.42	19.05

Tabla 80. Valoración de Movilidad (% total) a la hora 4 en semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	16.67	30.46	35.37
H0915	8.84	15.29	19.86
H2449	34.08	43.07	41.38
I9761	11.51	11.68	9.42
I9360	3.65	.62	13.43
T475	7.55	7.98	6.47
W2622	6.94	6.18	21.29
W3048	4.03	5.73	6.06
W3267	23.87	20.26	44.12
W5070	15.71	20.61	19.08

Tabla 81. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 0 en semen descongelado.

Verraco	Parámetros	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	80.64	70.14	74.99
	VSL	56.15	44.81	50.24
	VAP	65.67	56.55	61.35
	LIN	0.66	0.59	0.65
	STR	0.82	0.73	0.78
	WOB	0.78	0.78	0.81
	ALH	2.51	2.22	2.26
	BCF	7.37	6.89	7.32
H0915	VCL	59.14	67.41	67.71
	VSL	41.67	46.16	47.03
	VAP	48.14	56.01	54.63
	LIN	0.65	0.64	0.67
	STR	0.81	0.78	0.83
	WOB	0.78	0.80	0.80
	ALH	1.85	1.98	2.17
	BCF	7.88	7.76	8.10
H2449	VCL	71.07	73.85	84.69
	VSL	42.85	46.65	51.47
	VAP	57.13	58.22	65.51
	LIN	0.58	0.61	0.59
	STR	0.72	0.77	0.75
	WOB	0.78	0.77	0.76
	ALH	2.34	2.54	2.99
	BCF	6.86	6.96	6.84
I9761	VCL	59.42	63.44	52.20
	VSL	39.23	41.41	40.75
	VAP	45.61	48.29	45.96
	LIN	0.61	0.56	0.71
	STR	0.76	0.76	0.82
	WOB	0.75	0.71	0.84
	ALH	2.01	2.39	1.39
	BCF	7.12	7.82	8.29
I9360	VCL	51.82	60.45	51.64
	VSL	29.23	35.03	32.88
	VAP	41.94	51.80	43.34
	LIN	0.54	0.58	0.63
	STR	0.69	0.68	0.74
	WOB	0.75	0.84	0.83
	ALH	1.71	1.73	1.69
	BCF	6.17	6.85	6.64

Tabla 82. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 0 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
T475	VCL	63.14	72.55	73.85
	VSL	38.56	50.51	46.86
	VAP	49.38	57.35	57.48
	LIN	0.57	0.66	0.61
	STR	0.73	0.83	0.78
	WOB	0.76	0.77	0.75
	ALH	2.23	2.34	2.45
	BCF	6.68	7.99	7.50
W2622	VCL	59.14	70.83	36.19
	VSL	41.67	42.74	29.27
	VAP	48.14	56.81	32.33
	LIN	0.65	0.58	0.75
	STR	0.81	0.72	0.85
	WOB	0.78	0.78	0.85
	ALH	1.85	2.33	1.02
	BCF	7.88	6.88	7.40
W3048	VCL	18.43	70.35	63.61
	VSL	14.44	46.12	40.93
	VAP	15.52	52.88	48.81
	LIN	0.74	0.58	0.58
	STR	0.89	0.78	0.76
	WOB	0.80	0.72	0.73
	ALH	0.67	2.53	2.23
	BCF	8.30	7.18	7.16
W3267	VCL	89.16	75.49	106.34
	VSL	58.70	54.15	70.75
	VAP	71.75	62.73	83.98
	LIN	0.62	0.65	0.65
	STR	0.79	0.79	0.82
	WOB	0.77	0.79	0.78
	ALH	2.69	2.29	3.39
	BCF	7.43	6.69	6.89
W5070	VCL	58.61	43.40	49.83
	VSL	42.31	31.14	33.93
	VAP	49.45	35.43	40.74
	LIN	0.65	0.64	0.62
	STR	0.77	0.81	0.77
	WOB	0.79	0.76	0.78
	ALH	1.78	1.40	1.52
	BCF	7.70	7.26	7.32

Tabla 83. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 1 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	49.74	48.46	56.00
	VSL	36.16	36.09	42.18
	VAP	41.86	42.29	48.57
	LIN	0.68	0.70	0.70
	STR	0.81	0.81	0.81
	WOB	0.81	0.85	0.83
	ALH	1.42	1.43	1.56
	BCF	7.55	8.14	8.17
H0915	VCL	52.76	44.68	52.10
	VSL	38.29	33.47	33.55
	VAP	43.72	38.58	40.89
	LIN	0.67	0.64	0.60
	STR	0.79	0.77	0.76
	WOB	0.80	0.80	0.75
	ALH	1.54	1.31	1.77
	BCF	7.44	6.98	7.35
H2449	VCL	20.83	30.83	37.93
	VSL	14.09	21.43	28.35
	VAP	17.34	25.88	32.43
	LIN	0.61	0.63	0.67
	STR	0.73	0.75	0.80
	WOB	0.80	0.81	0.81
	ALH	1.00	1.15	1.20
	BCF	5.32	5.81	6.94
I9761	VCL	34.40	48.46	39.47
	VSL	28.37	36.09	28.86
	VAP	30.68	42.29	31.37
	LIN	0.78	0.70	0.64
	STR	0.89	0.81	0.83
	WOB	0.87	0.85	0.75
	ALH	1.04	1.43	1.17
	BCF	7.60	8.14	7.90
I9360	VCL	35.26	33.22	43.28
	VSL	22.86	22.41	28.46
	VAP	29.75	27.52	36.48
	LIN	0.67	0.66	0.66
	STR	0.74	0.76	0.77
	WOB	0.86	0.85	0.81
	ALH	1.52	1.14	1.27
	BCF	5.17	7.04	6.91

Tabla 84. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 1 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
T475	VCL	50.77	61.14	55.16
	VSL	38.80	49.26	42.45
	VAP	42.79	53.81	48.64
	LIN	0.66	0.75	0.72
	STR	0.81	0.87	0.83
	WOB	0.78	0.84	0.84
	ALH	1.62	1.75	1.46
	BCF	6.42	7.58	8.01
W2622	VCL	52.76	40.97	56.00
	VSL	38.29	27.60	42.18
	VAP	43.72	33.70	48.57
	LIN	0.67	0.59	0.70
	STR	0.79	0.73	0.81
	WOB	0.80	0.78	0.83
	ALH	1.54	1.43	1.56
	BCF	7.44	7.17	8.17
W3048	VCL	40.55	59.63	49.44
	VSL	33.75	41.14	25.56
	VAP	35.94	51.58	34.82
	LIN	0.64	0.63	0.53
	STR	0.77	0.75	0.70
	WOB	0.77	0.79	0.71
	ALH	1.13	1.79	1.66
	BCF	5.93	6.79	8.18
W3267	VCL	54.91	43.30	68.57
	VSL	41.18	32.81	50.14
	VAP	47.85	37.28	58.75
	LIN	0.66	0.68	0.66
	STR	0.78	0.80	0.79
	WOB	0.81	0.81	0.81
	ALH	1.53	1.24	1.88
	BCF	6.41	7.37	7.30
W5070	VCL	28.45	55.09	36.76
	VSL	20.34	40.05	24.13
	VAP	24.80	47.34	30.44
	LIN	0.64	0.68	0.58
	STR	0.75	0.80	0.70
	WOB	0.82	0.82	0.76
	ALH	0.95	1.60	1.23
	BCF	6.79	7.68	7.34

Tabla 85. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 2 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	43.73	43.98	41.04
	VSL	35.36	34.70	30.01
	VAP	38.71	38.59	34.72
	LIN	0.77	0.75	0.66
	STR	0.89	0.86	0.78
	WOB	0.85	0.85	0.80
	ALH	1.18	1.22	1.25
	BCF	7.60	8.41	7.91
H0915	VCL	47.07	44.53	45.35
	VSL	38.18	34.65	32.58
	VAP	42.70	38.45	36.35
	LIN	0.81	0.72	0.67
	STR	0.89	0.84	0.83
	WOB	0.90	0.83	0.78
	ALH	1.21	1.24	1.36
	BCF	8.97	8.57	8.61
H2449	VCL	38.13	41.09	25.99
	VSL	27.02	27.61	18.86
	VAP	32.04	34.22	22.19
	LIN	0.65	0.66	0.69
	STR	0.78	0.77	0.79
	WOB	0.80	0.82	0.84
	ALH	1.34	1.42	1.00
	BCF	6.92	6.31	5.67
I9761	VCL	28.94	35.81	36.26
	VSL	24.39	33.13	29.59
	VAP	27.01	34.66	31.44
	LIN	0.82	0.91	0.82
	STR	0.87	0.92	0.93
	WOB	0.94	0.98	0.88
	ALH	0.97	0.71	1.16
	BCF	6.89	8.00	8.36
I9360	VCL	20.31	28.85	46.96
	VSL	15.73	25.93	35.44
	VAP	17.60	27.52	41.35
	LIN	0.75	0.86	0.73
	STR	0.84	0.91	0.83
	WOB	0.86	0.94	0.86
	ALH	0.74	0.79	1.30
	BCF	6.47	7.35	7.88

Tabla 86. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 2 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
T475	VCL	29.61	33.57	35.77
	VSL	18.75	22.43	26.55
	VAP	23.90	27.09	31.75
	LIN	0.60	0.63	0.68
	STR	0.74	0.77	0.80
	WOB	0.78	0.78	0.82
	ALH	1.15	1.28	1.06
	BCF	6.90	7.16	6.84
W2622	VCL	47.07	39.03	51.54
	VSL	38.18	29.93	36.81
	VAP	42.70	34.03	43.94
	LIN	0.81	0.71	0.69
	STR	0.89	0.81	0.80
	WOB	0.90	0.84	0.83
	ALH	1.21	1.15	1.56
	BCF	8.97	5.94	8.09
W3048	VCL	30.00	29.90	20.24
	VSL	14.56	21.86	16.08
	VAP	18.67	24.00	18.25
	LIN	0.47	0.68	0.74
	STR	0.70	0.83	0.81
	WOB	0.62	0.77	0.89
	ALH	1.42	0.98	0.81
	BCF	6.20	7.98	6.85
W3267	VCL	53.31	49.89	47.88
	VSL	45.57	43.20	34.18
	VAP	49.27	46.32	41.26
	LIN	0.82	0.84	0.67
	STR	0.89	0.92	0.79
	WOB	0.91	0.91	0.83
	ALH	1.20	1.09	1.39
	BCF	8.12	8.71	7.59
W5070	VCL	35.10	30.05	39.00
	VSL	24.60	23.99	30.83
	VAP	29.74	26.23	34.30
	LIN	0.71	0.74	0.70
	STR	0.83	0.84	0.81
	WOB	0.84	0.84	0.82
	ALH	1.11	0.97	1.17
	BCF	8.22	7.18	6.26

Tabla 87. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 3 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	40.92	40.37	39.00
	VSL	33.93	31.12	28.26
	VAP	37.82	35.21	33.53
	LIN	0.84	0.74	0.77
	STR	0.90	0.84	0.87
	WOB	0.92	0.86	0.86
	ALH	0.89	1.17	1.11
	BCF	8.75	8.03	7.63
H0915	VCL	37.93	38.38	42.30
	VSL	23.48	32.18	30.54
	VAP	28.06	33.85	34.70
	LIN	0.61	0.82	0.75
	STR	0.79	0.92	0.87
	WOB	0.76	0.88	0.84
	ALH	1.47	1.01	1.30
	BCF	7.49	7.99	8.74
H2449	VCL	41.57	40.04	36.39
	VSL	29.29	28.80	27.33
	VAP	35.37	33.85	31.40
	LIN	0.67	0.70	0.72
	STR	0.80	0.81	0.82
	WOB	0.81	0.84	0.86
	ALH	1.31	1.28	1.23
	BCF	7.08	7.00	6.96
I9761	VCL	20.74	22.93	37.89
	VSL	18.28	18.69	31.25
	VAP	19.57	21.41	33.10
	LIN	0.87	0.76	0.84
	STR	0.92	0.80	0.93
	WOB	0.94	0.92	0.91
	ALH	0.66	0.80	1.13
	BCF	7.83	6.21	7.79
I9360	VCL	17.85	23.85	43.75
	VSL	9.55	19.30	33.10
	VAP	11.96	20.60	38.98
	LIN	0.56	0.77	0.75
	STR	0.72	0.89	0.84
	WOB	0.70	0.83	0.86
	ALH	0.92	0.79	1.30
	BCF	3.69	8.92	7.40

Tabla 88. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 3 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
T475	VCL	25.53	27.07	38.01
	VSL	16.70	19.23	28.12
	VAP	20.36	21.84	33.45
	LIN	0.62	0.67	0.71
	STR	0.76	0.79	0.81
	WOB	0.77	0.78	0.84
	ALH	1.05	1.14	1.12
	BCF	6.83	5.97	7.73
W2622	VCL	37.93	35.66	42.97
	VSL	23.48	29.61	28.99
	VAP	28.06	31.34	33.73
	LIN	0.61	0.75	0.64
	STR	0.79	0.85	0.78
	WOB	0.76	0.83	0.78
	ALH	1.47	1.05	1.52
	BCF	7.49	6.27	6.72
W3048	VCL	41.57	36.09	32.50
	VSL	14.23	28.19	21.70
	VAP	22.95	32.27	26.52
	LIN	0.50	0.76	0.72
	STR	0.65	0.87	0.79
	WOB	0.66	0.87	0.88
	ALH	2.35	1.00	1.27
	BCF	5.24	9.65	6.35
W3267	VCL	49.75	35.91	50.46
	VSL	39.28	27.13	40.24
	VAP	44.75	31.82	45.39
	LIN	0.76	0.72	0.75
	STR	0.84	0.81	0.84
	WOB	0.87	0.86	0.87
	ALH	1.28	1.19	1.26
	BCF	7.55	6.70	7.76
W5070	VCL	31.58	43.55	40.71
	VSL	21.54	35.76	27.08
	VAP	25.74	38.78	31.85
	LIN	0.67	0.82	0.64
	STR	0.82	0.90	0.81
	WOB	0.79	0.90	0.77
	ALH	1.16	1.25	1.44
	BCF	7.87	8.17	8.14

Tabla 89. (1) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 4 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	VCL	36.75	38.64	36.19
	VSL	29.43	29.64	29.27
	VAP	32.29	33.56	32.33
	LIN	0.76	0.72	0.75
	STR	0.86	0.82	0.85
	WOB	0.87	0.84	0.85
	ALH	1.04	1.25	1.02
	BCF	6.94	7.27	7.40
H0915	VCL	27.49	40.48	38.49
	VSL	22.25	32.03	30.60
	VAP	24.60	37.77	33.06
	LIN	0.79	0.77	0.75
	STR	0.85	0.83	0.86
	WOB	0.89	0.91	0.84
	ALH	0.86	1.04	1.22
	BCF	7.49	7.22	6.95
H2449	VCL	38.02	34.49	31.65
	VSL	27.46	24.31	23.62
	VAP	32.43	28.86	27.67
	LIN	0.66	0.66	0.71
	STR	0.78	0.79	0.81
	WOB	0.82	0.81	0.86
	ALH	1.28	1.21	1.17
	BCF	7.10	7.07	6.45
I9761	VCL	26.32	22.26	31.53
	VSL	17.49	17.63	25.18
	VAP	24.03	19.61	29.71
	LIN	0.73	0.79	0.84
	STR	0.79	0.85	0.88
	WOB	0.90	0.89	0.94
	ALH	0.79	0.86	0.84
	BCF	7.83	5.88	7.36
I9360	VCL	20.23	17.42	45.08
	VSL	9.88	8.80	33.76
	VAP	14.76	10.72	39.90
	LIN	0.57	0.52	0.66
	STR	0.65	0.73	0.76
	WOB	0.77	0.63	0.85
	ALH	1.45	1.04	1.57
	BCF	3.16	4.17	6.03

Tabla 90. (2) Valoración de los Parámetros cinéticos a la hora 4 en semen descongelado.

Verraco	Parámetro	Control	Vitamina E	Glutación
T475	VCL	15.84	38.44	30.14
	VSL	10.55	23.09	22.45
	VAP	12.92	27.60	26.09
	LIN	0.64	0.45	0.69
	STR	0.78	0.61	0.80
	WOB	0.80	0.69	0.82
	ALH	0.86	1.52	0.95
	BCF	5.34	6.33	6.94
W2622	VCL	27.49	25.62	45.06
	VSL	22.25	19.58	35.81
	VAP	24.60	22.26	40.81
	LIN	0.79	0.74	0.75
	STR	0.85	0.84	0.83
	WOB	0.89	0.88	0.87
	ALH	0.86	1.03	1.14
	BCF	7.49	6.67	7.48
W3048	VCL	17.28	25.74	30.01
	VSL	15.69	10.52	23.83
	VAP	17.01	14.55	27.09
	LIN	0.91	0.53	0.77
	STR	0.92	0.74	0.83
	WOB	0.96	0.67	0.91
	ALH	0.81	1.39	0.94
	BCF	3.70	5.39	6.99
W3267	VCL	36.83	36.86	54.94
	VSL	30.25	31.47	42.85
	VAP	33.67	33.64	49.79
	LIN	0.78	0.79	0.75
	STR	0.86	0.87	0.83
	WOB	0.88	0.87	0.88
	ALH	0.97	0.93	1.38
	BCF	7.18	8.22	7.97
W5070	VCL	27.65	31.96	36.12
	VSL	22.21	24.95	28.35
	VAP	24.40	28.92	31.50
	LIN	0.78	0.76	0.76
	STR	0.88	0.84	0.87
	WOB	0.88	0.89	0.87
	ALH	0.85	1.03	1.08
	BCF	8.46	6.43	7.07

Tabla 91. Valoración de la Peroxidación Lipídica en el semen descongelado.

Macho	Control	Vitamina E	Glutación
G9282	0.43	0.38	0.32
H0915	0.56	0.47	0.40
H2449	0.40	0.49	0.54
I9761	0.40	0.36	0.30
I9360	0.54	0.40	0.30
T475	0.60	0.40	0.32
W2622	0.41	0.36	0.32
W3048	0.54	0.41	0.32
W3267	0.50	0.67	0.36
W5070	0.40	0.40	0.32