

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**CARACTERIZACIÓN DE LA VIABILIDAD, MOTILIDAD Y
ESTADO OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO
PARA SU USO EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

JUAN MANUEL VALENZUELA ORMEÑO

TEMUCO – CHILE
2014

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**CARACTERIZACIÓN DE LA VIABILIDAD, MOTILIDAD Y
ESTADO OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO
PARA SU USO EN INSEMINACIÓN ARTIFICIAL**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

JUAN MANUEL VALENZUELA ORMEÑO

PROFESOR GUIA: FERNANDO ROMERO MEJIA

TEMUCO – CHILE
2014

“CARACTERIZACIÓN DE LA VIABILIDAD, MOVILIDAD Y ESTADO OXIDATIVO
DE ESPERMATOZOIDES DE VERRACO PARA SU USO EN INSEMINACIÓN
ARTIFICIAL”

PROFESOR GUIA

Dr. Fernando Romero Mejía
Centro de Neurociencias y Biología de
Péptidos – CEBIOR
Universidad de La Frontera

PROFESORES CONSEJEROS

Dra. Magdalena Cuevas Troncoso
Centro de Neurociencias y Biología de
Péptidos – CEBIOR
Universidad de La Frontera

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

:

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas a las que debo agradecer la realización de esta tesis, partiendo por mi familia, gracias por toda la confianza que depositaron en mí. También me gustaría agradecer a todo el personal del laboratorio, a la Dra. Magdalena Cuevas, por sus consejos y su paciencia; al Dr. Fernando Romero, por darme la posibilidad de realizar mi tesis en su laboratorio; al estudiante de doctorado Ignacio Jofré, por sus consejos para la realización de los experimentos; a los estudiantes de biotecnología Camila Robles y César Pezoa, por su buen sentido del humor. Además quiero dar las gracias al BQ. Carlos Kramm y la BQ. Magdalena Esparza por ayudarme a dar los primeros pasos en la realización de esta tesis. Agradecimientos especiales para Paulina Ferrada por su invaluable ayuda con los experimentos del citómetro. A mis amigos y amigas por sus palabras de apoyo y ánimo cuando lo necesitaba. También es necesario agradecer al Sr. Sergio Reyne y al personal de la Sociedad Agrícola y Ganadera Pehuen Ltda. por la facilitación del material biológico. Agradecimientos para el proyecto FIA PYT-2013-0035 por el financiamiento prestado para la realización de esta tesis.

Probablemente falto nombrar muchas personas que merecen mi gratitud, para ellos mi más sincero afecto.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Contexto general	3
2.2	Origen y morfofisiología espermática	7
2.3	Alteraciones de la morfofisiología espermática y su impacto en IA	14
2.4	Uso de diluyentes	20
2.5	Estabilizadores espermáticos en la preservación de semen	22
3	JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	25
3.1	Hipótesis	26
3.2	Objetivo general	26
3.3	Objetivos específicos	26
4	MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1	Obtención de muestras y diseño experimental	27
4.2	Evaluación de la viabilidad	27
4.3	Análisis seminal asistido por computador (CASA)	28
4.4	Medición de anión superóxido	29
4.5	Evaluación de la peroxidación lipídica	29
4.6	Análisis estadístico	30
5	RESULTADOS	31
5.1	Objetivo 1: Estudiar la viabilidad y motilidad de espermatozoides porcinos mantenidos 16°C por 11 y 7 días respectivamente.	31
5.1.1	Viabilidad espermática	31
5.1.2	Motilidad espermática	38
5.1.3	Parámetros asociados a la motilidad espermática	40
5.2	Objetivo 2: Determinar el nivel de ROS intracelular en espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C por 11 días.	48
5.3	Objetivo 3: Estudiar los niveles de peroxidación lipídica de la	51

	membrana de espermatozoides de verraco preservados a 16°C por 11 días.	
6.	DISCUSIÓN	55
6.1	Objetivo 1: Estudiar la viabilidad y motilidad en el tiempo de espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C.	55
6.1.1	Viabilidad espermática	55
6.1.2	Motilidad espermática	56
6.2	Objetivo 2: Determinar el nivel de ROS intracelular en espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C por 11 días.	59
6.3	Objetivo 3: Estudiar los niveles de peroxidación lipídica de la membrana de espermatozoides de verraco preservados a 16°C por 11 días.	60
7	CONCLUSIONES	62
8	LITERATURA CITADA	63
9	ANEXO	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representación esquemática del ciclo de la espermatogénesis.	9
Figura 2	Representación esquemática de las partes principales de un espermatozoide de verraco y sus dimensiones típicas.	10
Figura 3	Citogramas de viabilidad de espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C	33
Figura 4	Tendencia en el porcentaje de la viabilidad espermática.	34
Figura 5	Porcentaje de viabilidad de espermatozoides de verracos entre 2 rangos etarios	36
Figura 6	Porcentaje de viabilidad de espermatozoides de verracos mantenidos a 16°C durante 11 días	37
Figura 7	Porcentaje de motilidad espermática en verracos jóvenes y maduros y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C	39
Figura 8	Progresión de la aglutinación espermática en una dosis seminal de verraco mantenida a 16°C durante 7 días	40
Figura 9	Velocidad curvilínea (VCL) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C	41
Figura 10	Velocidad en línea recta (VSL) en espermatozoides de verracos	42

jóvenes y maduros y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C

Figura 11	Velocidad promedio del recorrido (VAP) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C	43
Figura 12	Porcentaje de linealidad (LIN) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C	44
Figura 13	Índice de rectitud (STR) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C	45
Figura 14	Amplitud de desplazamiento de la cabeza ALH en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B)	46
Figura 15	Frecuencia de cruce de batido (BCF) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C	47
Figura 16	Citogramas de detección de anión superóxido en semen de verraco	50
Figura 17	Producción de anión superóxido expresado en la unidad arbitraria de intensidad de fluorescencia media	51
Figura 18	Citogramas de detección de peroxidación lipídica en semen de verraco	53

Figura 19 Peroxidación lipídica en espermatozoides de verraco expresada en la 54
unidad arbitraria de intensidad de fluorescencia media

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Producción de carne a nivel mundial	3
Tabla 2	Producción de carne en Chile	4
Tabla 3	Consumo de carne en Chile	5
Tabla 4	Terminología del sistema CASA: definición de las abreviaturas.	19
Tabla 5	Composición (g/L) de los diluyentes espermáticos más utilizados en inseminación porcina	22
Tabla 6	Tabla 6. Estabilizadores de membrana utilizados en la preservación del semen de diferentes especies	24

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentración de calcio interno
ADN	ácido desoxirribonucleico
ALH	Amplitud de desplazamiento de la cabeza
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosín trifosfato
BCF	Frecuencia de cruce de batido
BSA	Albúmina de suero bovino
Ca ²⁺	Calcio
CASA	Análisis de Semen asistido por computador
CatSpers	Canal catiónico del espermatozoide
CaV	Canales de calcio dependientes de voltaje
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HCO ₃ ⁻	Bicarbonato
HEPES	Ácido etanosulfónico hidroxietil piperazina
IA	Inseminación artificial
IAC	Inseminación artificial cervical
IAIU	Inseminación artificial intrauterina
IAIUP	Inseminación artificial intrauterina profunda
IP	Ioduro de propidio
IP3	inositol 1,4,5-trifosfato
K ⁺	Potasio
KCl	Cloruro de potasio
LH	Hormona luteinizante
LIN	Linealidad

Mg ²⁺	Magnesio
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mOsm	Miliosmol
Na ⁺	Sodio
NaCl	Cloruro de sodio
O ₂ ⁻	Anión súper oxido
OH ⁻	Radical hidroxilo
PVA	El alcohol de polivinilo
RA	Reacción acrosómica
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	superóxido dismutasa
STR	Rectitud
TRIS	Trisaminometano
VAP	Velocidad media de la trayectoria
VCL	Velocidad curvilínea
VSL	Velocidad en línea recta
ZP	Zona pelúcida
ZP3	Proteína de unión espermatozoides-zona pelúcida 3

RESUMEN

El consumo de carne porcina se ha incrementado notablemente durante las últimas décadas, siendo el segundo aporte de proteína en humanos después del consumo de carne de aves. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), esta parece ser una tendencia que continuara. Ello ha demandado un mejoramiento en la producción y los sistemas de reproducción asociados. Por lo tanto, se han tenido que modificar la producción porcina de método extensivo a métodos intensivos, con lo que se ha tenido como consecuencia el desarrollo de la IA porcina. Para tal caso, se han desarrollado diversos estudios enfocados en la fisiología del espermatozoide, con la finalidad de utilizar el conocimiento de estas características en post del desarrollo y mejoramiento de esta técnica. Resultando de gran importancia en la industria porcina la aplicación de métodos con alto valor en biotecnología relacionada con la reproducción.

Este trabajo, tiene como objeto, el estudio la evaluación de la viabilidad, parámetros de movilidad, producción de anión superóxido y peroxidación lipídica en espermática de espermatozoides de verraco pertenecientes a explotaciones ganaderas intensivas de la novena región. Estas evaluaciones se realizaron en base a dos rangos etarios de verracos y en base a los días que la muestra fue mantenida a 16°C, con excepción de la evaluación de peroxidación lipídica que no fue evaluada según rango etario.

Para llevar a cabo el estudio de la viabilidad se realizó la técnica de microscopia clásica que utiliza eosina-nigrosina, en conjunto con la evaluación por citometría de flujo basada en el uso de los fluoróforos SYBR14 e IP. El estudio de la movilidad fue realizado mediante el sistema CASA. Para el caso de la evaluación de producción de anión superóxido y peroxidación lipídica, se utilizaron los fluoróforos DHE-SYTOX Green y BODIPY C11-IP respectivamente, estos fueron detectados mediante citometría de flujo.

Los resultados de estas evaluaciones indicaron que, según el rango etario, es posible evidenciar diferencias entre los verracos jóvenes y maduros para las evaluaciones de viabilidad y movilidad, no así para la evaluación de anión superóxido. La evaluación en base a los días que la muestra fue mantenida a 16°C, presentó diferencias en los días 9 y 11 para las evaluaciones de viabilidad y anión superóxido, pero para el caso de la evaluación de peroxidación lipídica, estas diferencias fueron solo apreciables al día 11. En el caso de la movilidad espermática, se encontraron diferencias el día 4, 5 y 7, aunque estas diferencias no se aprecian en la totalidad de los parámetros asociados a la movilidad espermática.

En base al análisis estadístico de ANOVA, se estima que la calidad fecundante de la dosis seminal, solo se mantiene durante 2 días luego de la extracción, característica principalmente influenciada por la movilidad espermática, ya que el resto de los parámetros evaluados se mantienen constantes durante un mayor periodo de tiempo.

ABSTRACT

The consumption of pork has increased markedly in recent decades, becoming the second protein intake in humans after consumption of poultry meat. According to the United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), this seems to be a trend that will continue. This has demanded an improvement in the production and reproduction systems associated. Therefore, they have had to modify the swine production methods extensive to intensive method, which has resulted in the development of swine IA. For such case, there have been several studies focused on the physiology of sperm, in order to use the knowledge of these features in post development and improvement of this technique. Resulting of great importance in the swine industry with the application of high-value methods in biotechnology related to reproduction.

This work aims, study the feasibility assessment, mobility parameters, superoxide anion production and lipid peroxidation in boar sperm sperm intensive livestock farms belonging to the ninth region. These assessments were performed based on two age ranges boars and based on the sample was kept at 16 ° C, except for the evaluation of lipid peroxidation was not evaluated by age range.

To perform the viability study was conducted using classical microscopy eosin-nigrosin technique, together with the assessment by flow cytometry based on the use of fluorophores SYBR14 and IP was performed. The motility study was performed using the CASA system. In the case for the evaluation of the superoxide anion production and lipid peroxidation, was used the DHE-SYTOX Green, BODIPYC11-IP fluorophores respectively, they were detected by flow cytometry.

The results of these evaluations indicated that, by age range, it is possible to show differences between young and mature boars for assessments for viability and motility, but not for the evaluation of superoxide anion. Evaluation based on the sample was kept at 16 ° C, showed differences on days 9 and 11 for viability assessments and superoxide anion, but in the case of the evaluation of lipid peroxidation, these differences were only significant

day 11. In the case for sperm motility, differences were found on day 4, 5 and 7, although these differences were not seen in all the parameters associated with sperm motility.

Based on the statistical analysis of ANOVA, it is estimated that the fertilizing quality of seminal doses, only is maintained for 2 days after the extraction, feature mainly influenced by sperm motility, since the rest of the evaluated parameters are constant during a longer period of time

1. INTRODUCCIÓN

La tendencia mundial en el aumento del consumo de productos cárnicos porcinos ha obligado a la optimización del proceso reproductivo introduciendo mejoras biotecnológicas como la inseminación artificial (IA) y posteriormente diversas optimizaciones del mismo (Johnson *et al.*, 1981; Rocha *et al.*, 2011). Se estima que esta tendencia seguirá en aumento, por lo cual introducir mejoras en los procesos productivos resulta vital (Rocha *et al.*, 2011).

Dentro de lo que es la IA porcina se ha realizado un gran esfuerzo por mantener el mayor tiempo posible la calidad del material fecundante, característica que es un punto crítico en la implementación de nuevas mejoras reproductivas (Vyt *et al.*, 2004; Vyt *et al.*, 2008; Waberski *et al.*, 2008). Como consecuencia de esto, se han desarrollado diversos medios que permiten aumentar la longevidad del semen, permitiendo, por una parte, utilizar el semen varios días luego de su extracción, y que además, permite aumentar el número de hembras que pueden ser fecundadas (Johnson *et al.*, 2000b). Aunque los medios de preservación proveen al espermatozoide de un ambiente protector y aumentan considerablemente la ventana de tiempo en que puede ser utilizada la dosis seminal, han fallado en proteger al espermatozoide frente a cambios rápidos de temperatura (Johnson *et al.*, 2000b). La característica principal que vuelve al espermatozoide de verraco tan susceptible a los choques térmicos, se encuentra en su membrana, está en comparación con la de espermatozoides de otros mamíferos, posee una baja cantidad de colesterol y un alto grado de lípidos insaturados (Parks y Lynch, 1992; Bonet *et al.*, 2013). Estas características, a su vez, vuelven al espermatozoide de verraco susceptible a sufrir daños causados por ROS (Alvarez y Storey, 1992; O'Flaherty *et al.*, 1997; Mazur *et al.*, 2000; Großfeld *et al.*, 2008.) Tales características han impedido el desarrollo adecuado de las técnicas de criopreservación en la IA porcina (Johnson *et al.*, 2000b). En base a las alteraciones que podrían ocurrir durante la recolección y preservación de la dosis seminal, se planteó el objetivo de estudiar el efecto del tiempo y la edad sobre espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C que son utilizados en IA, considerando los parámetros de

viabilidad, motilidad, producción de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica. La relevancia de esto, se basa en que es posible evidenciar un aumento en el de deterioro de estos parámetros, los que tendrían una directa relación con la edad del verraco y con la cantidad de días que la muestra es mantenida a 16°C, lo que sería útil para determinar la calidad de las dosis seminales utilizado en explotaciones ganaderas intensivas de la novena región. Con la finalidad de utilizar los resultados obtenidos como guía para la optimización de procesos de recogida de la dosis seminal o como apoyo a los sistemas de selección de verracos de alto rendimiento reproductivo. Además de servir como punto inicial para la implementación de un análogo peptídico con capacidad estabilizadora de membrana.

Financiado por el proyecto FIA PYT-2013-0035

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contexto general

En la actualidad el consumo de carne porcina se encuentra entre una de las más consumidas a nivel mundial con un 37% del total de carne consumida (Tabla 1.), esta se encuentra a la par con el consumo de carne de ave (McGlone, 2013). Se espera que esta tendencia se mantenga y que además el consumo de carne, tanto de ave como de porcino, se vea notoriamente incrementado durante los próximos 30-50 años (McGlone, 2013). Las causas de esta tendencia se explican por el aumento de la población y por la rapidez con que los sistemas intensivos de producción porcina y avícola son susceptibles a aplicar los cambios tecnológicos y mejoras de producción, muchos de los cuales son asociados a sus cortos ciclos reproductivos en comparación con especies como la bovina o la ovina (Bouwman *et al.*, 2005). **Teniendo en consideración que la carne es una de las principales fuentes de proteínas y micronutrientes en la dieta humana, la carne porcina, debido a su nivel de producción y consumo, se encontraría entre las principales fuentes de proteínas y micronutrientes (Higgs, 2000).**

Tabla 1. Producción de carne a nivel mundial (miles de toneladas, equivalente de peso en canal) (FAO Food Outlook, 2013)

Año	Bovino	Ovino	Porcino	Ave
2010-2012	66891	13854	109793	103257
2013	67212	14102	111717	108354
Año	% Bovino	% Ovino	% Porcino	% Ave
2010-2012	22,8	4,7	37,4	35,1
2013	22,3	4,7	37,1	36,0

Para el caso de Sudamérica, la producción de carne porcina aumento drásticamente durante la última década en países como Brasil 450%, Argentina 112% y Chile 65% (Riesenbeck, 2011). Con más especificidad en el caso de la industria porcina Chilena, según datos del instituto nacional de estadísticas (INE producción pecuaria, 2013), la producción de carne porcina ha ido en aumento desde el año 2007 con un 37,45% hasta un 39,81 % el 2012 (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de carne en Chile (Toneladas de carne en vara) (INE, Producción Pecuaria, 2013)

Año	Bovino	Ovino	Porcino	Ave
2007	241677	10311	498706	581034
2008	240257	11040	522423	611511
2009	209853	10698	513741	604048
2010	210745	10545	498489	593837
2011	190979	11176	527857	657043
2012	197571	9612	583673	675150

Año	% Bovino	% Ovino	% Porcino	% Ave
2007	18,15	0,77	37,45	43,63
2008	17,34	0,80	37,71	44,15
2009	15,68	0,80	38,39	45,13
2010	16,04	0,80	37,95	45,21
2011	13,77	0,81	38,06	47,37
2012	13,48	0,66	39,81	46,05

Esta tendencia se ve reflejada en el consumo de carne por habitante, el cual durante el 2012 fue de un 30,74% del total de carne consumida por persona, siendo solo superada por la carne de ave con un 42,92% y seguido por el consumo de carne de bovino con un 25,99% (Tabla 3). **Es por esto que optimizar los procesos reproductivos, mejorando la calidad**

y durabilidad del material fecundante resulta sumamente importante (Milovanović *et al.*, 2012).

Tabla 3. Consumo de carne en Chile (Kg/habitante) (INE, Producción Pecuaria, 2013)

Año	Bovino	Ovino	Porcino	Ave
2007	23,5	0,3	23,5	33,2
2008	22	0,4	25	33,3
2009	22,5	0,3	24	31,9
2010	23,6	0,2	24,4	33,3
2011	21,7	0,3	25,6	36,7
2012	22,4	0,3	26,5	37

Año	% Bovino	% Ovino	% Porcino	% Ave
2007	29,19	0,37	29,19	41,24
2008	27,26	0,50	30,98	41,26
2009	28,59	0,38	30,50	40,53
2010	28,96	0,25	29,94	40,86
2011	25,74	0,36	30,37	43,53
2012	25,99	0,35	30,74	42,92

Debido al aumento en la demanda de carne porcina anteriormente señalado y por consiguiente la necesaria optimización de los procesos de explotación intensiva para satisfacer la demanda comercial, se ha implementado el uso de la inseminación artificial en este rubro (Gadea, 2003). La IA porcina Tiene como finalidad dar el mejor uso posible a las dosis seminales, permitiendo la fecundación de un gran número de hembras sin tener la necesidad de requerir grandes cantidades de semen, realizar mejoramiento genético al introducir genes de interés y poder generar líneas puras, evitar la transmisión de enfermedades, todas características difíciles de lograr con el método de monta natural (Maes *et al.*, 2008; Ronald *et al.*, 2013). Esta técnica, en las explotaciones porcinas, se vio notoriamente influenciada por las investigaciones realizadas por Pursel y Johnson (1975),

que concluyeron con el desarrollo del medio Beltsville TS (BTS), y además con la implementación de mejoras a los protocolos de inseminación realizados durante los años 80, esto permitió el desarrollo real a escala comercial de la IA porcina (Johnson *et al.*, 1981; Foote, 2002; Gadea, 2003). En la actualidad, el desarrollo de la IA porcina se encuentra tan masificado, que se utiliza extensivamente en las granjas comerciales de todo el mundo desarrollado (Govindasamy *et al.* 2013). Como se mencionó anteriormente, la IA porcina presenta una serie de ventajas sobre métodos tradicionales como la monta natural, **pero aun así su optimización no ha sido posible en su totalidad, principalmente debido a que el espermatozoide de verraco es altamente sensible a los choques térmicos, en especial a temperaturas inferiores a 15°C, lo que altera la función espermática y la viabilidad, siendo esta especial característica del espermatozoide porcino la que ha imposibilitado el uso de la IA con semen congelado** (Simpson *et al.*, 1987; Watson, 1995; Johnson *et al.*, 2000b; Gadea, 2003). Para intentar solucionar esta deficiencia, en el caso del uso de semen refrigerado en un rango de temperatura de 15 a 18 °C, se han adicionado a los diluyentes de preservaciones diversos componentes que confieren al medio la habilidad de proveer un ambiente metabólico y protector adecuado (Johnson *et al.*, 1988; Gadea, 2003).

Sin embargo, aun cuando la constitución del medio de refrigeración busca prologar la vida útil de la dosis seminal, este objetivo no se ha logrado concretar debido a que el almacenamiento en diluyentes disminuye progresivamente la fertilidad con el pasar de los días, esto debido a la perdida de ATP, cAMP, aumento de la permeabilidad de la membrana, reducción en la captura de calcio y desencadenamiento de los procesos de capacitación y reacción acrosómica (RA); estas características forman parte del proceso de envejecimiento celular, el cual aún no se ha logrado evitar durante el almacenamiento (Johnson *et al.*, 2000). En el caso de la criopreservación de semen porcino, esta no se ha usado de forma comercial debido a la baja congelabilidad del semen porcino en comparación con otros animales (Okazaki y Shimada, 2012). Por lo tanto, aún no resulta económicamente viable utilizar semen refrigerado, ya que este solo conserva menos de un 50 % de espermatozoides con capacidad fecundante, además la tasa de fecundidad se

reduce entre un 10% a un 25% y el tamaño de la camada disminuye entre 1 a 3 lechones, esto en comparación con el uso de dosis seminales refrigeradas en diluyentes (Waterhouse *et al.*, 2006). Para dar una solución a esta problemática se han desarrollado, al igual que en el caso de la mantención de dosis seminales refrigeradas, diferentes medios con el enfoque de lograr disminuir el impacto causado por el proceso de congelación y descongelación (Johnson *et al.*, 2000b). Estos medios están basados en diversos agentes crioprotectores (ACP) para evitar el daño causado por los procesos de congelación y descongelación (Johnson *et al.*, 2000b). El más común de estos es el glicerol, que usado a concentraciones del 2 al 3 % a una temperatura de 5°C, disminuye el daño sobre los espermatozoides congelados, pero este no es el único ACP utilizado, ya que también se han utilizado detergentes, alcoholes, dioles, amidas y azúcares (Rodríguez y Wallgren, 2010). Estos han presentado resultados variables, principalmente por las diferencias de congelabilidad entre verracos (Rodríguez y Wallgren, 2010). En base a esto **¿Qué otras alternativas se podrían explorar para superar los problemas de congelabilidad del semen porcino?**

2.2 Origen y morfofisiología del espermatozoide porcino

Para contextualizar la problemática que presenta la IA porcina, es necesario entregar algunos antecedentes claves que permitan entender los cambios y alteraciones que sufre el espermatozoide desde su formación en los túbulos seminíferos, luego de la eyaculación, durante el proceso de almacenamiento y en los momentos previos a la fecundación. Bajo esta premisa comenzaremos por describir de forma generalizada el sistema reproductivo porcino y los procesos que involucran el desarrollo del espermatozoide.

Como es característico en los mamíferos, el sistema reproductivo está constituido por dos testículos, dos epidídimos, la uretra, dos conductos deferentes, tres glándulas que consisten en las vesículas seminales, bulbouretral y la próstata; y el pene (Dagoon, 1989; Gillespie y Flanders, 2010). El sistema reproductivo cumple la función de desarrollar la

espermatogénesis o producción de células germinales masculinas, el cual se puede definir como un largo proceso, cronológicamente regulado, que ocurre dentro de los túbulos seminíferos del testículo, en el cual las espermatogonias, células madres especializadas, se dividen mediante el proceso de mitosis para cíclicamente generar espermátocitos primarios, estos últimos generaran, luego de dos divisiones meióticas, células haploides llamadas espermátidas las que tras procesos de maduración y diferenciación dan origen a los espermatozoides (Figura 1A) (Roosen-Runge, 1962; Johnson *et al.*, 2000a). En el verraco se distinguen cuatro tipos de espermatogonias: Espermatogonias de tipo A indiferenciada, espermatogonia de tipo A diferenciada, espermatogonia intermedia y espermatogonia de tipo B (França *et al.*,2005). Las espermatogonias cumplen los roles de iniciar la espermatogénesis, aumentar la cantidad de células germinales y de regular el número de células germinales en desarrollo (De Rooij y Russell, 2000). Además de las espermatogonias, se pueden encontrar otros tipos de células sumamente importantes en el proceso de espermatogénesis como las células de Sertoli y las células de Leydig (Figura 1B) (França *et al.*,2005). Las células de Sertoli entregan soporte y nutrición a las células germinales en desarrollo, compartimentalización del túbulo seminífero mediante uniones estrechas para proveer un ambiente protegido y especializado para el desarrollo de células germinales, liberación de las espermátidas en el lumen tubular, secreción de fluidos, proteínas y factores de crecimiento, fagocitosis de células germinales degeneradas y de restos citoplasmáticos de la liberación espermática, mediación de las acciones para la producción de testosterona estimulada por la hormona luteinizante (LH) (França *et al.*,2005). Las células de Leydig tienen como principal función la secreción de testosterona, que es inducida por la acción de LH (Hardy, 2008).

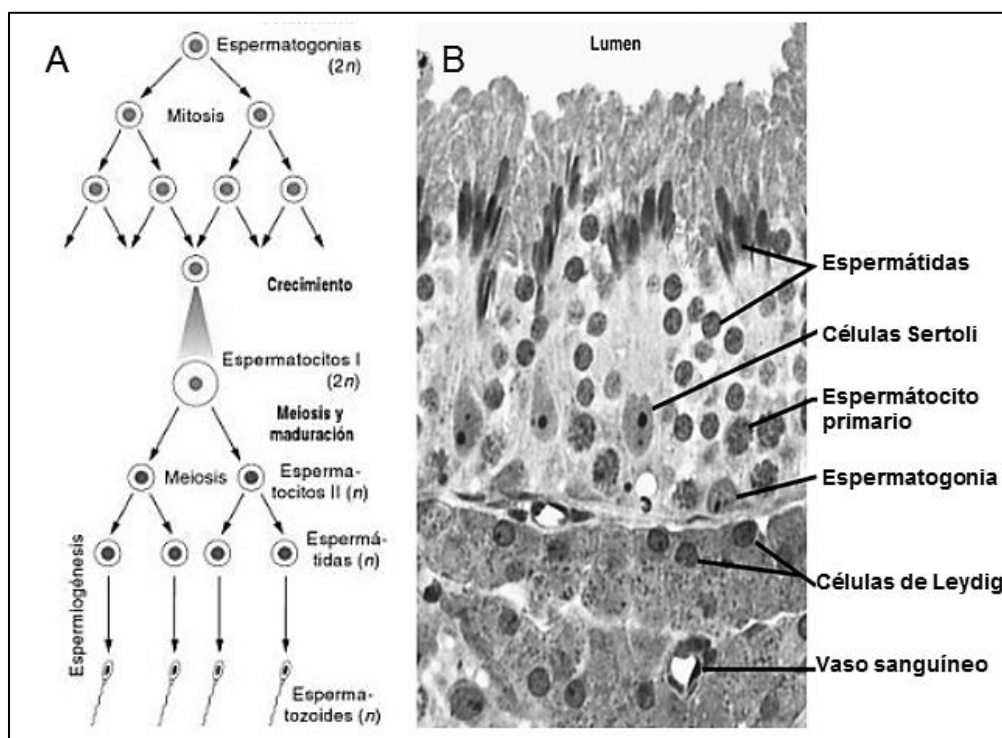


Figura 1. Representación esquemática del ciclo de la espermatogénesis, que representa la formación de espermatozoides partiendo desde la espermatogonia, mitosis, fases de crecimiento, meiosis y maduración (A) (González *et al.*, 2008). Composición del parénquima testicular en verracos sexualmente maduros, se muestran los vasos sanguíneos, células de Leydig, Células Sertoli, células germinales en diferentes etapas de desarrollo, y el lumen tubular (B) (França *et al.*, 2005).

En los mamíferos, la espermatogénesis se puede dividir en ciclos, dependiendo de la especie, por ejemplo en carnero el número de ciclos es de 4.68 ciclos, en el caso del toro el número alcanza 4.5 ciclos y 4 ciclos en el ratón, que resulta ser el mismo número de ciclos que presenta el verraco (Swierstra, 1968). Los ciclos se dividen en etapas en base al desarrollo del acrosoma de la espermátida, es posible diferenciar las etapas mediante el análisis de la morfología tubular de los túbulos seminíferos, donde se han diferenciado 8 etapas para la mayoría de los mamíferos, exceptuando algunos primates que no presentan esta separación, en verraco este proceso tiene una duración de 32 – 35 días aproximadamente (Swierstra, 1968; França y Cardoso, 1998). Luego de la

espermatogénesis, el espermatozoide se encuentra en un estado de inmadurez, por lo que requiere una serie de diferenciaciones que son llevadas a cabo durante el tránsito a través del epidídimo, proceso que confiere al espermatozoide su capacidad fecundante (Pruneda *et al.*, 2005). Entre las funciones que desarrolla el epidídimo y que permite el proceso de maduración de los espermatozoide se encuentra la secreción y absorción de proteínas, endocitosis, acidificación de los fluidos presentes en el lumen, defensa inmune, fagocitosis y producción de antioxidantes (França *et al.*, 2005). La duración del proceso de maduración depende de factores como la especie y la frecuencia de eyaculación, distinguiendo periodos que pueden ir de 5 días en humano y en raton, 10-16 días en carnero y 9-12 días en verraco (Pruneda *et al.*, 2005; França *et al.*, 2005). La suma total del ciclo de espermatogénesis y maduración, tiene una duración de 40 a 45 días aproximadamente (França y Cardoso, 1998). Una vez concluido el proceso de maduración, el espermatozoide resultante presenta las características de una célula alargada de aproximadamente 43-45 μm de largo con dos regiones mayoritariamente distinguibles, la cabeza de 7 μm de largo y la cola, que se puede dividir en pieza media de 9 μm , pieza principal de 26,2 μm aproximadamente y pieza terminal de 2,2 μm (Figura 2). (Bonet *et al.*, 2013). La cola se encuentra separadas por un pequeño segmento de unión llamado pieza de conexión o cuello de 0,8 μm aproximadamente (Bonet *et al.*, 2013).

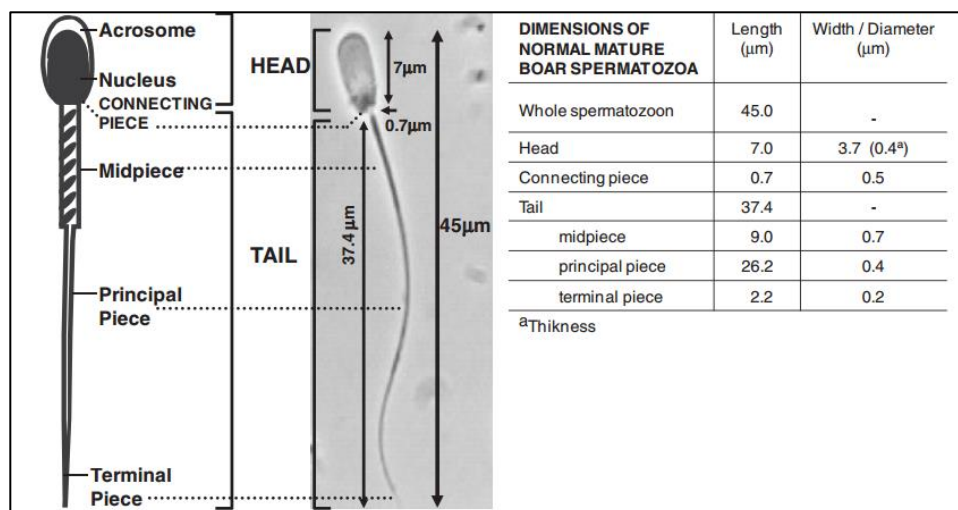


Figura 2. Representación esquemática de las partes principales de un espermatozoide de verraco y sus dimensiones típicas (Bonet *et al.*, 2013).

¿Existen anomalías durante la espermatogénesis que podrían afectar la fecundidad del semen? Ahora, si bien se podría esperar que la totalidad de los espermatozoides producidos durante la espermatogénesis y posterior proceso de maduración, presenten las condiciones óptimas para ser potencialmente fecundantes, esto no es así, de hecho en los procesos de espermatogénesis y maduración, pueden ocurrir ciertos fenómenos relaciones con características genéticas, frecuencia de eyaculación, edad, nutrición, temperatura, que generen espermatozoides con anomalías como: colas dobles o plegadas, acrosomas “arrugados”, gotas citoplasmáticas, mitocondrias hinchadas o mitocondrias extras, que le impidan poseer un nivel óptimo de fertilidad (Bonet *et al.*, 1993).

Una vez el espermatozoide alcanza su estado de madures, este se encuentra listo para ser eyaculado, en el caso del verraco, el fluido que es eyaculado consta de 3 fracciones: la primera fracción o fracción pre-espermática, no presenta espermatozoides y comúnmente es desechada; la segunda fracción o fracción espermática, es la que presenta casi la totalidad de los espermatozoides eyaculados, esta puede alcanzar un volumen de 70 a 100 ml y es la fracción que se utiliza en IA; y por último, tenemos la tercera fracción o fracción post-espermática, esta apenas contiene espermatozoides y no es utilizada en IA, su volumen puede ir de 150 a 200 ml (Bonet *et al.*, 2013). Una vez recogido el eyaculado es depositado y almacenado en un diluyente espermático adecuado a una temperatura de 15 a 20 °C durante varias horas, bajo tales condiciones, el espermatozoide adquiere una resistencia natural al choque térmico, que como ya se había mencionado en los apartados anteriores, es uno de los problemas aun no solucionados en la IA porcina (Watson, 1995; Gadea, 2003). **¿Por qué el espermatozoide adquiere esta resistencia al choque de frío?** Se cree que esta resistencia es producto de cambios en la composición de la membrana y/o un aumento en la estabilidad de las proteínas integrales (Zeng y Terada, 2001).

Luego de ser diluido y/o almacenado el semen es utilizado en IA. El proceso de IA consiste en depositar el semen en el tracto reproductivo de la hembra, distinguiendo diferentes tipos de IA, según la profundidad y el lugar en que sea depositado el semen, de esta forma se pueden diferenciar, de menor a mayor profundidad, la inseminación artificial cervical (IAC), intrauterina (IAIU) y por último la intrauterina profunda (IAIUP) (Bonet *et al.*, 2013). Comúnmente es utilizada la IAC y desde este punto de partida se puede decir que una vez depositados los espermatozoides en el cérvix, estos fluyen hacia el lumen del cuerpo uterino donde son transportados a través de los cuernos uterinos hacia el oviducto, lugar donde ocurre la fertilización (First *et al.* 1968; Langendijk *et al.* 2005). Durante este viaje que realiza el espermatozoide partiendo desde el sistema reproductivo masculino, hasta el sistema reproductivo de la hembra, se encuentra con una variedad de cambios en su medio extracelular, que incluyen variaciones en la concentración iónica extracelular y en la osmolaridad (Visconti *et al.*, 2002). Se ha descrito que estos cambios cumplen el rol de modular su estado funcional (Darszon *et al.*, 1999). Aunque no todas las especies desarrollan el proceso de fertilización en un sistema de reproducción interno, este es el caso de algunas especies marinas como los erizos y peces, que desovan para llevar a cabo este proceso, el cual se desarrolla en un ambiente externo, en este caso el mar, en el cual bajo tales condiciones el espermatozoide adquiere su capacidad de motilidad, esta característica es totalmente opuesta al espermatozoide de mamíferos, aves y reptiles, los cuales adquieren su capacidad de motilidad durante el proceso de maduración en el epidídimo (Darszon *et al.*, 1999). Ahora, para que el espermatozoide pueda fecundar, deben ocurrir una serie de cambios que le permitan desarrollar este proceso, estos cambios son llamados capacitación y reacción acrosómica (RA). La capacitación se desarrolla durante un proceso de “incubación” dentro del tracto reproductivo de la hembra, en el cual son retirados factores decapacitantes, principalmente proteínas unidas a la membrana durante el paso del espermatozoide por el epidídimo, una vez retirado estos factores la superficie del espermatozoide se encuentra accesible para que componentes del fluido luminal de la hembra retiren el colesterol, aumentando la fluidez, y generando una reorganización de la membrana (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2005). En el caso del ratón estas alteraciones implican una entrada de Ca^{2+} y HCO_3^- , que activan a la adenilato ciclasa relacionada con la

regulación y aumento de AMPc (Hess *et al.*, 2005). Además, la entrada de HCO_3^- puede generar hiperpolarización de la membrana, situación dependiente de la presencia de K^+ y Na^+ en el medio externo, y también, junto al Ca^{2+} contribuyen al aumento del pHi (Darszon, 2007). En los mamíferos, el aumento de calcio interno $[\text{Ca}^{2+}]_i$, AMPc, HCO_3^- , generado en respuesta a un aumento de la fluidez de la membrana, se asocia con el proceso de hiperactivación, el cual consiste en un aumento del movimiento de la cola o flagelo espermático y que resulta necesario para que el espermatozoide se libere de la mucosa vaginal y logre alcanzar la zona pelúcida (Vega-Hernández *et al.*, 2002). Esta misma respuesta es observada en hámster, cobayo, toro y verraco (Arenas-Ríos *et al.*, 2010). Cuando el espermatozoide interactúa con la zona pelúcida, se ha encontrado tanto en ratón como verraco, que el espermatozoide reconoce diversos factores como las proteínas ZP, específicamente ZP3, que actúa como inductor de la RA mediante un aumento $[\text{Ca}^{2+}]_i$, dependiente de la presencia de Ca^{2+} externo (Saling y Storey, 1979; Berger *et al.*, 1989). Esta dependencia de Ca^{2+} externo también es observada en erizo, que requiere de la presencia de Ca^{2+} en el agua de mar para poder concretar la RA y posterior fecundación del ovulo (Darszon *et al.*, 2006). **¿Qué mecanismo está involucrado en los movimientos de calcio en el espermatozoide?** Los movimientos de calcio son mediados por canales iónicos, proteínas de membrana que catalizan el movimiento de iones a través bicapa lipídica (Darszon *et al.*, 2006). Se pueden distinguir dos clases generales de canales de calcio: los canales de entrada, y canales de liberación de calcio. La primera clase se puede subdividir en tres categorías: Los canales de calcio dependientes de voltaje (CaV), que se abren por la despolarización de la membrana; los canales de calcio operados por receptores que se activan por medio de mensajeros químicos (por ejemplo, glutamato), y los canales de entrada de calcio capacitivos, que se abren por el agotamiento de las reservas de calcio intracelular (Benoff *et al.*, 2007). La segunda categoría incluye: los receptores de rianodina, y los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) (Benoff *et al.*, 2007). Los CaV son los canales de iones primarios que modulan los procesos de hiperactivación y reacción del acrosoma (Benoff *et al.*, 2007). Se ha descrito en ratón y en humano, que los canales CatSper (Canal catiónico del espermatozoide) proporcionan la entrada de calcio en el flagelo del espermatozoides y por lo tanto inducen la hiperactivación de la motilidad

dependiente de Ca^{2+} (Lishko y Kirichok, 2010). Se han descrito 4 tipos de CatSpers (1, 2, 3, 4), siendo los CatSpers 1 y 2 los que se encuentran en el flagelo del espermatozoide, cuya ausencia ha sido asociada con infertilidad en el ratón y en el hombre (Darszon *et al.*, 2006; Lishko y Kirichok, 2010).

2.3 Alteraciones de la morfofisiología espermática y su impacto en IA

Como ya se mencionó en los apartados anteriores, algunos cambios fisiológicos y/o morfológicos podrían afectar el potencial fecundante del espermatozoide, muchos de estos cambios ocurren durante los procesos de recolección o almacenamiento del semen, así como también pueden ser causa de factores relacionados con el estado sanitario del verraco o debido a causas genéticas (Foote, 1978; Thibier y Guerin, 2000; Chenoweth, 2005). Una de las principales causas de alteraciones que sufre el semen porcino está dada por la susceptibilidad al frío, que se explica por la composición lipídica de su membrana plasmática, la cual se caracteriza por poseer una baja concentración de colesterol en comparación con otras especies como el humano, toro, potro y gallo, (Parks y Lynch, 1992; Bonet *et al.*, 2013). Esta baja concentración de colesterol provoca una menor cohesión en la membrana y, por lo tanto, un aumento de la permeabilidad de la misma bajo condiciones de choque térmico (Darin y White, 1977). Esto, sumado al alto contenido de proteínas presente en las membranas, aumentan la probabilidad de perturbaciones irreversibles resultantes de transiciones de fase termotrópicas y liotrópicas, separaciones de fases laterales y alteraciones entre la interacción lípido-proteína (Parks y Graham, 1992). Además, la alta concentración de lípidos de membrana poliinsaturados, vuelve susceptible al espermatozoide a sufrir daños oxidativos causados por la generación de ROS durante el procesamiento de la dosis seminal (Parks y Graham, 1992). Las alteraciones descritas anteriormente, que son sufridas por el espermatozoide porcino, pueden generar cambios en los patrones de motilidad, alteraciones en la cromatina, permeabilización y desestabilización de membranas, daño oxidativo causado por las ROS, pérdida de K^+ y Mg^{2+} y la ganancia de Ca^{2+} y Na^+ , que dan inicio a los procesos de capacitación y reacción

acrosómica (Simpson *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 2000b; García *et al.*, 2007; Bonet *et al.*, 2013). Para el caso de los mamíferos y en especial el verraco, los cambios de temperatura, principalmente relacionados a los procesos de congelación y descongelación del semen, tienden a generar un aumento en los niveles de ROS (Alvarez y Storey, 1992; O'Flaherty *et al.*, 1997; Mazur *et al.*, 2000; Großfeld *et al.*, 2008). Las ROS son agentes oxidantes altamente reactivos que pertenecen a la clase de los radicales libres, estos últimos son moléculas o fragmentos de moléculas que poseen un electrón desapareado lo que les confiere una alta reactividad química, se pueden encontrar con una carga positiva, negativa o neutra (Slater, 1984; Sikka, 1996). Las ROS, en el espermatozoide, a concentraciones bajas inducen los procesos de capacitación, hiperactivación, reacción acrosómica y la fusión entre el ovocito y el espermatozoide (Awda *et al.*, 2009). En un espermatozoide normal, la mitocondria es el mayor lugar de producción de ROS en el interior de la célula (Guthrie *et al.*, 2008). Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar adenosina trifosfato (ATP) (Rodríguez *et al.*, 2001). En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95 % de estas reacciones un total de 4 electrones de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas puede entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres (Rodríguez *et al.*, 2001). Incluso dentro de sistemas aerobios o parcialmente aerobios, la producción de especies reactivas de oxígeno es inevitable; los perjudiciales son el anión súper oxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Peña *et al.*, 2003). El espermatozoide y el plasma seminal, de forma natural presentan una serie de compuestos y enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, α -tocopherol, ácido ascórbico, glutatión, piruvato, taurina, hipotaurina y albumina, que tienen como función controlar los niveles de ROS, manteniéndolas a un nivel normal (De Lamirande *et al.*, 1997). Cuando fallan estas

defensas, se produce el fenómeno llamado estrés oxidativo, el cual es una condición asociada con el aumento de daño celular causado por el oxígeno y oxidantes derivados del oxígeno, comúnmente conocidos como (ROS), este daño se genera debido al aumento descontrolado de ROS, el cual supera la capacidad antioxidante del plasma seminal (Bansal y Bilaspuri, 2010). Las ROS se han implicado en más de un centenar de enfermedades que van desde la artritis y los trastornos del tejido conjuntivo a la carcinogénesis, envejecimiento, exposición a toxinas, lesiones físicas, infecciones, y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Sikka, 1996). Bajo concentraciones altas se ha demostrado que tiene efectos negativos sobre espermatozoides humanos, equinos y porcinos, entre los que se cuentan daños sobre el ADN, Inhibición de la fusión entre el ovocito y el espermatozoide, daños en las membranas plasmáticas, disminución de la motilidad, interferencia con la homeostasis del calcio mitocondrial y alteraciones en el ciclo de Krebs (Awda *et al.*, 2009; Peña *et al.*, 2009). En base a estos antecedentes surge la interrogante de si **¿Es posible retardar el efecto del estrés oxidativo dependiente de la temperatura en la membrana del espermatozoide?**

Algunas de las alteraciones anteriormente mencionadas se pueden ver reflejadas en la motilidad, viabilidad espermática y producción de ROS. Para los primeros dos casos, en los centros de inseminación artificial, se suelen realizar evaluaciones mediante el uso de técnicas clásicas de microscopía, estimando ambos parámetros en base a los resultados entregados por un observador capacitado, el problema con estas técnicas surge a causa del carácter subjetivo del método utilizado, el cual induce estimaciones erradas y que pueden no representar la realidad de la muestra (Vyt *et al.*, 2004; Vyt *et al.*, 2008). En el caso de las estimaciones de ROS no se suelen realizar en los centros de inseminación, principalmente debido al elevado costo de los equipos que son necesarios para desarrollar estos análisis. Si la subjetividad de los métodos de evaluación tradicionales es un factor que puede afectar los resultados de la IA **¿cómo puedo disminuir esta subjetividad y mejorar los resultados de las evaluaciones? ¿Qué tipos de análisis puedo realizar para complementar el trabajo realizado en los centros de IA)** Actualmente existen alternativas a los métodos utilizados tradicionalmente como los sistemas CASA.

El análisis seminal asistido por computador (CASA), que puede ser utilizado por centros de inseminación para disminuir el error en la evaluación de parámetros de motilidad y morfología, se refiere a un sistema automatizado que está constituido básicamente por una cámara de vídeo, una tarjeta capturadora de vídeo, un ordenador, un sistema óptico (microscopio) y el software que realiza el análisis en base a algoritmos (Mortimer, 2000; Amann y Katz, 2004). El CASA permite visualizar y digitalizar imágenes sucesivas de espermatozoides, procesar y analizar la información, y proveer información precisa y significativa de la cinemática de células individuales, y también un resumen estadístico de la población (Mortimer, 2000; Amann y Katz, 2004). Por lo que resulta ser una potente herramienta para adquirir datos con una alta velocidad y precisión (Ginsburg *et al.* 1988). El funcionamiento de esta herramienta, se puede describir brevemente de la siguiente forma. Primero, la imagen del microscópico de campo oscuro o con contraste de fase negativo es enviada desde la cámara y convertida en una imagen digital, en la imagen digital son reconocidas las cabezas en base a su brillo y al número de píxeles, una vez reconocidas las cabezas de los espermatozoides, son analizadas en base a la rotación de estas, este proceso se repite con cada imagen capturada, de esta forma es posible seguir el movimiento de la cabeza del espermatozoide, permitiendo el análisis en el patrón de sus movimientos (Mortimer, 2000). Si bien es cierto que el uso del sistema CASA es altamente útil, este no se encuentra libre de errores, las mediciones son influenciadas por una serie de factores como la temperatura, la cámara donde se depositan los espermatozoides, los umbrales de detección relaciones con la iluminación y el contraste, que permiten el rastreo adecuado de los espermatozoides, la frecuencia de adquisición de las imágenes que influyen en la reconstrucción de la trayectoria, la cual resulta ser dependiente de la especie, el equipamiento utilizado, las condiciones experimentales, el número de espermatozoides considerados en el análisis, la concentración de la muestra y el adecuado entrenamiento del personal que realiza los análisis (Verstegen *et al.*, 2002).

Los aspectos de la motilidad espermática analizada por el CASA (Tabla 4.) incluyen la velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), velocidad media de la trayectoria (VAP), amplitud de desplazamiento de la cabeza (ALH), la frecuencia de cruce de batido (BCF), la rectitud (STR) y la linealidad (LIN) (Mortimer *et al.*, 1997; Verstegen *et al.*, 2002).

Tabla 4. Terminología del sistema CASA: definición de las abreviaturas. Modificado de Verstegen *et al.*, (2002) y de Andrade, (2005).

Abreviatura	Unidades de medición	Definición
VCL	$\mu\text{m/s}$	La media de la velocidad del recorrido de los espermatozoides desde el punto actual al punto real siguiente seguido por una célula en micrómetros por segundo
VSL	$\mu\text{m/s}$	Velocidad del recorrido medido en línea recta desde el punto inicial al punto final.
VAP	$\mu\text{m/s}$	Velocidad del recorrido promedio realizado por el espermatozoide.
ALH	μm	Magnitud del desplazamiento lateral de la cabeza del espermatozoide con respecto a su trayectoria promedio.
BCF	Hz	Promedio de la frecuencia (en el tiempo) con la que la trayectoria curvilínea del espermatozoide cruza la trayectoria promedio.
STR	%	Estima la proximidad del recorrido del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VAP (%)
LIN	%	Estima la proximidad de la trayectoria real del espermatozoide a una línea recta, y es el resultado de dividir el valor de la VSL entre la VCL (%)

¿Qué importancia tienen los parámetros entregados por el sistema CASA en la fertilidad de los espermatozoides porcinos?

Existen algunas asociaciones que se realizan entre la calidad de estos parámetros, que indican que mientras mayor sea el nivel de VSL y LIN mayor es el número de la camada (Estienne *et al.*, 2007), los parámetros de VSL, VCL y VAP también pueden ser utilizados como indicadores de fertilidad mientras considerando que mientras mayor sea el nivel de VSL sobre VCL mayores probabilidades de fecundación tiene el espermatozoide, en el caso inverso los porcentajes de fertilización deberían ser menores (Fraser *et al.*, 2001). En el caso de BCF y ALH, se sabe que un nivel bajo de estos parámetros supone espermatozoides con una baja posibilidad de supervivencia y por ende baja capacidad de fertilización (Fraser *et al.*, 2001). Además, eyaculados que presenten una motilidad inferior al 60 % se han asociado con una menor tasa de fecundidad y en el tamaño de la camada, característica no observada cuando la motilidad se encuentra sobre este umbral (Estienne *et al.*, 2007; Broekhuijse *et al.*, 2011)

2.4 Uso de diluyente

Los diluyentes espermáticos son medios en los cuales se deposita el semen para permitir su preservación fuera del cuerpo durante un periodo de tiempo determinado (Root, 2006). Se distinguen 2 tipos de diluyentes, los de corto plazo, que permiten almacenar el semen durante un periodo de 3 días y los diluyentes de largo plazo, los que permiten almacenar el semen durante 5 días o más (Johnson *et al.*, 2000b). La función de un diluyente es amplificar el número de dosis obtenida por eyaculado, manteniendo la viabilidad de los espermatozoides (Vazquez *et al.*, 1998). El impacto que ha tenido el uso de diluyentes en la industria porcina es tal que más del 99% de las inseminaciones artificiales realizadas en porcino utilizan semen conservado en diluyentes (De Ambrogi *et al.*, 2006). Debido al extendido uso de los diluyentes en inseminación artificial se han generado diversas formulaciones de estos, que tienen la habilidad de proveer un ambiente metabólico y

protector adecuado (Johnson *et al.*, 1988). Por lo tanto se obtiene como conclusión que la fertilidad del material fecundante almacenado depende del diluyente, la calidad del semen y la concentración por dosis de éste (Waberski *et al.*, 1994). Cuando el semen es almacenado, el espermatozoide sufre diferentes cambios que son mediados por la composición del medio y que, en el fondo, apuntan a mantener el potencial fecundante durante un mayor periodo de tiempo. Entre estos cambios se destaca el nivel de acidez del medio que es generado mediante la adición de glucosa y la mantención de las muestras en un ambiente sin oxígeno, situación que permite aprovechar el bajo metabolismo glucolítico del espermatozoide para disminuir su motilidad y por ende su capacidad metabólica y uso de energía (Johnson *et al.*, 2000b; Gadea, 2003). Además, la adición de agentes quelantes como el EDTA, permiten capturar las iones de calcio y de esta forma retrasar los procesos de capacitación y reacción acrosómica. El uso de proteínas como BSA, permite compensar la pérdida de proteínas del fluido seminal causado por el efecto de la dilución, lo que confiere una mayor resistencia al choque térmico. La adición de antioxidantes, que ayuda a reducir el daño de las ROS generadas por el metabolismo espermático y el manejo de la muestra. La mantención de una presión osmótica entre 290 y 300 mOsm, mediada por la adición de sales inorgánicas como NaCl y KCl para evitar eventos de hipoosmóticos o hiperosmóticos, y que además, evitan la salida de K^+ desde la célula hacia el medio, impidiendo la pérdida de la motilidad. La adición de algunos agentes como HEPES, TRIS, MOPS, que actúan de tampón para mantener el pH entre 6,8 y 7,2. El uso de antibióticos como gentamicina, kanamicina para retrasar o disminuir la proliferación bacteriana (Johnson *et al.*, 2000b; Gadea, 2003). En la Tabla 5 se indican las concentraciones en g/L de los componentes que conforman los diluyentes más utilizados en inseminación porcina (Gadea, 2003).

Tabla 5. Composición (g/L) de los diluyentes espermáticos más utilizados en inseminación porcina (Gadea, 2003).

Componentes	IVT	Kiev	BTS	Zorlesco	MR-A	ZORPVA	Reading	Modena	Androhep
Glucosa	3	60	37	11,5	+	11,5	11,5	25	26
Citrado sódico	24,3	3,7	6	11,7	+	11,65	11,65	6,9	8
EDTA		3,7	1,25	2,3	+	2,35	2,35	2,25	2,4
Bicarbonato sódico	2,4	1,2	1,25	1,25	+	1,75	1,75	1	1,2
Cloruro potásico	0,4		0,75				0,75		
Acetilcisteína	0,05								
Hepes									9
BSA				5	+			3	2,5
TRIS				6,5		5,5	5,5	5,65	
Acido cítrico				4,1		4,1	4,1	2	
Cisteína				0,1	+	0,7	0,7	0,05	
Trehalosa							1		
PVA						1	1		
Acetato potasico					+				
MOPS					+				
Osmolaridad (mOsm)	290	380	330	240	290	275	300	282	309
pH		7,2	7,2		6,9			6,9	6,8

2.5 Estabilizadores espermáticos en la preservación del semen.

Como se ha mencionado anteriormente, las membranas del espermatozoide de verraco son altamente susceptibles a sufrir daños causados por diversos factores como el choque térmico y la peroxidación lipídica de sus membranas a causa del efecto de las ROS. La forma en que se ha tratado de superar estos inconvenientes consiste en el uso de diferentes sustancias llamadas “estabilizadores de membrana”. La estabilización de la membrana es la forma de protección más efectiva, siendo un factor clave para la preservación de espermatozoides a bajas temperaturas, (Bucak y Tekin, 2007). Azúcares, lípidos y proteínas son utilizados como estabilizadores de membrana y cada uno de ellos tiene una forma particular de ejercer su efecto sobre la membrana. Para el caso de los azúcares, estos ejercen su efecto protector mediante la interacción directa con las membranas. Esta interacción involucra la unión del hidrógeno del grupo hidroxilo de la azúcar con el grupo fosfato de los fosfolípidos de membrana. Mediante la sustitución del agua que rodea el grupo de la

cabeza del fosfolípido, las azúcares pueden prevenir el daño a la membrana causado por la deshidratación extrema. Además pueden bajar la temperatura de transición de los fosfolípidos mediante un incremento en la separación entre los grupos de la cabeza y una disminución en las interacciones de van der Waal's entre los grupos acilo. Generalmente los disacáridos son más efectivos que los monosacáridos (De Leeuw *et al.*, 1993). El mecanismo mediante el cual los lípidos ejercen su efecto protector sobre las membranas aún no es del todo claro, por lo que se han postulado varios mecanismos que podrían explicar dicha característica, entre estos se postula que una interacción débil entre los fosfolípidos y la membrana plasmática puede causar un reordenamiento de sus componentes. Esta idea se basa en la observación de que la protección ejercida por los lípidos se pierde luego de realizar un lavado (Röpke *et al.*, 2011). Otra hipótesis sugiere que ocurre un intercambio de colesterol y lípidos que alteran las propiedades físicas de la membrana volviéndola más o menos resistente a las bajas temperaturas (Röpke *et al.*, 2011). En el caso de los aminoácidos y proteínas el mecanismo mediante el cual se minimiza el daño en las membranas lipídicas es aún desconocido, pero se hipotetiza que estos interactúan directamente con los fosfolípidos de membrana, con lo cual se disminuye la pérdida estructural de la y la aposición de las dos bicapas lipídicas (Anchordoguy *et al.*, 1988).

Las diferencias entre especies observadas en la efectividad de los estabilizadores de membrana utilizados, podrían explicar en base a las características lipídicas de las membranas, ya que se distinguen diferencias entre las especies, principalmente dadas entre la cantidad de colesterol y el nivel de ácidos grasos insaturados, siendo catalogadas en especies sensibles al shock térmico (verraco, toro, carnero y potro), menos sensible (gato, perro) y resistente (Conejo, humano y el gallo) en base a la proporción de estos (Mocé *et al.*, 2010).

Tabla 6. Estabilizadores de membrana utilizados en la preservación del semen de diferentes especies.

Estabilizador	Modelos espermáticos positivos	Modelos espermáticos negativos	Problemas asociados	Referencia
Trehalosa	carnero, cabra, ratón, conejo, mullón europeo, perro, veiraco .	toro, potro, ciervo ibérico, gacela.	Altas concentraciones (200-400mM) generan RA y daño por alteraciones de osmolaridad.	(Aboagla y Terada, 2004; Bucak y Tekin, 2007; Gutiérrez-Pérez et al., 2009)
Sacarosa	toro, ratón, perro, veiraco			(De Leeuw et al., 1993; Szein et al., 2001; Flores et al., 2010; Gómez-Fernández et al., 2012)
Cisteína	trucha arcoiris, veiraco , toro, perro			(Cabría et al., 2001; Malo et al., 2010)
Lactosa	ratón, veiraco			(Szein et al., 2001; Gómez-Fernández et al., 2012)
Caseína	veiraco , toro, carnero, potro, cabra			(Pursel et al., 1973; Bergeron y Manjunath, 2010)
Globulina	toro, carnero	veiraco		(Pursel et al., 1973)
Lectina	toro, carnero	veiraco		(Trinneche et al., 1999, Barbas y Mascarenhas, 2009)
Betaína	potro, carnero, veiraco			(Trinneche et al., 1999; El-Shehaway et al., 2008, Barbas y Mascarenhas, 2009)
Prolina	potro, carnero, cabra, veiraco			(Pursel et al., 1973; De Leeuw et al., 1993; Ollero et al., 1996; Cabría et al., 2001)
BSA	trucha arcoiris, carnero, toro	veiraco	Su combinación con Yema de huevo puede alterar la fertilidad	(Pursel et al., 1973; De Leeuw et al., 1993; Cabría et al., 2001; Aboagla y Terada, 2004; Jodun et al., 2006)
Yema de huevo	trucha arcoiris, toro, carnero, cabra, salmón del atlántico	veiraco , trucha ártica, Aspíus	Su combinación con BSA puede alterar la fertilidad. En cabra se observó que puede producir RA.	(Pursel et al., 1973; Sanper y Morris, 1998; Ellis, 2005)
Leche	toro, carnero, perro, potro	veiraco		
Liposomas	toro, potro, veiraco		lípidos con cadenas acílicas de menos de 12 átomos de carbono son tóxicos para el espermatozoide. Resultado dependiente del lípido que se utilice y de la carga de este.	(He et al., 2001; Röpke et al., 2011; Pillot et al., 2012)

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Actualmente a nivel mundial la demanda de productos cárnicos porcinos ha ido en aumento, impulsado por el crecimiento de la población, el incremento en el nivel económico de los países en desarrollo, aumento de la urbanización y los cambios en el paradigma alimenticio de algunas de las grandes potencias mundiales como China. Este aumento en la demanda de productos cárnicos ha impulsado el desarrollo de mejoras en las técnicas reproductivas, procesos de alimentación y selección de machos reproductores.

Debido a las exigencias por mejoras que requieren los sistemas productivos, se vuelve necesario introducir nuevas metodologías de evaluación y selección, tanto de material seminal como de machos reproductores, estas mejoras están orientadas a complementar las metodologías de uso tradicional.

La evaluación de las características del material seminal, permitirían determinar la calidad de este y en base a esta evaluación, mejorar los procesos de recogida de las muestras y determinar la edad en la que es recomendable utilizar los verracos. Además, permitirán obtener parámetros funcionales importantes para futuros estudios que busquen mejorar los procesos de preservación del semen de verraco.

3.1 Hipótesis

Los parámetros de calidad espermática e índices de estrés oxidativo, se ven modificados al aumentar la edad del verraco y el tiempo de refrigeración de la dosis seminal.

3.2 Objetivo General

Estudiar el efecto del tiempo y la edad sobre espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C que son utilizados en IA, considerando los parámetros de viabilidad, motilidad, producción de especies reactivas de oxígeno y peroxidación lipídica.

3.3 Objetivos específicos

1. Estudiar la viabilidad y motilidad de espermatozoides porcinos mantenidos 16°C por 11 y 7 días respectivamente.
2. Determinar el nivel de ROS intracelular en espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C por 11 días.
3. Estudiar los niveles de peroxidación lipídica de la membrana de espermatozoides de verraco preservados a 16°C por 11 días.

4. MATERIALES Y METODOS

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de neurociencias y biología de péptidos, perteneciente al centro de biotecnología de la reproducción (CEBIOR), ubicado en Temuco. Para la realización de los experimentos se utilizó semen fresco de verraco obtenido de la Sociedad Agrícola y Ganadera Pehuen Ltda. Las muestras fueron extraídas por personal especializado, manteniendo el trato a los animales dentro de las normas de bioética establecidas por la Universidad de la Frontera.

4.1 Obtención de muestras y diseño experimental

El semen fue colectado mediante el método de la mano enguantada (glove hand technique) desde un verraco entrenado para subir en una montura. El extremo del pene es agarrado firmemente con la mano y el proceso de recogida se inicia con una presión firme hasta el final de la espiral del pene con la mano para que el pene no pueda girar. El semen fue recibido en un contenedor con diluyente espermático temperado a 38°C. La parte superior del contenedor se cubrió con gaza para filtrar la porción gel del semen (Maes *et al.*, 2011). El semen extraído fue diluido en MR-A® (Kubus S.A., Madrid, España) a una concentración de 30×10^6 /ml aproximadamente, luego fue depositado en botellas de semen porcino de 100 ml (MINITÜB GmbH, Tiefenbach, Alemania). Se dejó estabilizar a temperatura ambiente por 2 horas y luego se refrigeró a 16 °C hasta su uso.

4.2 Evaluación de la viabilidad

Para el análisis de evaluación microscópica se tomaron 10 µl de la suspensión espermática y se depositaron en un portaobjeto, luego se agregaron 10 µl de eosina (BDH Chemicals Ltda, poole, England) al 2%, mezclando y evitando dejar parte de la suspensión espermática sin tinción, finalmente se agregaron 20 µl de nigrosina (Merck KGaA,

Darmstadt, Alemania) al 4% expandiendo la mezcla sobre toda la superficie del portaobjeto, se dejó secar por 1 minuto y luego se observó en un microscopio invertido Olympus IX70 (Olympus America Inc., center valley, USA), se contó un total de 300 espermatozoides. Para el análisis de citometría se utilizó una concentración de 1×10^6 espermatozoides por ml. Los espermatozoides fueron incubados con SYBR-14 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) [CF: 10nM] por 10 minutos para luego ser incubados por 5 minutos con IP [CF: 12 μ M] a 37°C con 5 % de CO₂ en una incubadora water-jacketed US autoflow automatic CO₂ (NUAIRE, Plymouth, USA). El control positivo de viabilidad se realizó mediante la selección de espermatozoides utilizando swim up. El control positivo de muerte se realizó congelando los espermatozoides por 20 minutos a -20°C y descongelando por 5 minutos a 37°C. Las muestras fueron depositadas en tubos de fondo redondo de poliestireno (BD, Franklin Lakes, USA), se analizaron 10000 eventos con un citómetro BD FACSCanto II (BD, California, USA).

4.3 Análisis seminal asistido por computador (CASA)

La evaluación de la motilidad espermática se realizó con el software ISAS v1.2 acoplado a un microscopio trinocular UB203i con objetivo 10x PH- , cámara BASLER scA780-54fm y platina termo regulada (Proiser, Av. Catedrático Agustín Escardino, 46980 Paterna, España). Para el análisis se utilizaron las siguientes especificaciones: tamaño de partícula mínimo 10 μ m² y máximo 80 μ m², numero de imágenes por segundo 25, escala 10x PH-, VCL – VAP considerando como lentos 10 μ m/s, medios 25 μ m/s, rápidos 45 μ m/s, progresividad 45% de STR, 10 como número mínimo de imágenes para calcular ALH. Se capturó el movimiento de un total de 600 espermatozoides aproximadamente y fueron evaluadas las siguientes características: Total móviles, VSL, VCL, VAP, STR, LIN, ALH, BCF.

4.4 Medición de anión superóxido

Para la medición de anión súper oxido se utilizó una concentración de $3 \cdot 10^6$ espermatozoides por ml. Los espermatozoides se lavaron 2 veces con PBS 1x pH 7.4 (Life technologies corporation, Grand island, NY 14072, USA), a 1400 RPM en una centrifuga U32-R (Boeckel, Hamburg 20422, Germany) luego se incubaron durante 15 minutos con DHE y SYTOX Green (CF: 2 μ M y 0,05 μ M). Posterior a la incubación se realizó un lavado y los espermatozoides fueron resuspendidos en PBS 1x para su análisis en un citómetro BD FACSCanto II (BD, California, USA). Se contabilizaron 10000 eventos. El experimento fue analizado a través de la intensidad de fluorescencia en el eje PE. El control positivo de oxidación se realizó incubando los espermatozoides por 15 minutos a 37°C con un 5% CO₂ en peróxido de hidrogeno H₂O₂ (CF: 150 μ M) (SIGMA, 3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA). El control positivo de muerte se realizó congelando los espermatozoides por 20 minutos a -20°C y descongelando por 5 minutos a 37°C.

4.5 Evaluación de la peroxidación lipídica

Para el análisis de peroxidación se utilizó una concentración de $3 \cdot 10^6$ espermatozoides por ml. Los espermatozoides se lavaron 2 veces con PBS 1x pH 7.4 (Life technologies corporation, Grand island, NY 14072, USA), a 1400 RPM en una centrifuga U32-R (Boeckel, Hamburg 20422, Germany) luego se incubaron durante 30 minutos con la sonda BODIPY C11 (CF: 0,1 μ M), posterior a la incubación se realizó un lavado con PBS 1x, se resuspendieron los espermatozoides en PBS 1x y se agregó IP (CF: 12 μ M) incubando nuevamente por 5 minutos a 37°C con un 5% de CO₂. El control positivo de peroxidación se realizó incubando los espermatozoides por 30 minutos a 37°C con un 5% CO₂ en sulfato ferroso heptahidratado (CF: 80 μ M) (Winkler Ltda., Valle Grande, Lampa – Santiago, Chile). El control positivo de muerte se realizó congelando los espermatozoides por 20 minutos a -20°C y descongelando por 5 minutos a 37°C. Las muestras fueron depositadas en tubos de fondo redondo de poliestireno (BD, Franklin Lakes, USA), se analizaron 10000

eventos con un citómetro BD FACSCanto II (BD, California, USA). El experimento fue analizado a través de la intensidad de fluorescencia en el eje FITC.

4.6 Análisis estadístico

Los datos fueron obtenidos de al menos 3 experimentos distintos. Los resultados fueron expresados como promedio \pm ES (error estándar). Los análisis estadísticos fueron realizados con SPSS statistics 17.0.1 y graficados con Prism 5.0. Se utilizaron las pruebas estadísticas de la T de Student y la prueba de ANOVA de una vía con las pruebas de comparación múltiple de Tukey, Scheffe y contrastes de coeficientes, según correspondiera al resultado de homogeneidad de varianza. Se consideró que los grupos presentan diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ (P: 0,01- 0,05 significativa [*]; P: 0,001- 0,01 muy significativa [**]; $P < 0,001$ extremadamente significativa [***)

5. RESULTADOS

5.1 Objetivo 1. Estudiar la viabilidad y motilidad de espermatozoides porcinos mantenidos a 16°C por 11 y 7 días respectivamente.

Como primer objetivo se estudió la viabilidad y motilidad de espermatozoides de verraco mantenidos a 16 °C durante un periodo de 11 días para viabilidad espermática y 7 días para el caso de motilidad espermática.

5.1.1 Viabilidad espermática

Para el estudio de la viabilidad espermática se utilizaron 2 técnicas, una de evaluación microscópica y otra de evaluación a través de citometría de flujo. Se evaluó un total de 11 verracos. En la evaluación microscópica se utilizó la tinción de eosina-nigrosina. La eosina tiene la capacidad de penetrar en las células con membranas plasmáticas dañadas y marcarlas con un color rosado, permitiendo diferenciar las células vivas de las muertas. Esta tinción es utilizada en conjunto con nigrosina, la cual actúa como contraste, facilitando aún más la evaluación visual (Swanson y Bearden, 1951). La evaluación por citometría se realizó con el LIVE/DEAD Sperm Viability Kit (Figura 3). Este kit consta de dos fluoróforos que permiten diferenciar entre células con membrana plasmática intacta y/o membrana dañada. El primero de los fluoróforos es SYBR-14, el cual es una tinción de ADN nuclear permeable a la membrana plasmática. El otro fluoróforo es el IP, un fluoróforo de ADN nuclear impermeable a la membrana plasmática (Chalah y Brillard, 1998). Luego del proceso de estandarización de la técnica se obtuvieron los patrones de citograma presentados en la figura 4 mediante el uso del software Flowjo 10.0.6. En base al análisis de los Citogramas fue posible realizar la selección adecuada de la población espermática utilizando los parámetros de tamaño y complejidad interna (Figura 3A), esta selección permitió separar las poblaciones en 2 ejes de fluorescencia, el marcador de

muerte PE-A representado en el eje Y, y el de espermatozoides vivos representado como FITC-A en el eje X (Figura 3B). En esta misma imagen es posible evidenciar los 4 patrones que caracterizan al citograma de viabilidad mediante el uso de los cuadrantes. En el caso del cuadrante Q1 se encuentran los espermatozoides que presentan la membrana citoplasmática dañada, estos son considerados muertos; en el cuadrante Q2 se encuentran los espermatozoides que presentan ambas tinciones, estos se consideran muertos debido a que son marcados con IP; en el cuadrante Q3 se ubican los espermatozoides vivos; y por último en el cuadrante Q4 se encuentran los espermatozoides que no fueron marcados por ninguno de los 2 fluoróforos, estos no se consideran en el análisis. En la Figura 3C, se observa el patrón de citograma generado por el control positivo de espermatozoides vivos. En la figura 3D, se observa el patrón de citograma para el control positivo de muerte.

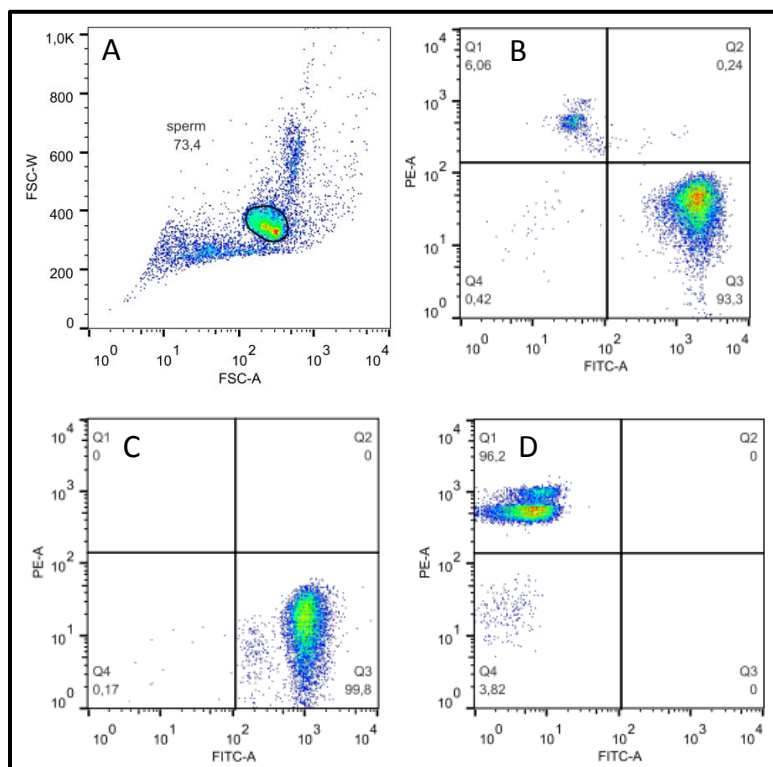


Figura 3. Citogramas de viabilidad de espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C. Selección de población espermática mediante gate (A), representación del análisis de una muestra espermática (B), Control positivo de espermatozoides vivos (C), Control positivo de espermatozoides muertos (D).

Las características visuales de las tinciones utilizadas para los análisis realizados mediante citometría y microscopía son representadas en la Figura 4. Para el caso de ambas técnicas es posible evidenciar la clara tendencia que representan (Figura 4A). Esta indica un claro descenso en la viabilidad, resultados que son analizados en las figuras 6 y 7. En el caso de las figuras 4B y 4C, que representan la tinción de eosina-nigrosina y de SYBR14-IP respectivamente, se pueden observar claramente las diferencias visuales entre ambas tinciones y la claridad con la que es posible diferenciar espermatozoides con membranas comprometidas de los espermatozoides sin daños en estas.

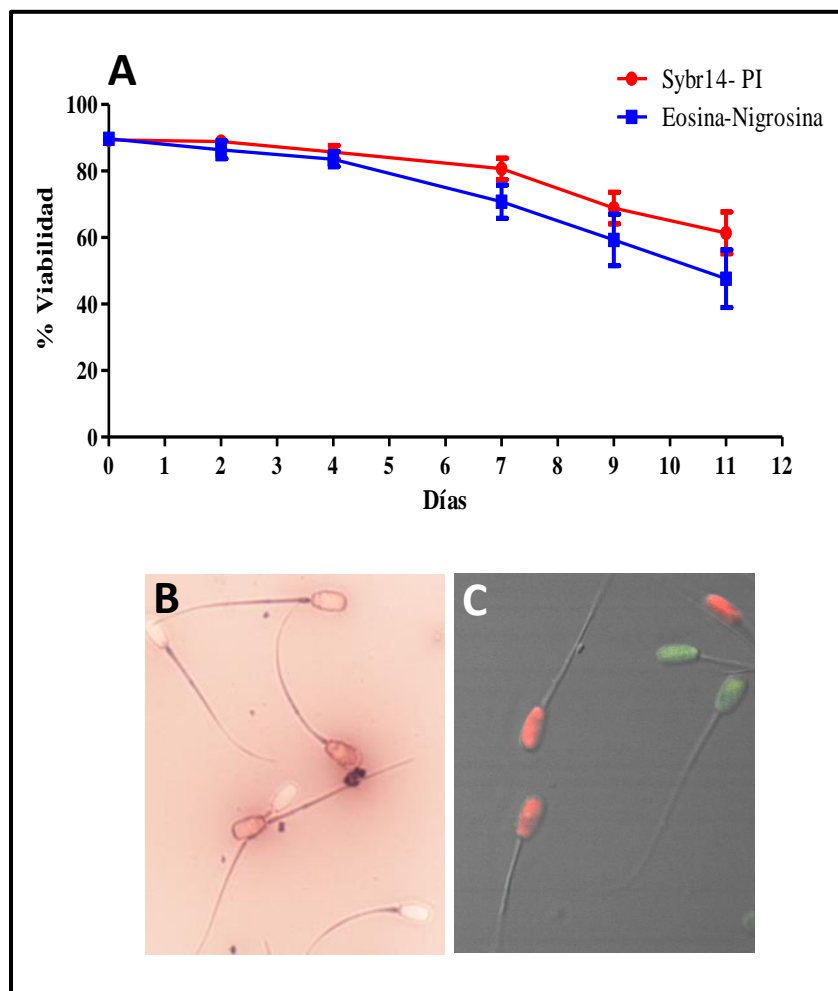


Figura 4. Tendencia en el porcentaje de la viabilidad espermática. Según técnicas con que se evaluó (A). Captura fotográfica de espermatozoides marcados con eosina-nigrosina (B) y SYBR-14 IP (C).

Los datos obtenidos mediante ambas técnicas fueron analizados en base a dos consideraciones, la primera de ellas consistió en un estudio de los datos enfocado en la edad de los verracos para lo cual se fijaron dos rangos etarios, el primero de estos comprendió la edad de 10 -16 meses, los verracos en este rango etario fueron considerados como “jóvenes”. El segundo rango etario, considerando los verracos como “maduros”, va desde los 17 a 28 meses. La segunda consideración utilizada para analizar los datos, fue el número de días que la muestra fue preservada a 16°C. Al realizar el análisis del porcentaje

de viabilidad espermática entre los rangos etarios, mediante citometría (Figura 5A) y microscopia (Figura 5B), se encontró que existía una diferencia significativa en la viabilidad el día 7, diferencia solo detectada mediante citometría. Esta diferencias indican que luego de mantener la dosis seminal a 16°C durante un periodo de 7 días, la viabilidad espermática de los verracos maduros es significativamente menor que la de los verracos jóvenes (Verracos jóvenes: $84,47 \pm 1,6$; Verracos maduros: $76,13 \pm 6,55$; P: $0,035 < 0,05$; n: 11; Figura 5A). El resto de los días no se detectaron diferencias entre los verracos jóvenes y maduros, lo cual indicaría que no hay mayores diferencias en la disminución de la viabilidad espermática entre los rangos etarios para el resto de los días. El hecho de que no se detectara la misma diferencia entre las dos metodologías utilizadas, es indicio de la baja sensibilidad que presenta la técnica de microscopia.

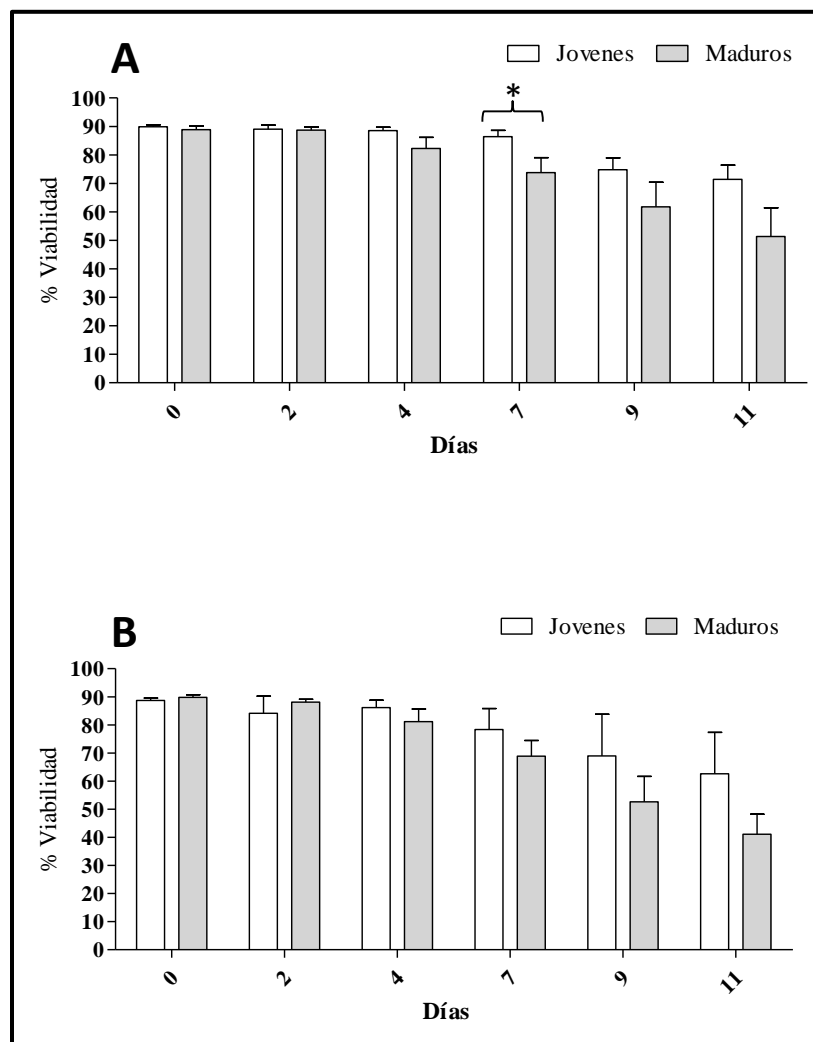


Figura 5. Porcentaje de viabilidad de espermatozoides de verracos entre 2 rangos etarios. Evaluación mediante citometría de flujo (A). Evaluación mediante eosina-nigrosina (B). Los valores representan el promedio \pm error estándar. (* $P < 0,05$).

Además de la comparación entre verracos jóvenes y maduros, se realizó el análisis de la viabilidad espermática en base a la cantidad de días que la muestra fue mantenida a 16°C (Figura 6). Este análisis se realizó para determinar que tantos días la muestra mantenía su viabilidad espermática, para esto se comparó el día 0 con el resto de los días. Según este análisis, realizado mediante ANOVA de un factor, fue posible encontrar diferencias significativas el día 9 y 11, tanto para la evaluación realizada mediante citometría (Día 0:

89,38± 0,69; Día 9: 68,87± 4,76 - P:0,003 < 0,01; Día 11: 61,39± 6,28 - P: 0,000 < 0,001; n: 11; Figura 6A), como para la técnica de microscopía clásica con eosina-nigrosina (Día 0: 89,38± 0,69; Día 9: 60,83± 8,60 - P:0,022 < 0,05; Día 11: 51,83± 8,60 - P: 0,001 < 0,01; n:9; Figura 6B). Estos resultados indican un descenso de la viabilidad espermática que es considerado significativo al día 9 y 11. Lo cual indicaría que los espermatozoides sufren un deterioro significativo en la membrana plasmática al noveno día de almacenamiento a 16°C.

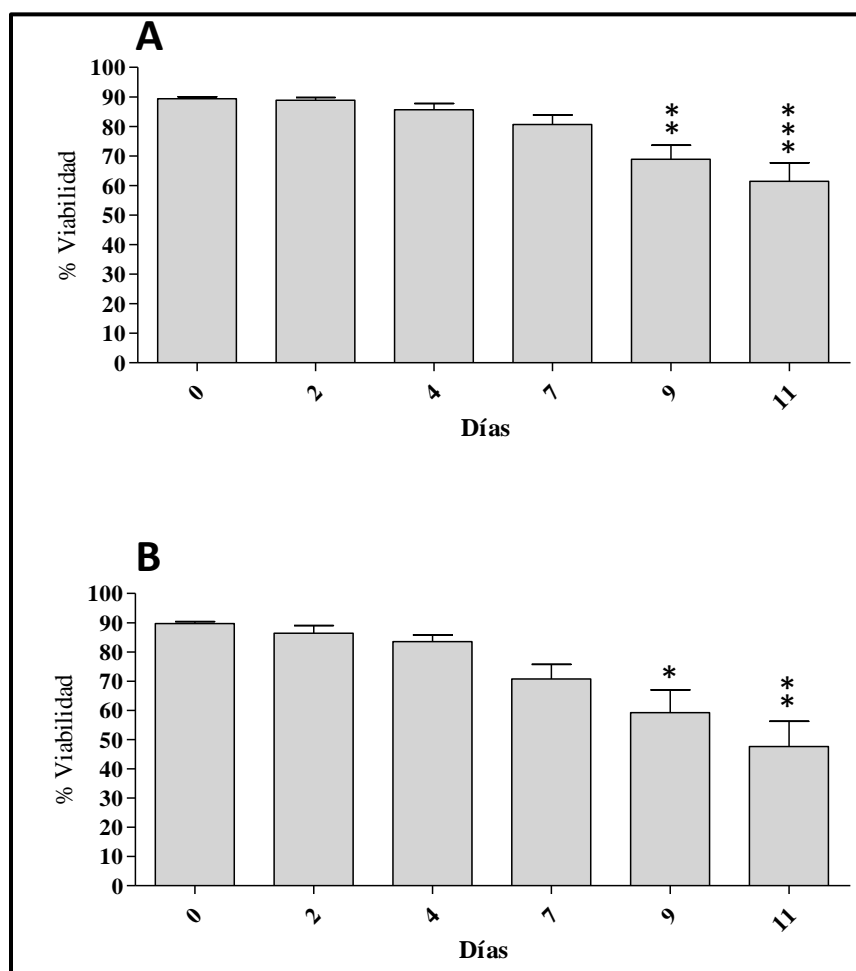


Figura 6. Porcentaje de viabilidad de espermatozoides de verracos mantenidos a 16°C durante 11 días. Evaluación mediante citometría de flujo (A). Evaluación mediante eosina-nigrosina (B). Los valores representan el promedio ± error estándar. (* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001).

5.1.2 Motilidad espermática

Para el análisis de la motilidad espermática se utilizó el sistema de análisis computacional CASA. Se analizaron un total de 10 verracos. El sistema CASA permite visualizar y digitalizar imágenes sucesivas de espermatozoides, procesar y analizar la información, y proveer información precisa y significativa del movimiento de células individuales. Estas características permiten realizar análisis precisos de la motilidad espermática y sus patrones asociados, disminuyendo la subjetividad y entregando una gran cantidad de información, que resulta útil para evaluar la calidad del semen. En este estudio se analizaron los resultados entregados por el sistema CASA mediante ANOVA de un factor, buscando diferencias en los patrones de motilidad entre verracos jóvenes y maduros, así como también durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (Figura 7). Los resultados de este estudio indican que existen diferencias en la motilidad entre verracos jóvenes y maduros, estas diferencias fueron detectadas el día 4 del análisis (Verracos jóvenes: $47,16 \pm 5,57$; Verracos maduros: $21,85 \pm 7,18$; $P: 0,002 < 0,01$; $n: 10$; Figura 7A). Esto sugiere que la motilidad espermática de los verracos maduros, al día 4 del análisis, es significativamente menor que la de los verracos jóvenes. Por otra parte, el análisis al porcentaje de motilidad durante los 7 días que la muestra fue mantenida a 16°C, indica que existen diferencias significativas en la motilidad al día 3 del análisis siendo aún más acentuadas el día 4 y 7 (Día 0: $66,58 \pm 4,05$; Día 3: $42,99 \pm 4,30$ - $P: 0,003 < 0,01$; Día 4: $33,35 \pm 4,89$ - $P: 0,000 < 0,001$; Día 7: $17,63 \pm 1,89$ - $P: 0,000 < 0,001$; $n: 10$; Figura 7B). Estos resultados sugieren que al día 3 del análisis ocurre un descenso significativo de la motilidad espermática, la cual se ve progresivamente reducida con el pasar de los días en que la muestra es mantenida a 16°C. Esta disminución de la motilidad se ve representada en la figura 8, en la cual se observa como aumenta la aglutinación espermática durante un periodo de 7 días, lo cual explicaría la pérdida de motilidad detectada por el CASA.

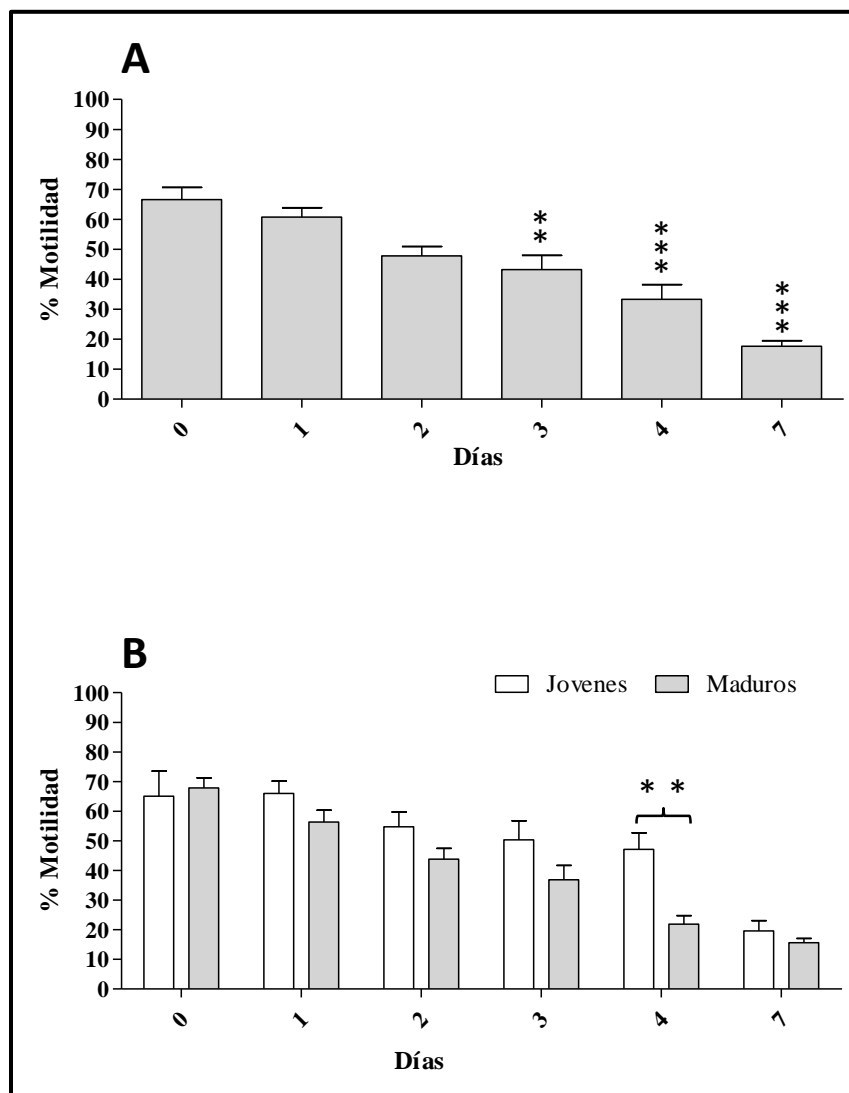


Figura 7. Porcentaje de motilidad espermática en verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B). Los valores representan el promedio \pm error estándar. ($P < 0,01$; *** $P < 0,001$).**

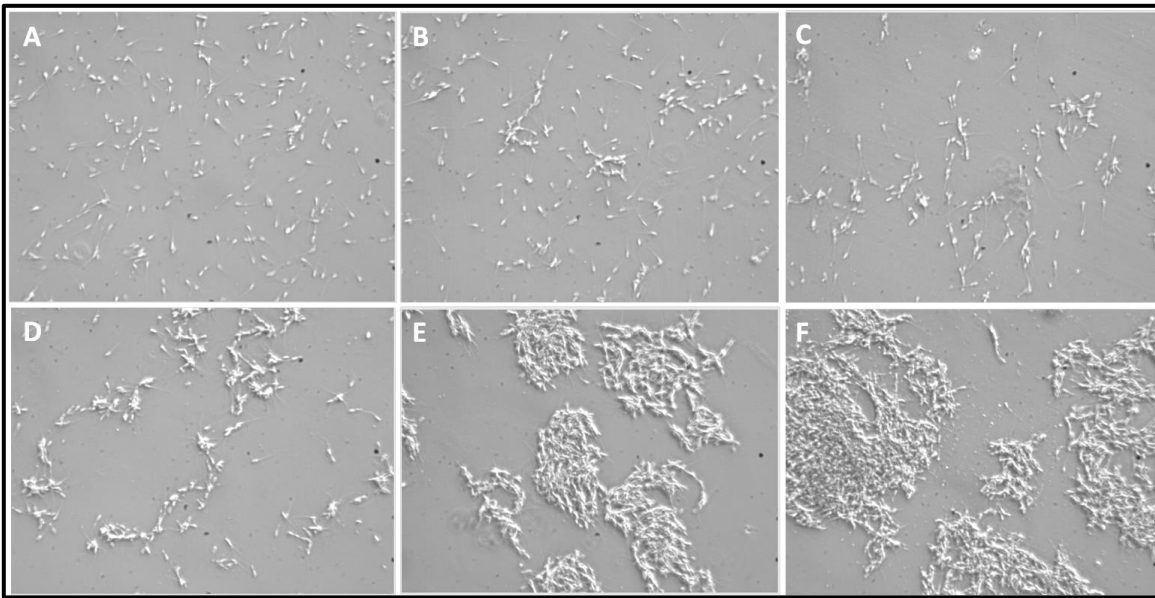


Figura 8. Progresión de la aglutinación espermática en una dosis seminal de verraco mantenida a 16°C durante 7 días. Las letras en orden alfabético indican los días de almacenamiento 0, 1, 2, 3,4 y 7.

5.1.3 Parámetros asociados al análisis de motilidad espermática

Los resultados de velocidad curvilínea (VCL) no presentaron diferencias (Figura 9), tanto para el análisis entre los rangos etarios, como para el análisis realizado en el tiempo en que la muestra fue mantenida a 16°C. Si bien es cierto, estos resultados no presentaron diferencias, es necesario observar los resultados de motilidad espermática (Figura 7 y 8) los que indican claramente un deterioro en el movimiento a causa de la aglutinación espermática y que podrían ser utilizados como indicador al momento de presentar los resultados de los parámetros asociados a la motilidad espermática.

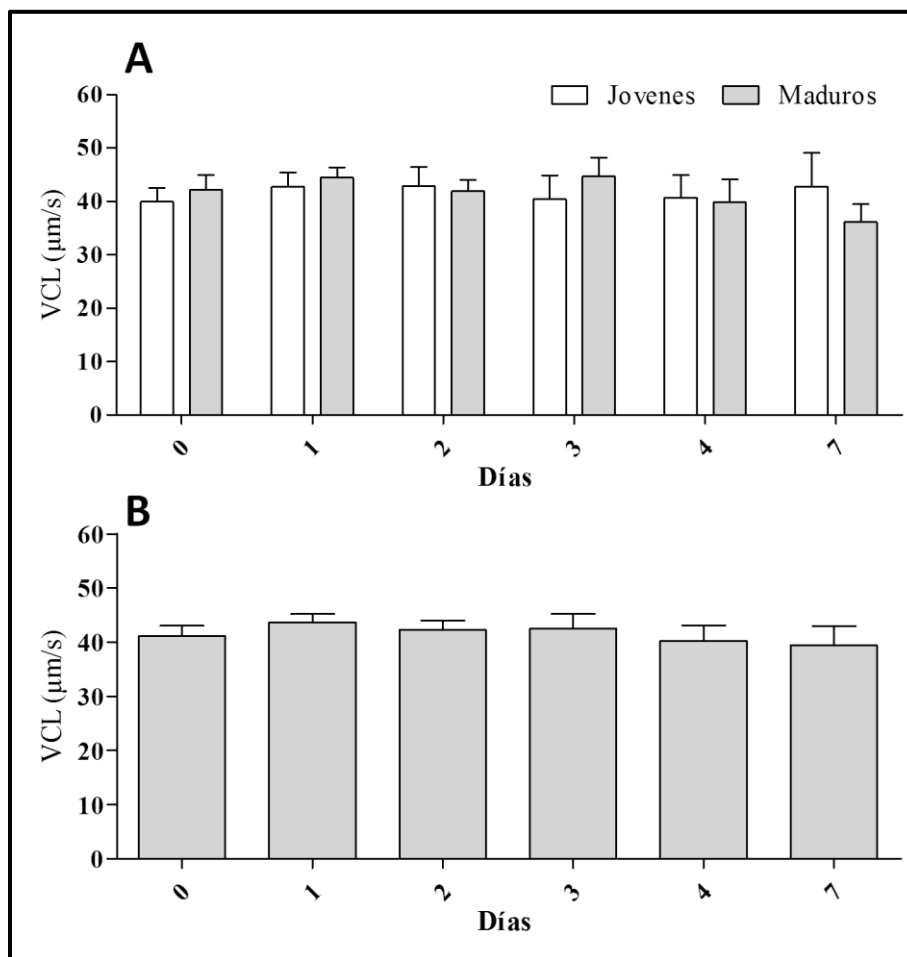


Figura 9. Velocidad curvilínea (VCL) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B).

Para el caso del análisis a la velocidad en línea recta (Figura 10), se obtuvieron diferencias significativas entre los rangos etarios, encontrando estas diferencias el día 4 del análisis (Verracos jóvenes: $17,16 \pm 1,71$; Verracos maduros: $12,08 \pm 0,91$; $P: 0,022 < 0,05$; $n: 10$; Figura 10A). Esto sugiere que el día 4 ocurre una disminución significativa en la velocidad en línea recta de los espermatozoides de verracos maduros. Los resultados obtenidos durante los 7 días de almacenamiento de la muestra seminal a 16° (Figura 10B), indican que hay un descenso significativo en la velocidad en línea recta el día 3 del análisis, disminución que es aún mayor en los días 4 y 7 (Día 0: $20,70 \pm 0,95$; Día 3: $15,67 \pm 1,23$ - $P: 0,012 < 0,05$; Día 4: $14,39 \pm 1,18$ - $P: 0,001 < 0,01$; Día 7: $11,47 \pm 0,50$ - $P: 0,000 < 0,001$;

n: 10; Figura 10B). La disminución en la VSL sigue la misma tendencia observada en el análisis de motilidad (Figura 7), lo que indica que la disminución de la motilidad implica una baja significativa en la VSL al día 3 del análisis.

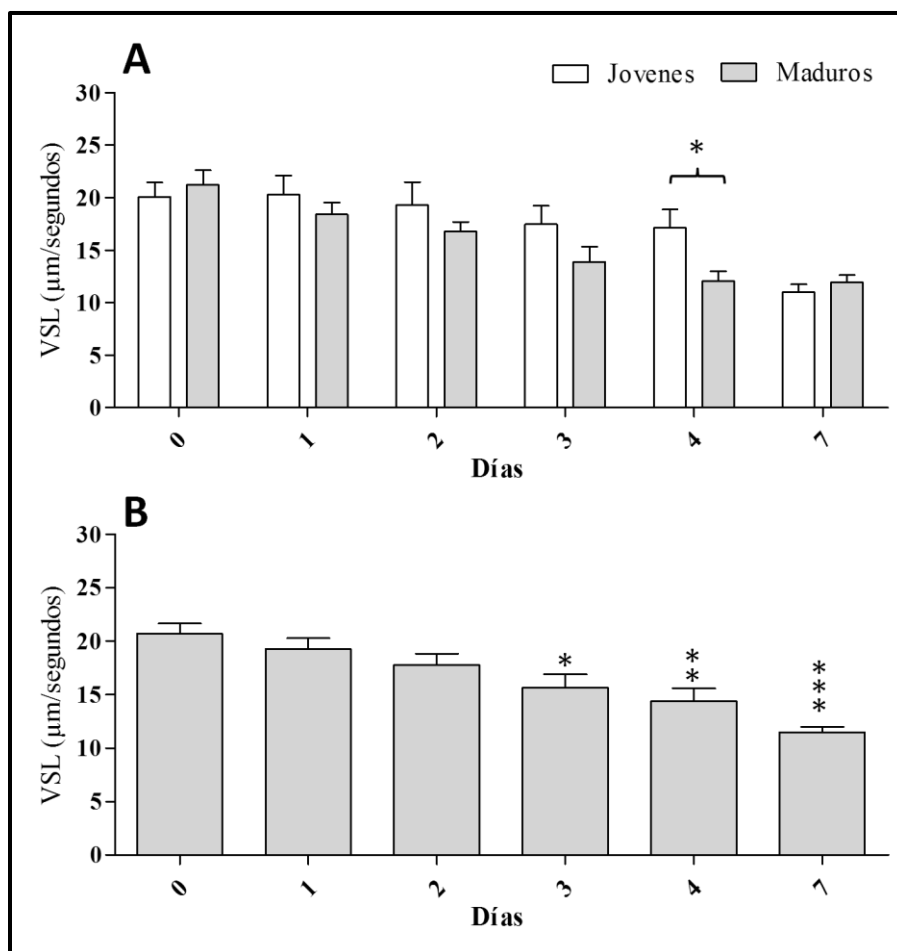


Figura 10. Velocidad en línea recta (VSL) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B). Los valores representan el promedio \pm error estándar. (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

El análisis de la Velocidad media de la trayectoria (VAP) entre verracos jóvenes y maduros no presento diferencias (Figura 11A), lo que sugiere que este parámetro no es afectado por la edad del verraco. Por otro lado, se detectaron diferencias significativas

durante el periodo en el que la muestra fue mantenida a 16°C, estas diferencias son apreciables el día 4 y 7 del análisis (Día 0: 28,68± 1,06; Día 4: 23,16± 1,24 - P: 0,011 < 0,05; Día 7: 21,69± 0,95 - P: 0,001 < 0,01; n: 10; Figura 11B). Este resultado indicaría que durante los días que la muestra es mantenida a 16°C ocurre una disminución en la VAP, esta disminución es significativa al día 4 del análisis y se vuelve aún más pronunciada al 7.

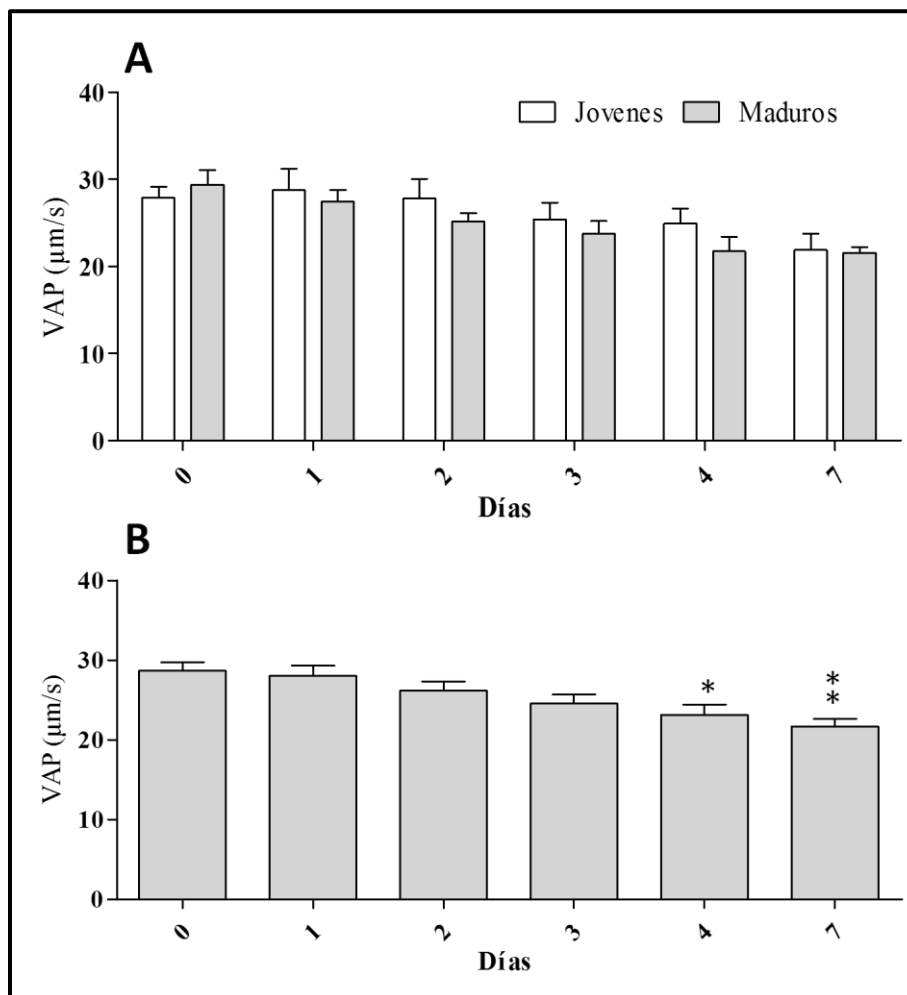


Figura 11. Velocidad promedio del recorrido (VAP) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B). Los valores representan el promedio ± error estándar. (* P<0,05; P<0,01).**

Los resultados del porcentaje de linealidad (LIN) entre verracos jóvenes y maduros no presentaron diferencias (Figura 12A), lo que sugiere que este parámetro no es afectado por la edad del verraco. Por otro lado, se detectaron diferencias significativas durante el periodo en el que la muestra fue mantenida a 16°C (Figura 12B), estas diferencias son detectadas el día 3 del análisis y aumenta significativamente hasta el día 7, lo cual sugiere que ocurre una disminución en el porcentaje de linealidad de la dosis seminal que es mantenida a 16°C durante los 7 días en que se realiza el análisis (Día 0: $51,15 \pm 2,87$; Día 3: $38,35 \pm 3,88$ - P: $0,047 < 0,05$; Día 4: $37,08 \pm 3,62$ - P: $0,017 < 0,05$; Día 7: $30,41 \pm 2,20$ - P: $0,000 < 0,01$; n: 10; Figura 12B).

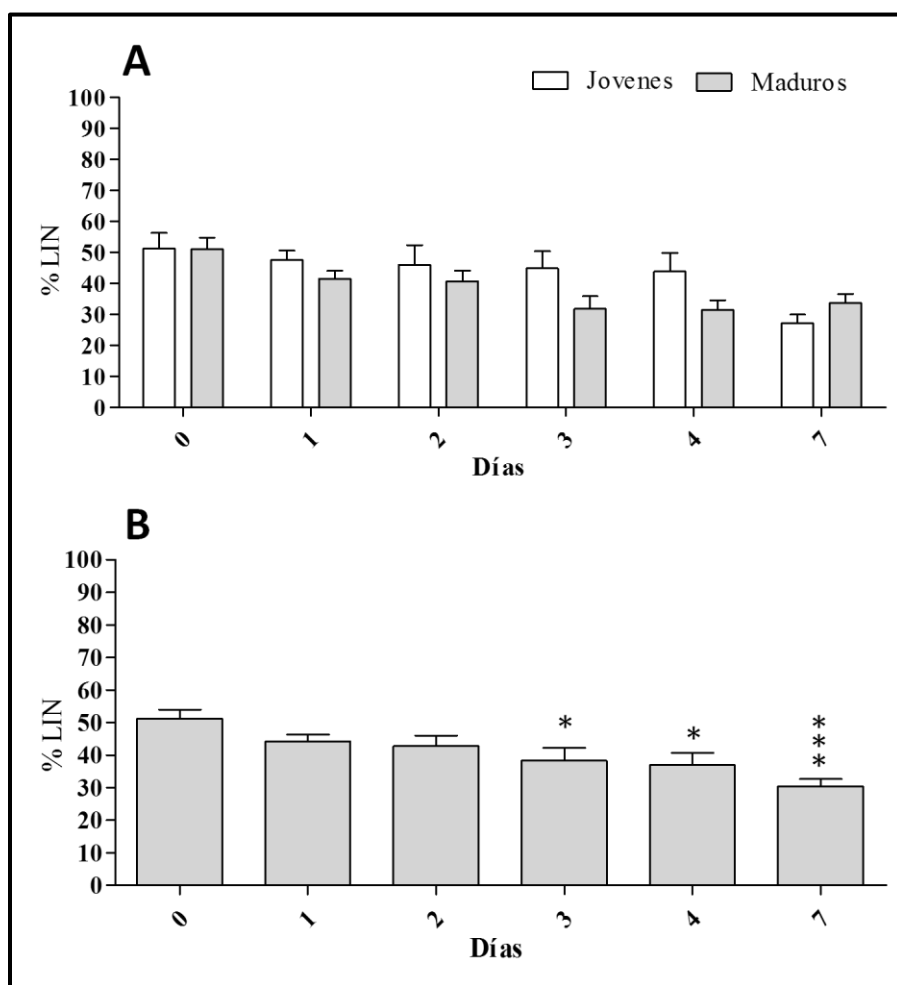


Figura 12. Porcentaje de linealidad (LIN) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B). Los valores representan el promedio \pm error estándar. (* P<0,05;*** P<0,001).

El análisis del índice de rectitud (STR) entre verracos jóvenes y maduros, indico que no existían diferencias entre los rangos etarios (Figura 13A), lo que sugiere que este parámetro no es afectado por la edad del verraco. Se detectaron diferencias significativas durante el periodo en el que la muestra fue mantenida a 16°C (Figura 13B), estas diferencias son detectadas el día 7 del análisis, lo cual sugiere que este parámetro se mantiene constante en las dosis seminales que son mantenidas a 16°C durante los primeros 5 días en que se realiza el análisis, y que disminuye hacia el día 7 del análisis (Día 0: 72,10± 1,70; Día 7: 53,8± 1,98 - P: 0,000 < 0,01; n: 10; Figura 13B).

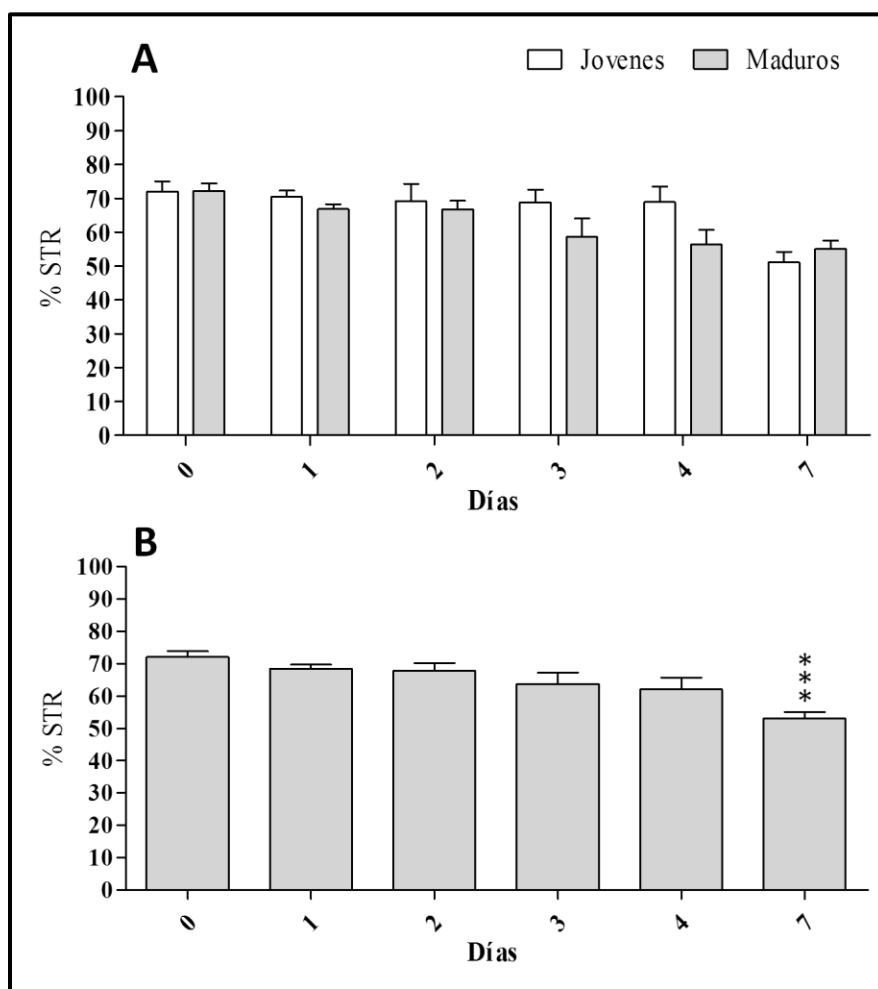


Figura 13. Índice de rectitud (STR) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B). Los valores representan el promedio ± error estándar. (***) P<0,001).

Para el análisis de la amplitud de desplazamiento de la cabeza (ALH) entre verracos jóvenes y maduros, no se detectaron diferencias entre los rangos etarios (Figura 14A), lo que sugiere que este parámetro no es afectado por la edad del verraco. Por otra parte, se detectaron diferencias significativas durante el periodo en el que la muestra fue mantenida a 16°C (Figura 14B), estas diferencias son detectadas el día 7 del análisis, lo cual sugiere que este parámetro se mantiene constante en las dosis seminales que son mantenidas a 16°C durante los primeros 5 días en que se realiza el análisis, y que sufre un aumento al día 7 (Día 0: $2,05 \pm 0,08$; Día 7: $2,6 \pm 0,14$ - P: $0,027 < 0,05$; n: 10; Figura 14B).

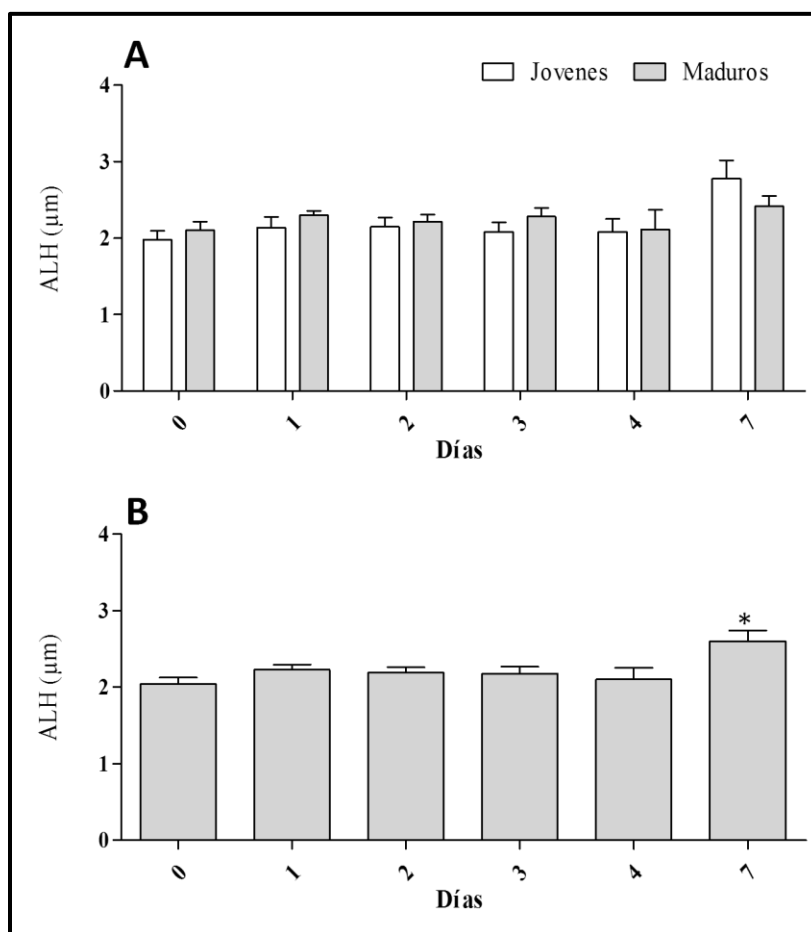


Figura 14. Amplitud de desplazamiento de la cabeza ALH en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B). Los valores representan el promedio \pm error estándar. (* P<0,05).

Los resultados de la frecuencia de cruce de batido (BCF) entre verracos jóvenes y maduros, no presento diferencias entre los rangos etarios (Figura 15A), lo que sugiere que este parámetro no es afectado por la edad del verraco. Por otra parte, se detectaron diferencias significativas durante el periodo en el que la muestra fue mantenida a 16°C (Figura 15B), estas diferencias son detectadas el día 7 del análisis, lo indica que este parámetro se mantiene constante en las dosis seminales que son mantenidas a 16°C durante los primeros 5 días en que se realiza el análisis, y disminuye al día 7 (Día 0: 6,63± 0,12; Día 7: 2,18± 0,16 - P: 0,000 < 0,001; n: 10; Figura 14B).

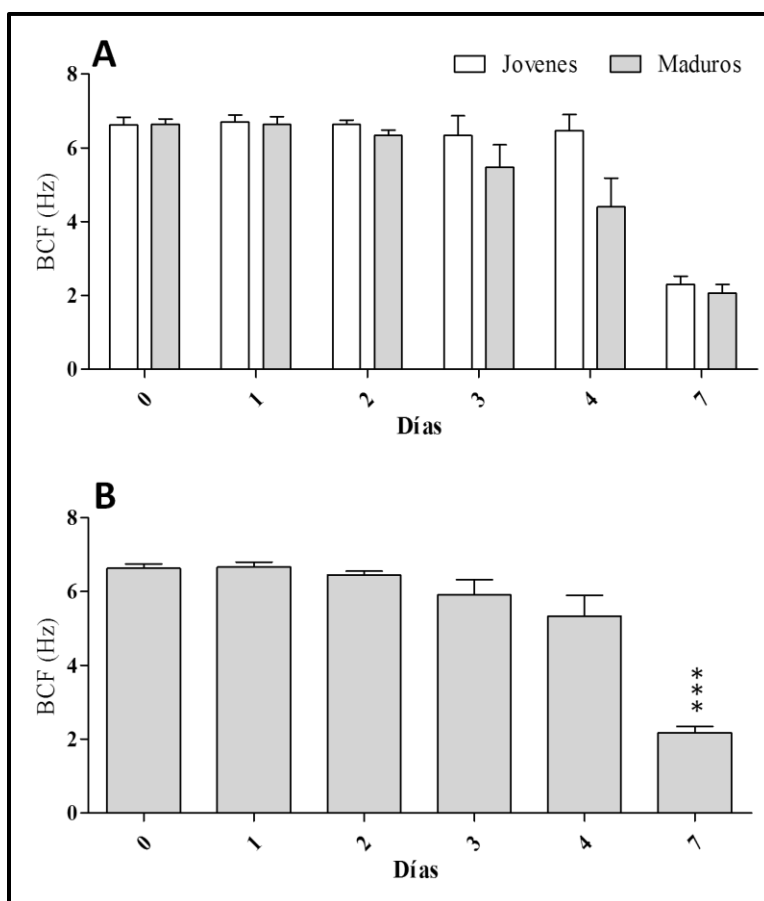


Figura 15. Frecuencia de cruce de batido (BCF) en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A) y durante el periodo en el que la muestra seminal fue mantenida a 16°C (B). Los valores representan el promedio ± error estándar. (***) P<0,001).

5.2 Objetivo 2: Determinar el nivel de ROS intracelular en espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C por 11 días.

El segundo objetivo fue determinar el nivel de anión superóxido en el tiempo de espermatozoides de verraco almacenados a 16°C durante un periodo de 11 días. El análisis se realizó a un total de 8 verracos. Para el análisis de la producción de anión superóxido, se utilizó el dihidroetidido (DHE), esta es una molécula que es producida por la reducción de dos electrones de etidio (Et^+), presenta un bajo nivel de fluorescencia en su estado reducido. Cuando el DHE es oxidado dentro de la célula, se genera un fluoróforo con afinidad por el ADN, Et^+ y $2OHEt^+$, que genera una fluorescencia nuclear de color rojo, la cual permite detectar y cuantificar la producción de anión superóxido. El DHE se utilizó para medir anión súper oxido en conjunto con un marcador de muerte llamado SYTOX Green (De Iuliis *et al.*, 2006). Este último es una molécula fluorescente, no permeable a la membrana plasmática y con alta afinidad por el ADN, que permite diferenciar las células con membrana celular comprometida de las células con membrana intacta (Gaforio *et al.*, 2002).

El primer paso para realizar el análisis de producción de anión superóxido fue la estandarización de la técnica de citometría utilizada. Esto se realizó empleando 2 fluoróforos con afinidad por el ADN, DHE y SYTOX Green, el primero utilizado como indicador de producción de anión superóxido y el segundo como marcador de espermatozoides muertos. Luego del proceso de estandarización de la técnica se obtuvieron los patrones de citograma presentados en la figura 16 mediante el uso del software Flowjo 10.0.6 (versión de prueba). En base al análisis de los Citogramas fue posible realizar la selección adecuada de la población espermática utilizando los parámetros de tamaño y complejidad interna (Figura 16A). Esta selección permitió separar las poblaciones en 2 ejes de fluorescencia, el marcador de anión superóxido indicado como PE-A representado en el eje Y, y el marcador de muerte representado como FITC-A en el eje X (Figura 16B). Para el análisis de producción de anión superóxido se utilizó solo la población viva mediante la

selección de esta con una gate rectangular (Figura 16B). Con los espermatozoides vivos seleccionados en la gate, se realizó el análisis de intensidad de fluorescencia del eje PE-A, que corresponde al eje en el cual se puede cuantificar la producción de anión superóxido (Figura 16C). En la Figura 16D se aprecia el perfil del citograma del control positivo de peroxidación obtenido mediante la incubación con H_2O_2 . Este perfil también es representado en la imagen 16C con una línea de color rojo, la que se diferencia de la línea celeste (muestra espermática sin H_2O_2 .) al presentar un mayor desplazamiento hacia la derecha, lo que indica una mayor intensidad de fluorescencia y por ende una mayor producción de anión superóxido. En la figura 17C es posible apreciar espermatozoides productores de ROS marcados con DHE, los cuales presentan una fluorescencia de color rojo. En la figura 17D se observan espermatozoides con membrana celular comprometida marcados con SYTOX Green, estos presentan una fluorescencia de color verde.

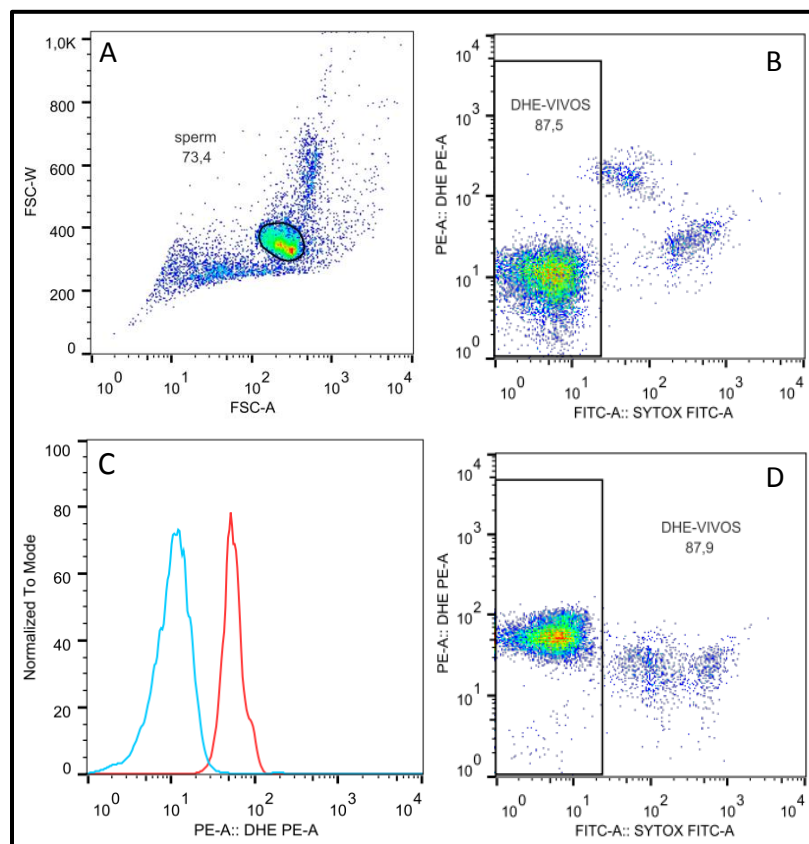


Figura 16. Citogramas de detección de anión superóxido en semen de verraco. Selección de población espermática mediante gate (A), representación del análisis de detección de anión superóxido en una muestra de semen de verraco (B), histograma de intensidad de fluorescencia (C) de la población viva de una muestra espermática (línea celeste) y de su control positivo (línea rojo), control positivo de producción de anión superóxido (D).

El análisis de producción de anión superóxido se realizó mediante la medición de la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides marcados con DHE. Los resultados de este análisis indican que no existen diferencias en la producción de anión superóxido entre los verracos jóvenes y maduros (Figura 17A). Por otra parte, el análisis de la producción de anión superóxido en las muestras espermáticas mantenidas a 16°C durante un periodo de 11 días, indica que existe un aumento significativo del anión superóxido el día 11 (Día 0: $6,45 \pm 1,17$; Día 9: $22,62 \pm 8,01$ - P: $0,046 < 0,05$; Día 11: $26,08 \pm 8,82$ - P: $0,017 < 0,05$; n: 8; Figura 17B).

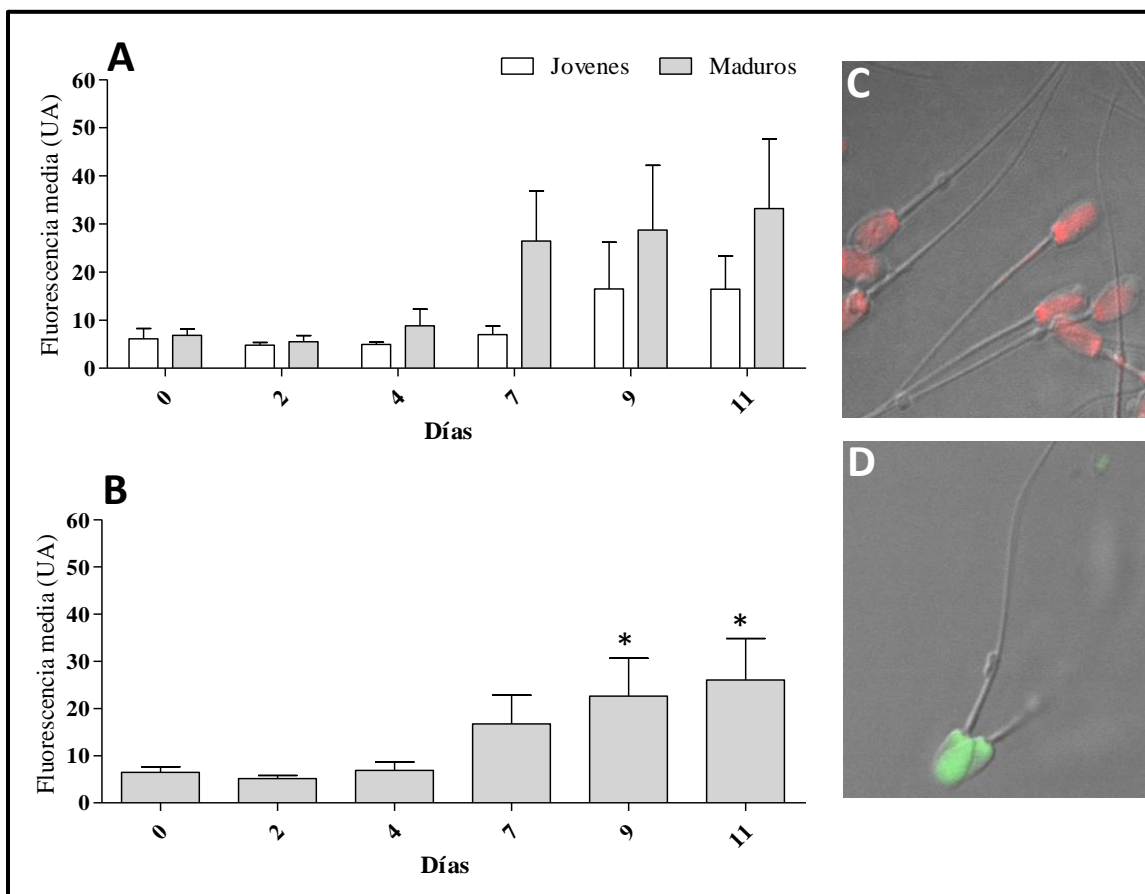


Figura 17. Producción de anión superóxido expresado en la unidad arbitraria de intensidad de fluorescencia media. Producción de anión superóxido en espermatozoides de verracos jóvenes y maduros (A), producción de anión superóxido en las dosis seminales mantenidas a 16°C durante 11 días (B). Captura fotográfica de espermatozoides productores de anión superóxido (C) y espermatozoides muertos (D).

5.3 Objetivo 3: Estudiar los niveles de peroxidación lipídica y su relación con la motilidad espermática.

La evaluación de la peroxidación lipídica se realizó mediante una doble tinción fluorescente con BODIPY C11 e IP. BODIPY C11 es un análogo fluorescente que imita las propiedades de los ácidos grasos, posee propiedades de fluorescencia en el rango rojo del espectro visible (Drummen et al, 2002). Esta sonda tiene la particularidad de cambiar su

espectro de fluorescencia desde rojo a verde cuando es oxidada, por lo cual permite diferenciar entre espermatozoides que presentan peroxidación lipídica y los que no presentan dicha característica. La sonda ha sido utilizada para evaluar la peroxidación lipídica en células vivas que incluyen espermatozoides bovinos, equinos y ovinos (Drummen et al, 2002). La adición de IP permite separar la población de espermatozoides muertos de los vivos, de esta forma solo se consideran los vivos en el análisis.

La evaluación de la producción de peroxidación lipídica se realizó mediante citometría de flujo utilizando 2 fluoróforos, el primero BODIPY C11 que marca la membrana plasmática y el IP que marca el ADN del núcleo, el primero es utilizado como indicador de peroxidación lipídica y el segundo como marcador de espermatozoides muertos. Luego del proceso de estandarización de la técnica se obtuvieron los patrones de citograma presentados en la figura 18 mediante el uso del software Flowjo 10.0.6 (versión de prueba). En base al análisis de los Citogramas fue posible realizar la selección adecuada de la población espermática utilizando los parámetros de tamaño y complejidad interna (Figura 18A). Esta selección permitió separar las poblaciones en 2 ejes de fluorescencia, el marcador de peroxidación lipídica indicado como FITC representado en el eje X, y el marcador de muerte representado como PE-A en el eje Y (Figura 18B). Para el análisis de peroxidación lipídica se utilizó solo la población viva mediante la selección del cuadrante Q4 (Figura 18B). En base a esta selección se realizó la cuantificación de peroxidación lipídica mediante intensidad de fluorescencia, representado por el histograma del eje FITC-A (Figura 18C). En el histograma es posible diferenciar las dos poblaciones analizadas, la primera (Celeste) indica el grado de peroxidación lipídica de una muestra espermática y la segunda (Rojo) indica la peroxidación lipídica del control positivo realizado con Fe^{2+} (Figura 18C). El movimiento de la población hacia la derecha, indica aumento en el grado de peroxidación. En la Figura 18D se puede observar el patrón de citograma del control positivo de peroxidación lipídica. En la figura 19B se observan espermatozoides que no presentan peroxidación lipídica. En la figura 19C se encuentran representados los espermatozoides que presentan peroxidación lipídica.

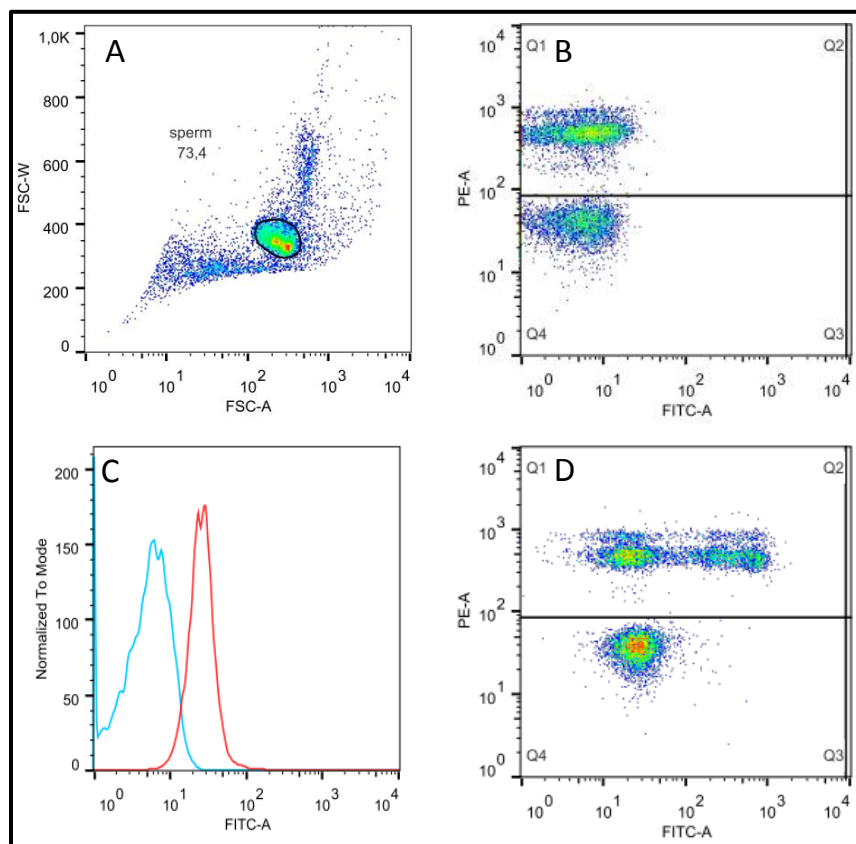


Figura 18. Citogramas de detección de peroxidación lipídica en semen de verraco. Selección de población espermática mediante gate (A), representación del análisis de detección de peroxidación lipídica en una muestra de semen de verraco (B), histograma de intensidad de fluorescencia de la población viva de una muestra espermática (celeste) y de su control positivo (rojo) para detección de peroxidación lipídica (C), control positivo de producción peroxidación lipídica (D).

El análisis de producción de la peroxidación lipídica se realizó mediante la medición de la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides marcados con BODIPY-C11. Los resultados de este análisis indican que las muestras espermáticas presentan peroxidación lipídica de forma significativa el día 11 del análisis, lo cual indica que durante los primeros 9 días no hay un aumento significativo en este parámetro (Día 0: $5,74 \pm 1,84$; Día 11: $14,47 \pm 2,03$ - P: $0,033 < 0,05$; n: 3; Figura 19A).

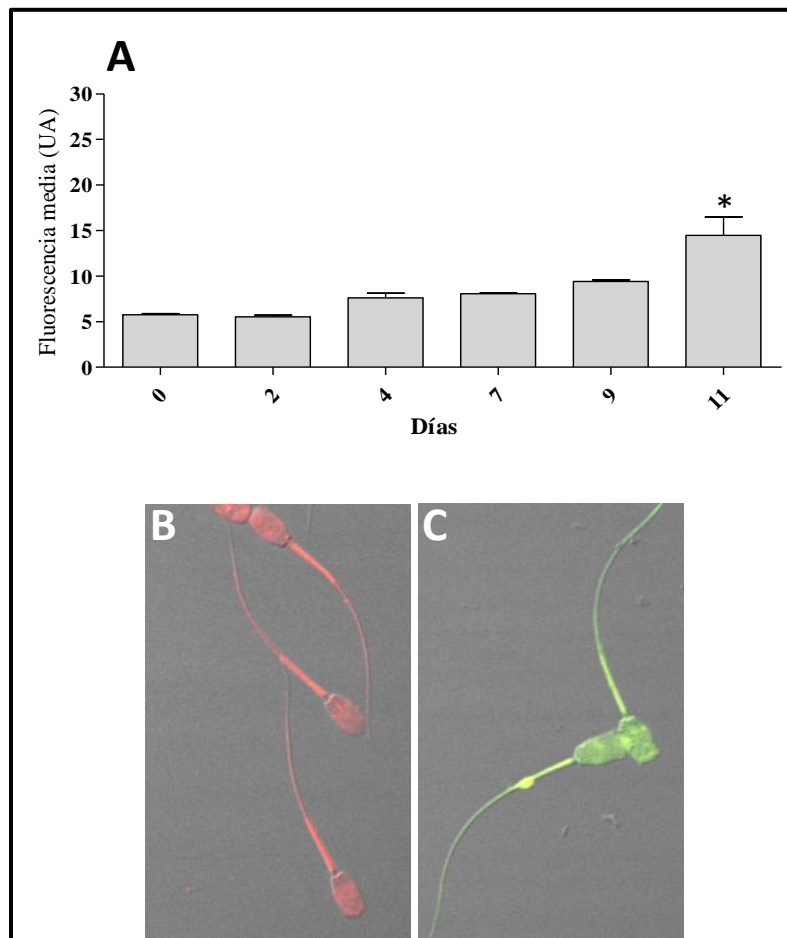


Figura 19. Peroxidación lipídica en espermatozoides de verraco expresada en la unidad arbitraria de intensidad de fluorescencia media. Peroxidación lipídica en las dosis seminales mantenidas a 16°C durante 11 días (B). Captura fotográfica de espermatozoides sin peroxidación lipídica (B) y con peroxidación lipídica (C).

6. DISCUSIÓN

6.1 Objetivo 1. Estudiar la viabilidad y motilidad en el tiempo de espermatozoides de verraco mantenidos a 16°C.

Tanto la integridad de la membrana plasmática, como la motilidad espermática, son parámetros útiles para determinar la calidad de la dosis seminal (Johnson *et al.*, 2000b). Aunque estos parámetros por si solos no son buenos indicadores, ya que según los resultados obtenidos por algunos estudios, no existe relación entre estos parámetros y el nivel de fertilidad del semen, en los cuales niveles elevados o bajos de viabilidad y motilidad no tienen relación alguna con la fertilidad del semen (Tardif *et al.*, 1999). Se estima que estos resultados están relacionados con la concentración de la dosis seminal, la cual a concentraciones elevadas enmascara el verdadero potencial fecundante del semen, quitando importancia a parámetros como la viabilidad y la motilidad espermática (Tardif *et al.*, 1999). Ahora, aunque estas técnicas presenten dicha complicación, no significa que sus resultados no sean válidos, ya que como se han demostrado diversos estudios, el espermatozoide de los mamíferos es altamente susceptible a sufrir daños por los procesos de recogida de la muestra, principalmente relacionados con los choques térmicos (Watson, 1995). Por lo tanto, las evaluaciones de viabilidad y motilidad espermática son un buen parámetro para determinar la calidad de las dosis seminales, ya que estas son susceptibles a sufrir alteraciones durante los procesos de recolección, refrigeración y/o congelación del semen.

6.1.1 Viabilidad espermática

Según los estudios realizados por Kennedy y Wilkins (1984), la viabilidad espermática tiende a decrecer con la edad del verraco, encontrado una menor viabilidad en los verracos que son mayores a 20 meses, en este mismo estudio se indica que la viabilidad espermática

es mayor a edades tempranas del verraco, específicamente sobre los 8 meses y bajo los 20. Los resultados de viabilidad obtenidos en el presente estudio siguen la misma tendencia que el estudio realizado por los autores anteriormente mencionados, pero esta tendencia solo se es apreciable el día 7 de este estudio, en los días anteriores y posteriores, no se encontraron diferencias entre los verracos jóvenes y maduros, lo cual sería indicativo de que no hay mayores diferencias en la viabilidad entre los rangos etarios comparados. Si se quisieran evidenciar mayores diferencias en la viabilidad espermática, quizás sería una buena opción emplear verracos de mayor edad, los cuales corresponderían a un rango etario considerado como “viejo” (Kennedy y Wilkins, 1984), para el caso de este estudio tal comparación no fue posible debido a que todos los verracos utilizados se encontraban dentro del rango etario de verracos jóvenes o maduros. Por otra parte, según diversos estudios (Vyt *et al.*, 2008), la viabilidad de los espermatozoides mantenidos bajo condiciones de refrigeración (15-20°C) en diluyentes comerciales, tienden a mantener un nivel de viabilidad alto, superior al 80%, durante al menos los primeros 7 días desde que el semen es extraído. Esta misma tendencia es observada en este estudio, lo que indicaría en primer lugar la elevada calidad del semen utilizado, y en segundo lugar la efectividad del diluyente para mantener la integridad de membrana. Sin duda alguna, mantener un nivel elevado de viabilidad espermática es una característica deseable en un diluyente espermático, pero no es la única característica de importancia. Como se mencionó anteriormente, la viabilidad por sí sola no es un buen predictor de la fertilidad del semen, es necesario evaluar parámetros de motilidad espermática, que en conjunto con la cuantificación de la viabilidad, permitan estimar de forma más certera la calidad del semen, ya que espermatozoides que no presenten movimiento, no necesariamente tendrán su membrana plasmática comprometida, por lo que se vuelve necesario estimar los parámetros de motilidad.

6.1.2 Motilidad espermática

Como se mencionó en el apartado anterior, es necesario complementar los análisis de viabilidad con el de motilidad, el que comúnmente se realiza a través de una estimación

visual realizara por microscopio, esta metodología es subjetiva lo que induce estimaciones erradas y que pueden no representar la realidad de la muestra, por lo cual en este trabajo se utilizó el sistema CASA para disminuir la subjetividad del análisis (Vyt *et al.*, 2004; Vyt *et al.*, 2008). En este estudio se evaluaron las características de la motilidad espermática de verracos jóvenes y maduros, además se evaluaron los cambios en la motilidad durante los días en que el semen fue mantenido a 16°C. Estas evaluaciones se realizaron en un periodo de tiempo de 7 días, el cual fue definido debido a que a este día la muestra presentaba una completa aglutinación. Según el análisis CASA para la comparación realizada entre los 2 rangos etarios fue posible detectar una disminución en la motilidad espermática de los verracos maduros el día 4 del análisis. La evaluación realizada durante los días que la muestra fue mantenida a 16°C presento diferencias el día 3 de la evaluación. Sin embargo, las diferencias detectadas tanto para la comparación entre rangos etarios como para comparación de días de almacenamiento de la muestra se encuentran fuera del rango aceptable de motilidad, el cual según Cerolini *et al.* (2001) tiene como límite de corte un 60 %, bajo este rango la capacidad fecundante de la dosis seminal se ve comprometida. Por lo tanto, la muestra espermática no debería ser utilizada más allá de 2 días luego de su extracción. Estos resultados en el porcentaje de motilidad son opuestos a los encontrados por Estienne *et al.* (2007), quien reporto que el porcentaje de motilidad espermática se mantenía sobre un 80% durante un periodo de 7 días de evaluación. El resto de los parámetros evaluados que son entregados por el programa CASA, entre los que se tienen VCL, VSL, VAP, LIN, STR, ALH, BCF han sido estudiados por diversos autores en busca de su asociación con la capacidad fecundante del semen, en los cuales algunos han logrado encontrar asociaciones entre estas características y el potencial fecundante del semen (Lavara *et al.*, 2005; Holt *et al.*, 2007), mientras que otros no detectaron asociación alguna (Didion, 2008). Según la evaluación realizada entre los rangos etarios, solo se detectaron diferencias significativas para la VSL, estas diferencias se presentaron el día 4 del análisis en el cual los verracos jóvenes presentaron un mayor índice de velocidad en línea recta en comparación con los verracos maduros. Para los resultados de las comparaciones entre los días de almacenamiento no se detectaron diferencias para la VCL, pero si se detectaron diferencias para el resto de los parámetros al comparar el día 0 con el resto de los días en

evaluación. Existen algunas asociaciones que se realizan entre la calidad de estos parámetros, que indican que mientras mayor sea el nivel de VSL y LIN mayor es el número de la camada (Estienne *et al.*, 2007), los parámetros de VSL, VCL y VAP también pueden ser utilizados como indicadores de fertilidad mientras mayor sea el nivel de VSL sobre VCL mayores probabilidades de fecundación tiene el espermatozoide, en el caso inverso los porcentajes de fertilización deberían ser menores (Fraser *et al.*, 2001). En el caso de BCF y ALH, se sabe que un nivel bajo de estos parámetros supone espermatozoides con una baja posibilidad de supervivencia y por ende baja capacidad de fertilización (Fraser *et al.*, 2001). En este estudio los parámetros de BCF y ALH se mantuvieron constantes hasta el día 4 del análisis, lo que indica que al día 7 su capacidad fecundante, basada en este parámetro, se ve significativamente alterada. Según los datos obtenidos en este estudio se podría esperar que los espermatozoides mantuvieran su capacidad fecundante por al menos los primeros días post extracción. Este estudio no pretende determinar la capacidad fecundante del semen almacenado, para esto se necesitarían realizar comparaciones entre los datos obtenidos mediante el análisis CASA y comparar los datos de preñes y partos obtenidos en los planteles porcinos. Además se requerirían de otras pruebas funcionales como pruebas hipoosmóticas (Pérez *et al.*, 2012), pruebas de penetración en la zona pelúcida (Ivanova y Mollova, 1993) o de penetración en ovocito de hámster libre de zona pelúcida (Trish y Horton, 1988). Como se mencionó anteriormente al comparar los resultados obtenidos por Estienne *et al.* (2007), esto en ningún caso indica que la calidad del semen sea mala, por lo menos hasta el segundo día del análisis, ya que las evaluaciones entre diversos centros experimentales podrían verse influenciadas por los procedimientos experimentales, vale decir: diferentes sistemas de montaje (covers, cámaras leja, cámaras bunker, etc.), cámaras de captura de imagen, software, sistema microscópico y configuraciones de corte de medición de los parámetros. **¿Qué explicaría que la viabilidad espermática se mantenga durante un mayor periodo de tiempo que la motilidad? ¿Podría tener esta disminución de motilidad alguna relación con el aumento de ROS y peroxidación lipídica?**

6.2 Objetivo 2: Determinar el nivel de anión superóxido en el tiempo de espermatozoides de verraco almacenados a 16°C.

El anión superóxido es una ROS, que tiene como principal origen la mitocondria (Guthrie *et al.*, 2008). El espermatozoide y el plasma seminal, de forma natural presentan una serie de compuestos y enzimas como superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y reductasa, α -tocopherol, ácido ascórbico, glutatión, piruvato, taurina, hipotaurina y albumina, que tienen como función controlar los niveles de ROS, manteniéndolas a un nivel normal (De Lamirande *et al.*, 1997). Bajo condiciones de normalidad en la producción ROS estas actúan como inductores de los procesos de capacitación y reacción acrosómica, por lo tanto niveles basales de ROS son necesarios para el correcto funcionamiento del espermatozoide (Awda *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando los sistemas de control de producción de ROS fallan, se generan los procesos de estrés oxidativo que tiene efectos deletéreos sobre el espermatozoide, como por ejemplo pérdida de la motilidad o daño sobre el ADN (Bansal y Bilaspuri, 2010). Bajo esta premisa se vuelve necesario determinar los niveles de anión superóxido presentes en los espermatozoides de verraco para determinar su calidad bajo este aspecto. Según los resultados obtenidos en este estudio, los niveles de anión superóxido entre verracos jóvenes y maduros no presentan diferencias, lo que indica que el aumento de anión superóxido entre los rangos etarios estudiados no difiere. La producción de ROS, parece ser un evento dependiente de la edad en humanos, mientras mayor sea el macho se debería esperar un mayor nivel de producción de ROS, esta característica tiene directa relación con una disminución en la fertilidad (Cocuzza *et al.*, 2008). Esta característica descrita por Cocuzza *et al* (2008), no fue apreciable en los resultados de este estudio, quizás la explicación a esto se deba a que los rangos etarios utilizados no presenten un deterioro en sus sistemas oxidativos o que la producción de ROS fue controlada por los antioxidantes propios del diluyente. Los resultados de la evaluación de anión superóxido durante el tiempo en que las muestras fueron mantenidas a 16°C indican que solo se produce un aumento el día 9 y 11. Por lo tanto, el resto de los días no presentan un aumento significativo en el nivel de anión superóxido. La explicación para este tardío aumento en los niveles de anión superóxido se

podrían deber, según lo que reportan Guthrie y Welch (2006) y Guthrie *et al* (2008), a que el espermatozoide de verraco almacenado en un diluyente comercial y mantenido a temperaturas de 15 °C a 17 °C, presenta una baja producción de anión superóxido, según postulan estos autores, esta característica se debe a que el sistema de defensa endógena de ROS en los espermatozoides de cerdo es muy eficiente, lo que a su vez explicaría las observaciones realizadas en este trabajo, tanto para la comparación entre rangos etarios como para el periodo de evaluación que se mantuvieron los espermatozoides refrigerados a 16°C. Si bien no se encontraron diferencias significativas entre verracos de diferente edad, si fue posible detectar diferencias durante los días en que la muestra fue mantenida a 16°C, estas diferencias podrían estar dadas por varios factores como la pérdida de efectividad del sistema antioxidante propio del espermatozoide, la pérdida de las propiedades del diluyente para poder mantener un estado metabólico y oxidativo adecuado, o inclusive la presencia de agentes contaminantes como bacterias y hongos (Althouse *et al.*, 2000). Para poder dilucidar a ciencia cierta estas causas, se requieren del uso de pruebas microbiológicas, metabólicas y enzimáticas, que no están consideradas en este trabajo. **¿Bajo qué condiciones se podría esperar un aumento en los niveles de anión superóxido?** Para el caso de los mamíferos y en especial el verraco, los cambios de temperatura, principalmente relacionados a los procesos de congelación y descongelación del semen, tienden a generar un aumento en los niveles de ROS, que como consecuencia dañan seriamente al espermatozoide, alterando inevitablemente su capacidad fecundante (Alvarez y Storey, 1992; O'Flaherty *et al.*, 1997; Mazur *et al.*, 2000; Großfeld *et al.*, 2008)

6.3 Objetivo 3: Estudiar los niveles de peroxidación lipídica y su relación con la motilidad espermática.

El aumento del ROS puede desencadenar una serie de efectos adversos sobre el espermatozoide, como por ejemplo la peroxidación de los lípidos de membrana (Großfeld *et al.*, 2008). El espermatozoide de verraco se caracteriza por ser extremadamente sensible a la peroxidación lipídica, principalmente debido a la gran cantidad de ácidos grasos

insaturados que forman los fosfolípidos de la membrana (Cerolini *et al.*, 2001). Las consecuencias de la peroxidación lipídica incluyen daño en la membrana, inhibición de la respiración celular y fuga de enzimas (Kumaresan *et al.*, 2008). Estas alteraciones podrían explicar el deterioro en la fertilidad y la motilidad espermática durante el almacenamiento del semen (Kumaresan *et al.*, 2008). En el presente estudio se determinó la peroxidación lipídica mediante el uso de la sonda BODIPY C11, considerando como unidad de medición la intensidad de fluorescencia media. En este estudio no fue posible realizar una comparación en el nivel de peroxidación lipídica entre rangos etarios, debido a que todos los verracos utilizados en este experimento presentaban la misma edad. Por lo tanto, solo se realizó la comparación durante los días que la muestra fue mantenida a 16°C, en este caso se detectó un nivel significativo de peroxidación lipídica el día 11. Estas diferencias concuerdan con los datos obtenidos en los ensayos de viabilidad y de detección de anión superóxido, en los cuales se detectan cambios considerables en estos parámetros el día 11. Las diferencias en los resultados de peroxidación lipídica pueden estar dados por diferencias en la composición lipídica entre verracos (Cerolini *et al.*, 2001), o pueden ser causa de contaminación bacteriana, que podrían actuar como promotoras de la producción de ROS y por consiguiente un aumento en la peroxidación lipídica (Fraczek *et al.*, 2008).

¿Existe alguna relación entre la motilidad espermática y la peroxidación lipídica? Está comprobado que un aumento en la peroxidación lipídica tiene efectos deletéreos sobre la motilidad del espermatozoide (Großfeld *et al.*, 2008; Kumaresan *et al.*, 2008). Para el caso de este estudio, los niveles de peroxidación lipídica presentan un aumento significativo el día 11, situación que llevaría a descartar la pérdida de motilidad debido a esta causa, ya que esta última se ve completamente reducida antes del día 7 de la evaluación. Esta pérdida de motilidad es atribuible a factores como contaminación y manejo de la muestra, antes que a daños causados por la peroxidación de los lípidos de membrana.

7. CONCLUSIONES

- La viabilidad espermática se mantiene hasta el día 9 de la evaluación. Solo se detectaron diferencias marginales entre rangos etarios.
- La producción de ROS intracelular aumento significativamente al día 9 de almacenamiento. No se detectaron diferencias entre los rangos etarios.
- La motilidad espermática disminuye significativamente al día 3 de la evaluación. Entre rangos etarios se detectaron diferencia al día 4 de la evaluación.
- La peroxidación lipídica en espermatozoides de verraco, solo presento un aumento significativo al día 11 del análisis.
- Los resultados de este trabajo pueden ser usados como guía para el futuro estudio e implementación de mejoras en los procesos reproductivos en la IA porcina, pero se vuelve necesario incluir otras pruebas que aborden aspectos funcionales.

8. LITERATURA CITADA

- Aboagla, E.M-E., Terada, T.** 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa, *Theriogenology* 62: 1160-1172.
- Alvarez, A., Storey, B.T.** 1992. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology* 13:232-41.
- Anchordoguy, T., Carpenter, J.F., Loomis, S.H., Crowe, J.H.** 1988. Mechanisms of interaction of amino acids with phospholipid bilayers during freezing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes* 946: 299-306.
- Arenas-Ríos, E., Cambrón- Ruiz, A., Ambriz-García, D., Zúñiga-Rubio P.J.P., Rodríguez-Tobón, A., Rosado-García, A.** 2010. Bases fisiológicas de la capacitación y de la reacción acrosomal del espermatozoide. *ContactoS* 78: 5-11.
- Bailey, J.L., Blodeau, J.F., Cormier, N.** 2000. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon Minireview. *Journal of Andrology* 21: 1-7.
- Barbas, J.P., Mascarenhas. R.D.** 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank* 10: 49-62.
- Benoff, S., Chu, C.C., Marmar, J.L., Sokol, R.Z., Goodwin, L.O., Hurley, I.R.** 2007. Voltage-dependent calcium channels in mammalian spermatozoa revisited. *Frontiers in Bioscience* 12:1420-49.
- Berger, T., Turner, K.O., Meizel, S., Hedrick, J.L.** 1989. Zona Pellucida-Induced Acrosome Reaction in Boar Sperm. *Biology of reproduction* 40: 525-530.
- Bergeron, A., Manjunath, P.** 2010. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development* 73: 1338-1344.
- Bonet, S., Briz, M., Fradera, A.** 1993. Ultrastructural abnormalities of boar spermatozoa. *Theriogenology* 40: 383-396.
- Bonet, S., Casas, I., Holt, W.V., Yeste, M.** 2013. *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer Berlin Heidelberg. 632p.
- Bouwman, A.F., Van der Hoek, K.W., Eickhout, B., Soenario, I.** 2005. Exploring changes in world ruminant production systems. *Agricultural Systems* 84: 121-153.

Bucak, M.N., Tekin, N. 2007. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research* 73: 103–108.

Cabrera, E., Anel, L., Herraéz, M.P. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theriogenology* 56: 623-635.

Chen, Y., Foote, R.H., Brockett, C.C. 1993. Effect of Sucrose, Trehalose, Hypotaurine, Taurine, and Blood Serum on Survival of Frozen Bull Sperm. *Cryobiology* 30: 423-431.

Chenoweth, P.J. 2005. Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64: 457-468.

Cocuzza, M., Athayde, K.S., Agarwal, A., Sharma, R., Pagani, R., Lucon, A.M., Srougi, M., Hallak, J. 2008. Age-Related Increase of Reactive Oxygen Species in Neat Semen in Healthy Fertile Men. *Urology* 71:490-494.

Dagoon, J.D. 1989. *Husbandry of Farm Animals and Poultry in the Tropics*. Rex book store. Filipinas. 337p.

Darin-Bennett, A., White, I.G. 1977. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* 14: 466-470.

Darszon, A. 2007. Canales, iones y cómo el espermatozoide interpreta los mensajes del óvulo. *Biotecnología* 14:29-42

Darszon, A., Acevedo, J.J., Galindo, B.E., Hernández-González, E.O., Nishigaki, T., Treviño, C.L., Wood, C., Beltrán, C. 2006. Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131: 977-988.

Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., Espinosa, F. 1999. Ion channels in sperm physiology. *Physiological reviews* 79: 481-510.

De Ambrogi, M., Ballester, J., Saravia, F., Caballero, I., Johannisson, A., Wallgren, M., Andersson, M., Rodriguez-Martinez, H. 2006. Effect of storage in short- and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *International Journal of Andrology*. *International Journal of Andrology* 29: 543-552.

De Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon, C. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction* 2: 48–54.

De Leeuw, F.E., De Leeuw, A.M., Den Daas, J.H.G., Colenbrander, B., Verkleij, A.J. 1993. Effects of Various Cryoprotective Agents and Membrane-Stabilizing Compounds on Bull Sperm Membrane Integrity after Cooling and Freezing. *Cryobiology* 30: 32-44.

De Rooij, D.G., Russell, L.D. 2000. All You Wanted to Know About Spermatogonia but Were Afraid to Ask. *Journal of Andrology* 21: 776-798.

Eilts, B.E. 2005. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. *Theriogenology* 64: 692-697.

El-Sheshtawy, R.I., El-Sisy, G.A., El-Nattat, W.S. 2008. Use of Selected Amino Acids to Improve Buffalo Bull Semen Cryopreservation. *Global Veterinaria* 2: 146-150.

First, N.L., Short, R.E., Peters, J.B., Stratman, F.W. 1968. Transport of boar spermatozoa in estrual and luteal sows. *Journal of animal science* 27:1032–1036.

Flores, J., Fernández, V., Huamán, H., Ruiz, L., Santiani, A. 2010. Refrigeración de semen canino utilizando glucosa, fructosa, trehalosa o sacarosa para prolongar la supervivencia espermática. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 21: 26-34.

Foote, R.H. 1978. Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallions. *Journal of animal science* 47: 1-11.

Foote, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of animal science* 80: 1-10.

França, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F.L. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63: 300–318.

França, L.R., Cardoso, F.M. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar, *Tissue and Cell*, Volume 30: 573-582.

Gadea, J. 2003. Review: semen extenders used in the artificial insemination of swine. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1: 17-27.

García-Herreros, M., Barón, F.J., Aparicio, I.M., Santos, A.J., García-Marín, L.J., Gil M.C. 2007. Morphometric changes in boar spermatozoa induced by cryopreservation. *International Journal of Andrology* 31: 490–498.

Garde, J.J., del Olmo, A., Soler, A.J., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E.R.S. 2008. Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Animal Reproduction Science* 108: 384-401.

Gillespie, J.R., Flanders, F.B. 2010. *Modern Livestock and Poultry Production*. Delmar, Cengage Learning. 8th edition. Canada. 1136p.

Gómez-Fernández, J., Gómez-Izquierdo, E., Tomás, C., Mocé, E., de Mercado, E. 2012. Effect of different monosaccharides and disaccharides on boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science* 133: 109-116.

- González López de Guereñu, F., Sánchez Ruiz, M., Solís Fraile, R.** 2008. Diversificación I, ámbito científico y tecnológico, ESO. Editex. España: 319 p.
- Govindasamy, K., Arumugam, K., Anubrata, D., Kamal, M.B., Venkatasamy, V., Shishom, V.N.** 2013. Artificial insemination of pigs reared under smallholder production system in northeastern India: success rate, genetic improvement, and monetary benefit. *Tropical animal health and production* 45: 679-686.
- Großfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W.M.C., Rath, D.** 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70: 1225-1233.
- Gutiérrez-Pérez, O., Juárez-Mosqueda, M.D.L., Uribe Carvajal, S., Trujillo Ortega, M.E.** 2009. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity, *Cryobiology* 58: 287-292.
- Hardy, M.P.** 2008. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, edited by C. Yan Cheng. Landes Bioscience and Springer Science Business Media. USA.
- He, L., Bailey, J.L., Buhr, M.M.** 2001. Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential. *Biology of Reproduction* 64: 69-79.
- Hess, K.C., Jones, B.H., Marquez, B., Chen, Y., Ord, T.S., Kamenetsky, M., Miyamoto, C., Zippin, J.H., Kopf, G.S., Suarez, S.S., Levin, L.R., Williams, C.J., Buck, J., Moss, S.B.** 2005. The “Soluble” Adenylyl Cyclase in Sperm Mediates Multiple Signaling Events Required for Fertilization. *Developmental Cell* 9: 249-259.
- Higgs, J.D.** 2000. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Trends in Food Science & Technology* 1: 85-95.
- Holt, W.V., O'Brien, J., Abaigar, T.** 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development* 19: 709-718.
- Jodun, W.A., King, K., Farrell, P.** 2006. Methanol and Egg Yolk as Cryoprotectants for Atlantic Salmon Spermatozoa. *North American Journal of Aquaculture* 69: 36-40.
- Johnson, L.A., Varner, D.D., Roberts, M.E., Smith, T.L., Keillor, G.E., Scrutchfield W.L.** 2000a. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* 60-61: 471-480.
- Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Grooten, H.J.G.** 1988. Artificial Insemination of Swine: Fecundity of Boar Semen Stored in Beltsville TS (BTS), Modified Modena (MM), or MR-A and Inseminated on One, Three and Four Days After Collection. *Reproduction in Domestic Animals* 23: 49-55.

Johnson, L.A., Aalbers, J.G., Willems, C.M.T., Sybesma, W. 1981. Use of boar spermatozoa for artificial insemination. I. Fertilizing capacity of fresh and frozen spermatozoa in sows on 36 farms. *Journal of Animal Science* 52: 1130-1136.

Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C. 2000b. Storage of boar semen. *Animal reproduction science* 62: 143-172.

Langendijk, P., Soede, N.M., Kemp, B. 2005. Uterine activity, sperm transport, and the role of boar stimuli around insemination in sows. *Theriogenology* 63: 500-513.

Lishko, P.V., Kirichok, Y. 2010. The role of Hv1 and CatSper channels in sperm activation *Journal of Physiology* 588: 4667-4672.

Maes, D., Nauwynck, H., Rijsselaere, T., Mateusen, B., Vyt, P., De Kruif, A., Van Soom, A. 2008. Diseases in swine transmitted by artificial insemination: An overview, *Theriogenology* 70: 1337-1345.

Malo, C., Gil, L., Gonzalez, N., Martínez, F., Cano, R., de Blas, I., Espinosa, E. 2010. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*), *Cryobiology* 61: 142-147.

Mazur P, Katkov I, Katkova N, Critser JK. 2000. The enhancement of the ability of mouse sperm to survive freezing and thawing by use of high concentrations of glycerol and the presence of an *Escherichia coli* membrane preparation (Oxyrase) to lower the oxygen concentration. *Cryobiology* 40: 187-209

McGlone, J.J. 2013. The Future of Pork Production in the World: Towards Sustainable, Welfare-Positive Systems. *Animals* 3: 401-415.

Milovanović, A., Barna, T., Maksimović, N., Vasiljević, T., Milanov, D., Bošković, N. 2012. Import of boars semen quality control and possibility of complaints. *Biotechnology in Animal Husbandry* 28: 759-769.

Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., Graham, J.K. 2010. Use of Cholesterol in Sperm Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reproduction in Domestic Animals* 45: 57-66.

O'Flaherty, C., Beconi, M., Beorlegui, N. 1997. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 29:269-75.

Okazaki, T., Shimada, M. 2012. New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Animal Science Journal* 83: 623-629.

Ollero, M., Muiño Blanco, T., López-Pérez, M.J., Cebria Pérez, J.A. 1996. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system effect of different cryoprotectants. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 680: 157-164.

Parks, J.E., Graham J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology* 38: 209-222.

Parks, J.E., Lynch, D.V. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 29: 255-266.

Pillet, E., Labbe, C., Batellier, F., Duchamp, G., Beaumal, V., Anton, M., Desherces, S., Schmitt, E., Magistrini, M. 2012. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology* 77: 268-279.

Pruneda, A., Pinart, E., Dolors Briz, M., Sancho, S., Garcia-Gil, N., Badia, E., Kádár, E., Bassols, J., Bussalleu, E., Yeste, M., Bone, S. 2005. Effects of a high semen-collection frequency on the quality of sperm from ejaculates and from six epididymal regions in boars. *Theriogenology* 63: 2219-2232.

Pursel, V.G., Johnson, L.A. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of animal science* 40: 99- 102.

Pursel, V.G., Johnson, L.A., Schulman, L.L. 1973. Effect of Dilution, Seminal Plasma and Incubation Period on Cold Shock Susceptibility of Boar Spermatozoa. *Journal of animal science* 37:528-531.

Riesenbeck, A. 2011. Review on International Trade with Boar Semen. *Reprod Dom Anim* 46: 1–3.

Rodriguez Martinez, H., Wallgren, M. 2010. Advances in boar semen cryopreservation. *Veterinary medicine international*. 2010: 52-63.

Rodríguez-Martínez, H., Saravia, F., Wallgrena, M., Tienthai, P., Johannisson, A., Vázquez, J.M., Martínez, E., Roca, J., Sanz, L., Calvete J.J. 2005. Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* 63:514–535.

Ronald, B.S.M., Jawahar, T.P., Gnanaraj, P.T., Sivakumar, T. 2013. Artificial insemination in swine in an organized farm – A pilot study, *Veterinary World* 6: 651-654.

Roosen-Runge, E.C. 1962. The process of spermatogenesis in mammals. *Biological Reviews* 37: 343-376.

Röpke, T., Oldenhof, H., Leiding, C., Sieme, H., Bollwein, H., Wolkers, W.F. 2011. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology* 76: 1465-1472.

Saling, P.M., Storey, B.T. 1979. Mouse gamete interactions during fertilization invitro: Chlortetracycline as a fluorescent probe for the mouse sperm acrosome reaction. *The journal of cell biology* 83: 544-555.

Samper, J.C., Morris, C.A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: A survey, *Theriogenology* 49: 895-903.

Sieme, H., Katila, T., Klug, E. 2004. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 61: 769-784.

Simpson, A. M., Swan, M. A., White, I. G. 1987. Susceptibility of epididymal boar sperm to cold shock and protective action of phosphatidylcholine. *Gamete Research* 17: 355-373.

Swierstra, E. E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. *The Anatomical Record* 161: 171-185.

Sztein, J.M., Noble, K., Farley, J.S., Mobraaten, L.E. 2001. Comparison of Permeating and Nonpermeating Cryoprotectants for Mouse Sperm Cryopreservation. *Cryobiology* 42: 28-39.

Tardif, S., Laforest, J.P., Cormier, N., Bailey, J.L. 1999. The importance of porcine sperm parameters on fertility in vivo. *Theriogenology* 52: 447-459.

Thibier, M., Guerin, B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 62: 233-251.

Trimeche, A., Yvon, J.M., Vidament, M., Palmer, E., Magistrini, M. 1999. Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 52: 181-191.

Vega-Hernández, A., Treviño, C.L., Félix, R. 2002. Canales iónicos y su papel funcional en el espermatozoide. *Avance y Perspectiva* 21: 89-95.

Visconti, P.E., Westbrook, V.A., Chertihin, O., Demarco, I., Sleight, S., Diekman, A.B. 2002. Novel signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity. *Journal of Reproductive Immunology* 53: 133-150.

Vyt, P., Maes, D., Dejonckheere, E., Castryck, F., Van Soom, A. 2004a. Comparative Study on Five Different Commercial Extenders for Boar Semen. *Reproduction in Domestic Animals* 39: 8-12.

Waberski, D., Meding, S., Dirksen, G., Weitze, K.F., Leiding, C., Hahn, R. 1994. Fertility of long-term-stored boar semen: Influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Animal reproduction science* 36: 145-151.

Waterhouse, K.E., Hofmo, P.O., Tverdal, A., Miller R.R. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction* 131: 887-894.

Watson, P.F. 1995. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals* 31: 135- 140.

Watson, P.F. 1995. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reproduction in Domestic Animals* 31: 135- 140.

Zeng, W.X., Terada, T. 2001. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* 55: 615-627.

9. ANEXO

Anexo 1. Estadísticos descriptivos de la evaluación de viabilidad espermática evaluada según rango etario.

Días	Verracos jóvenes			Verracos maduros		
	Media % de viabilidad	Des tip	E tip	Media % de viabilidad	Des tip	E tip
0	89,86	1,67	,68	88,81	2,95	1,32
2	87,85	3,62	1,48	90,11	1,75	,78
4	87,16	3,33	1,36	83,91	9,68	4,33
7	84,47	3,95	1,61	76,13	14,65	6,55
9	77,73	9,62	3,93	58,24	15,79	7,06
11	75,75	9,50	4,25	47,03	16,77	7,50

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Anexo 2. Estadísticos descriptivos de la evaluación de viabilidad espermática evaluada según día de almacenamiento.

Días	Media % de viabilidad	Des tip	E tip
0	89,38	2,28	,69
2	88,87	3,03	,91
4	85,68	6,78	2,04
7	80,68	10,61	3,20
9	68,87	15,80	4,76
11	61,39	19,85	6,28

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Anexo 3. Estadísticos descriptivos de la evaluación de anión superóxido según rango etario.

Días	Verracos jóvenes			Verracos maduros		
	Media IFM	Des tip	E tip	Media IFM	Des tip	E tip
0	6,11	4,26	2,13	6,81	2,72	1,36
2	4,80	1,16	,58	5,52	2,53	1,26
4	4,97	,86	,43	8,80	6,92	3,46
7	7,01	3,50	1,75	26,45	20,81	10,41
9	16,51	19,35	9,68	28,75	26,91	13,46
11	16,46	11,91	6,88	33,21	28,89	14,44

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Anexo 4. Estadísticos descriptivos de la evaluación de anión superóxido según día de almacenamiento.

Días	Media IFM	Des tip	E tip
0	6,4588	3,33	1,17684
2	5,1569	1,86	,65785
4	6,8823	5,01	1,76958
7	16,7298	17,29	6,11197
9	22,6271	22,67	8,01386
11	26,0302	23,34	8,82132

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Anexo 5. Estadísticos descriptivos de la evaluación de la peroxidación lipídica según rango etario.

Días	Verraco 1			Verraco 2			Verraco 3		
	Media IFM	Des tip	E tip	Media IFM	Des tip	E tip	Media IFM	Des tip	E tip
0	5,70	,42	1,84	6,11	,18	1,84	5,42	,27	1,84
2	5,98	,11	1,84	5,75	,25	1,84	4,87	,21	1,84
4	7,87	,46	1,84	5,93	,56	1,84	8,99	1,31	1,84
7	8,14	,20	1,84	7,93	,11	1,84	8,15	,19	1,84
9	9,56	,17	1,84	8,74	,34	1,84	9,92	,07	1,84
11	7,75	,75	1,84	16,67	4,58	1,84	19,00	4,64	1,84

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Anexo 6. Estadísticos descriptivos de la evaluación de la peroxidación lipídica según día de almacenamiento.

Días	Media IFM	Des tip	E tip
0	5,74	,40	,13
2	5,53	,54	,18
4	7,60	1,54	,51
7	8,07	,18	,06
9	9,40	,56	,19
11	14,47	6,10	2,03

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Anexo 7. Estadísticos descriptivos de la evaluación de la motilidad espermática y sus diferentes parámetros según rango etario.

Días	Movilidad			VCL		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	66,58	13,42	4,05	41,12	6,23	1,88
1	60,72	10,41	3,14	43,65	5,09	1,54
2	48,63	10,24	3,41	42,26	5,62	1,78
3	42,99	14,25	4,30	42,52	8,68	2,74
4	33,35	16,20	4,89	40,21	9,53	2,87
7	17,63	5,97	1,89	39,42	11,26	3,56

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Días	VSL			VAP		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	20,70	3,16	,95	51,15	9,51	2,87
1	19,25	3,37	1,02	44,26	6,95	2,10
2	17,78	3,31	1,05	42,81	10,10	3,20
3	15,67	3,89	1,23	38,35	12,26	3,88
4	14,39	3,92	1,18	37,08	12,00	3,62
7	11,47	1,60	,50	30,41	6,95	2,20

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Días	LIN			STR		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	51,15	9,51	2,87	72,10	5,65	1,70
1	44,26	6,95	2,10	68,50	4,07	1,23
2	42,81	10,10	3,20	67,77	7,47	2,36
3	38,35	12,26	3,88	63,68	11,24	3,55
4	37,08	12,00	3,62	62,06	11,81	3,56
7	30,41	6,95	2,20	53,08	6,26	1,98

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Días	ALH			BCF		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	2,05	,26	,08	6,63	,39	,12
1	2,23	,23	,07	6,66	,45	,14
2	2,19	,22	,07	6,45	,34	,11
3	2,18	,28	,09	5,91	1,28	,40
4	2,10	,51	,15	5,34	1,83	,55
7	2,60	,44	,14	2,18	,51	,16

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Anexo 8. Estadísticos descriptivos de la evaluación de la motilidad espermática y sus diferentes parámetros según día de almacenamiento.

Días	MOVILIDAD						VCL					
	Verracos jóvenes			Verracos maduros			Verracos jóvenes			Verracos maduros		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	65,06	18,90	8,45	67,85	8,38	3,42	39,90	5,96	2,67	42,13	6,81	2,78
1	65,98	9,30	4,16	56,33	9,85	4,02	42,70	5,89	2,63	44,45	4,74	1,93
2	54,70	10,09	5,04	43,78	8,19	3,66	42,83	7,17	3,58	41,88	5,05	2,06
3	50,38	14,37	6,43	36,83	11,86	4,84	40,38	9,91	4,43	44,66	7,72	3,45
4	47,16	12,45	5,57	21,85	7,18	2,93	40,62	9,66	4,32	39,87	10,33	4,22
7	19,62	7,72	3,45	15,64	3,27	1,46	42,74	14,20	6,35	36,10	7,49	3,35

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Días	VSL						VAP					
	Verracos jóvenes			Verracos maduros			Verracos jóvenes			Verracos maduros		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	20,08	3,06	1,37	21,22	3,43	1,40	27,86	2,84	1,27	29,37	4,14	1,69
1	20,28	4,04	1,81	18,40	2,78	1,14	28,74	5,54	2,48	27,42	3,21	1,31
2	19,30	4,36	2,18	16,77	2,29	,94	27,83	4,39	2,19	25,10	2,44	1,00
3	17,46	3,92	1,76	13,88	3,26	1,46	25,40	4,29	1,92	23,74	3,22	1,44
4	17,16	3,82	1,71	12,08	2,23	,91	24,90	3,87	1,73	21,72	4,06	1,66
7	11,02	1,61	,72	11,92	1,62	,72	21,86	4,25	1,90	21,52	1,50	,67

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Días	LIN						STR					
	Verracos jóvenes			Verracos maduros			Verracos jóvenes			Verracos maduros		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	51,34	10,94	4,89	50,98	9,22	3,77	71,98	6,71	3,00	72,20	5,28	2,16
1	47,52	6,91	3,09	41,55	6,24	2,55	70,46	4,07	1,82	66,87	3,58	1,46
2	46,05	12,73	6,36	40,65	8,52	3,48	69,25	10,02	5,01	66,78	6,11	2,49
3	44,94	12,05	5,39	31,76	9,20	4,12	68,76	8,42	3,77	58,60	12,19	5,45
4	43,88	13,31	5,95	31,42	7,85	3,20	68,86	10,29	4,60	56,40	10,48	4,28
7	27,10	6,33	2,83	33,72	6,42	2,87	51,10	7,10	3,17	55,06	5,28	2,36

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico

Días	ALH						BCF					
	Verracos jóvenes			Verracos maduros			Verracos jóvenes			Verracos maduros		
	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip	Media	Des tip	E tip
0	1,98	,26	,12	2,10	,28	,11	6,62	,47	,21	6,63	,37	,15
1	2,14	,30	,14	2,30	,13	,05	6,70	,43	,19	6,63	,50	,21
2	2,15	,24	,12	2,22	,23	,09	6,63	,25	,13	6,33	,36	,15
3	2,08	,29	,13	2,28	,26	,12	6,34	1,18	,53	5,48	1,34	,60
4	2,08	,38	,17	2,12	,63	,26	6,46	,98	,44	4,40	1,91	,78
7	2,78	,53	,24	2,42	,29	,13	2,30	,49	,22	2,06	,54	,24

Des tip: Desviación típica de la media

E tip: Error típico