



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“EFECTO DE LA ADICIÓN DEL ÁCIDO LIPOICO A  
DISTINTAS DOSIS EN LA DIETA DE VERRACOS Y SU  
REPERCUSIÓN SOBRE LA CALIDAD DEL EYACULADO”**

**T É S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**ESLÍ TAPIA VALE**

**ASESORES:**

**M.V.Z., M.C. Susana Espinosa Hernández  
M.V.Z., M.C. Marco Antonio Herradora Lozano**

MÉXICO D.F.

JUNIO 2008.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **DEDICATORIA.**

*A mis padres, Jorge E. Tapia Izaguirre y Ma. Imelda Vale Torres; ustedes han sido para mi un claro ejemplo de trabajo y disciplina, y con su amor, apoyo y sacrificio me han obsequiado las herramientas necesarias para poder enfrentarme a los retos de la vida.*

*Mejores padres no pude haber tenido! Esta tesis es para ustedes!*

*¡MUCHAS GRACIAS! ¡LOS AMO!*

*A mis hermanos Jiel y Esaú, ya que siempre estuvieron en el momento preciso para extenderme su mano y brindarme esa ayuda necesaria. Siendo el más pequeño de los tres, siempre supe que podría contar con ustedes.*

*¡GRACIAS POR TODO HERMANOS!*

*A mis primos Tania y Omar, Nidia, Nora e Irais, Antar y Numa, Ramsés, Bogar y Ulises, Mario y Cecilia, Bárbara, Andrea y Leonardo.*

*A mis Tíos, Omar, Alfonso, Horalia, Froylán, Sonia, Mario, Ema, Marina, Martín, Estela y Joaquín.*

*A Rolando, tu ayuda y tus consejos fueron fundamentales en éste trabajo. En verdad me alegro de haber encontrado en ti a una buena persona, un mejor profesionista y un excelente amigo.*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero agradecer a todos los miembros del Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de esta gran Universidad, que durante mi estancia, además de ser mis maestros, los considero mis amigos:

Marco A Herradora Lozano, Susana Espinosa Hernández, José Iván Sánchez Betancourt. Pedro Juan Bautista de La Salle Fernando Pradal-Roa, Gerardo Ramírez Hernández, Roberto Martínez Gamba, Mario E. Haro Tirado, Alejandra Mercadillo Sierra, Carmen Mercado García, Esperanza Galván Pérez, Rosalba Carreón Nápoles, Germán Borbolla Sosa.

Al Lic. Cruz Bautista Muñoz, dueño de la Granja Santa Cruz, por haber permitido el uso de sus instalaciones para realizar éste trabajo.

A mis otros amigos Silvia, Erandi, Manuel, Ernesto, Flor, Rocío, Cecilia, Zuleika, Toño, Claudia. Mariana.

## CONTENIDO.

	<b>Página.</b>
<b>TÍTULO</b> .....	<b>i</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iii</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>iv</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1.1 Antecedentes generales de la Inseminación Artificial (IA).....	<b>3</b>
1.1.1 IA con semen diluido.....	<b>4</b>
1.1.2 Inseminación Intrauterina.....	<b>4</b>
1.1.3 Preservación de semen congelado.....	<b>4</b>
1.1.4 Sexado del semen.....	<b>5</b>
1.2 Características del semental.....	<b>5</b>
1.2.1 Pubertad.....	<b>5</b>
1.2.2 Manejo.....	<b>6</b>
1.2.3 Ambiente.....	<b>7</b>
1.3 Características Macroscópicas y Microscópicas del semen.....	<b>7</b>
1.3.1 Características Macroscópicas.....	<b>8</b>
1.3.2 Características Microscópicas.....	<b>9</b>
1.4 Prueba de Osmolaridad (Host).....	<b>12</b>
1.5 Estrés oxidativo y lipoperoxidación de la membrana.....	<b>13</b>
1.6 Antioxidantes.....	<b>15</b>
1.7 Ácido lipoico como antioxidante.....	<b>19</b>
1.8 <b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>23</b>
1.9 <b>OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
1.10 <b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
2.1 Animales.....	<b>25</b>
2.2 Colección de semen.....	<b>26</b>
2.3 Evaluación de Semen.....	<b>26</b>
2.3.1 Características Macroscópicas.....	<b>27</b>
2.3.2 Características Microscópicas.....	<b>27</b>

2.4 Análisis Estadístico.....	29
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Variables Macroscópicas del semen.....	30
3.1.1 Volumen.....	30
3.2 Variables Microscópicas del semen.....	31
3.2.1 Vigor.....	31
3.2.2 Aglutinación.....	32
3.2.3 Concentración.....	33
3.2.4 Malformaciones.....	34
3.2.5 Integridad de Membrana.....	35
<b>4. DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
4.1 Volumen.....	37
4.2 Movimiento espermático.....	38
4.2.1 Motilidad.....	38
4.2.2 Vigor.....	38
4.2.3 Aglutinación.....	39
4.3 Concentración.....	39
4.4 Malformaciones.....	40
4.5 Integridad de Membrana.....	40
<b>5. COLCLUSIONES.....</b>	<b>42</b>
<b>6. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>43</b>

## RESUMEN

TAPIA VALE ESLÍ. Efecto de la adición del ácido lipoico a distintas dosis en la dieta de verracos y su repercusión sobre la calidad del eyaculado (bajo la dirección de M.V.Z., E.P.A., M.C., Susana Espinosa Hernández y M.V.Z. M.C., Marco Antonio Herradora Lozano).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del ácido lipoico (AL) sobre la calidad del eyaculado al ser administrado a distintas dosis vía oral durante cinco semanas. El estudio se realizó en una granja productora de lechones, para lo cual se utilizaron 12 sementales con un peso promedio de 250 Kg de razas puras, así como cruza, divididos en tres grupos de cuatro animales cada uno, al tratamiento A se le adicionó 10 mg de AL / Kg de peso vivo (PV); al tratamiento B, 15 mg de AL / Kg de PV; y al tratamiento C, 20 mg de AL / Kg de PV durante cinco semanas. La evaluación de las características seminales: olor, color, temperatura, volumen, pH, motilidad, vigor, aglutinación, concentración y anormalidades, se realizó durante cinco semanas antes de la adición del AL, durante las cinco semanas de aplicación y cinco semanas posteriores a su inclusión en el alimento. También se evaluó la integridad de la membrana celular y el daño acrosomal a través de la prueba de Host corto y utilizando la tinción de Coomassie. Se analizó el efecto de los tratamientos sobre las variables a través de un ANDEVA y un diseño de factores anidados sobre el semental. Además, por la prueba de Tukey se determinó la diferencia entre medias, empleando para ello el método de modelos lineales generalizados del paquete estadístico JMP. Se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para las variables Volumen, Vigor y Concentración en el tratamiento C (20

mg/Kg) con respecto a los tratamientos A (10mg/kg.) y B (15 mg/kg.), para la variable Aglutinación existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el tratamiento B en relación a los tratamientos A y B. La variable Malformaciones, para el tratamiento C, el valor del grupo control fue estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ). En cuanto a la integridad de membrana se obtuvo diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) con el tratamiento B en relación a los tratamientos A y C en la etapa de aplicación. El tratamiento C provocó un aumento en las características indeseables del semen y una disminución en las características deseables, con excepción de la variable volumen. Se observó mejoría no estadística ( $p < 0.05$ ) en las características seminales al administrar la dosis de 10 mg de AL / Kg. de PV.



# **1. INTRODUCCIÓN.**

## **1.1 Antecedentes generales de la Inseminación Artificial (IA).**

Una de las actividades que actualmente se realiza en las granjas porcícolas, y que además se ha desarrollado de forma exitosa en los últimos años, es la Inseminación Artificial (IA). Esta es una técnica por medio de la cual, se transfieren los gametos del macho para llegar al óvulo por medios distintos al apareamiento natural (1), y además es una forma práctica y eficiente de mejorar genéticamente al hato productivo, ya que con sólo unos cuantos machos seleccionados es posible inseminar a un número importante de hembras al año (2).

Los beneficios que esta práctica genera son ampliamente conocidos, entre los cuales se pueden mencionar los siguientes: aprovechamiento de los recursos, control sanitario, mejoramiento genético y disminución en los costos. Sin embargo, a raíz del uso de la IA, se ha abierto la puerta al desarrollo de nuevas tecnologías con el fin de que la reproducción asistida sea mucho más eficiente en el campo veterinario. El mejoramiento y la eficacia en la producción porcina, especialmente en los años recientes, es el resultado de la implementación de prácticas y tecnología innovadora en la producción (3).

Algunas de estas tecnologías están involucradas en programas de IA, tal es el caso de la IA con semen fresco diluido, Inseminación intrauterina (4), Preservación de semen congelado, Sexado del semen, Preservación de embriones, Métodos de transferencia genómica, e incluso Mapas genéticos (3).

### 1.1.1 *IA con semen fresco diluido.*

Es la técnica de IA más empleada a nivel mundial, ya que es muy sencilla de implementar en la granja y no se requiere de personal ni equipo especializado, que sólo aumentan los costos de producción en la granja. Al llevar a cabo este manejo en la granja, además de mejorar genéticamente el hato productivo, se controlan las enfermedades de transmisión sexual y aumenta la tasa de fertilidad al asegurar la calidad seminal, eliminando los machos no deseados (3).

### 1.1.2 *Inseminación intrauterina.*

Ésta técnica se desarrolló en el año de 1999, y es un método no quirúrgico en el cual se deposita el semen en el útero (un sitio muy cercano a los cuernos). Esto permite el uso de una menor cantidad de volumen seminal y con ello una menor concentración espermática, obteniendo de así, resultados de fertilidad y prolificidad muy semejantes a los obtenidos con método de inseminación convencional (4).

### 1.1.3 *Preservación de semen congelado.*

La IA con semen congelado ha sido una opción viable desde el año de 1975. Siendo una técnica desarrollada con el fin de exportar y comercializar genética porcina específica, no es ampliamente utilizada a nivel de campo, simplemente porque no es económica en comparación con el uso de semen fresco diluido. Además, el semen congelado requiere de dos a tres veces más la cantidad de espermatozoides al momento de inseminar, el tamaño de la camada se ve reducido en uno a tres lechones menos (3).

#### 1.1.4 *Sexado del semen.*

Otra opción que se tiene para mejorar la producción, es el sexado del semen. En dicha tecnología se clasifica el semen con un 95% de exactitud y se producen camadas que presentan genotipo sexual orientado hacia un género u otro siendo una opción viable (3).

Todos estos métodos y técnicas desarrolladas han tenido un impacto muy grande en la producción porcina, pues han mejorado las características fenotípicas y se han acentuado aquellos rasgos genéticos deseables en esta especie, como son un mejor rendimiento de canal en los animales de abasto y una mayor producción láctea en las madres.

## **1.2 Características del Semental.**

Para que la IA y todas estas nuevas técnicas y métodos desarrollados, se lleven a la práctica de la mejor manera, es necesario tomar en cuenta a los sementales ya que aportan el 50% del material genético de los cerdos que son destinados a rastro. Los sementales porcinos se han convertido en un elemento vital dentro de las granjas porcinas, más aún en los Centros de Transferencia Genética (CTG), y junto con la IA, han sido en los últimos años objeto de estudio de innumerables investigaciones encaminadas a mejorar su desempeño productivo (1).

### **1.2.1 Pubertad.**

Para que un verraco pueda tener el mayor aprovechamiento posible en su vida productiva se deben conocer ciertos aspectos fisiológicos, la pubertad se presenta entre los 5 y 8 meses de edad (2) y su inicio se da por un incremento en las cantidades de las hormonas folículo-estimulante (FSH) y testosterona, que durante la fase prepúber tienen un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de gonadotropinas (2). Poco antes de la pubertad, el hipotálamo es menos sensible a esta retroalimentación negativa, principalmente para la FSH, lo que origina un incremento en los niveles plasmáticos de esta hormona y reduce la capacidad inhibitoria de la testosterona. Al mismo tiempo la FSH promueve el desarrollo de receptores para la Hormona Luteinizante (LH) sobre las células de Leydig, lo que aumenta la cantidad de esta hormona. La LH estimula el incremento en la cantidad de testosterona, al permitir que esta última se una a proteínas receptoras en las células de Sertoli y sea transferida a la célula germinal acelerándose la espermatogénesis (1).

Se puede decir que el macho llega a la pubertad cuando la cantidad de espermatozoides en el túbulo seminífero es mayor que la cantidad de espermatidas, aunque la espermatogénesis se inicia desde los 115 días de vida, ésta no se estabiliza sino hasta los 180 días, cuando la organización celular de los túbulos seminíferos indica la maduración testicular (1).

### **1.2.2 Manejo.**

El manejo está en función de aspectos como son el ambiente social, el cual tiene un efecto negativo en el comportamiento sexual si es que los machos son criados en forma aislada, por lo que es preferible que se críen juntos en grupos pequeños de entre 5 y 10 animales con un espacio vital de 1.5 m<sup>2</sup> (1).

### **1.2.3. Ambiente.**

Es muy importante controlar la temperatura ambiental en las instalaciones de los sementales, ya que al incrementarse ésta, aumenta consigo la temperatura corporal y por consiguiente la del escroto, la cual oscila entre 35 y 36.5°C de forma normal. Al aumentar la temperatura en el escroto, surgen efectos negativos en la motilidad y concentración espermática, así como el aumento de malformaciones celulares (1).

Se ha sugerido el uso de periodos controlados de luz en casetas de sementales para incrementar su comportamiento reproductivo y su calidad seminal (5). Algunos autores han comprobado que la luz suplementaria acelera la pubertad en el verraco y provoca en los sementales una conducta sexual más marcada así como un mayor número de montas en comparación con aquellos animales sometidos aun fotoperiodo corto (1, 5). Por otro lado Mudra *et. al.*, (1990) concluyeron que verracos sometidos a un fotoperiodo natural obtuvieron un mayor volumen de eyaculado comparándolos con

otro grupo de sementales sometidos a un periodo de luz controlada de 8.5 horas diarias durante un año. Sin embargo, al evaluar otras características como concentración espermática, motilidad o incidencia de anomalías espermáticas, no encontraron diferencia alguna entre ambos grupos; incluso la tasa de fertilidad y prolificidad fue similar en ambos grupos evaluados (5).

### **1.3 Características Macroscópicas y Microscópicas del semen.**

La espermatogénesis es un proceso mediante el cual las células germinales inmaduras experimentan ciertos cambios morfológicos, como son la división, diferenciación y meiosis, para dar origen a espermátidas haploides altamente especializadas (2, 6). Dicho proceso se lleva a cabo dentro de los túbulos seminíferos del testículo en contacto estrecho con las células somáticas del epitelio seminífero, las células de Sertoli. En el cerdo, la espermatogénesis ha sido descrita y calculada en 31-35 días con una duración del transporte epididimario de 10 a 15 días (7).

#### **1.3.1 Características Macroscópicas.**

El semen, constituido por espermatozoides y plasma seminal, debe tener ciertas características que pueden ser evaluadas de forma sencilla, como son el color, olor, volumen, temperatura y pH.

El semen debe ser blanco, aunque depende de la concentración espermática, ésta tonalidad varía de una apariencia acuosa (concentración espermática baja) hasta un color blanco cremoso (concentración espermática alta). En ocasiones el semen puede

tomar una tonalidad ligeramente rojiza, lo que puede indicar la presencia de sangre (hemospermia), lo cual puede deberse a heridas en el cuerpo del pene o el glande, o quizá heridas internas, ya sea en los conductos deferentes o en la uretra. Si a la vista, el semen presenta una tonalidad ligeramente amarilla, generalmente se debe la contaminación de orina ocurrida en el momento de la colección (1, 2).

El semen no debe presentar ningún olor, en algunos casos si la colección no se realiza correctamente, el semen puede ser contaminado con la orina del verraco y este es el olor que adquiere, también existen casos en que el semen tiene un olor completamente desagradable, como en estado de descomposición, esto indicaría un problema a nivel testicular, posiblemente debido a infecciones bacterianas (1).

El volumen normal oscila entre 125-250 ml (1, 2), aunque esto depende principalmente de la edad del semental. Animales muy jóvenes (6-8 meses de edad) que están comenzando su vida reproductiva, normalmente eyaculan volúmenes pequeños, y conforme maduran y alcanzan su máxima producción y calidad espermática, este volumen es mucho mayor. En algunos casos el volumen de eyaculado puede alcanzar e incluso superar los 500 ml, sin embargo, son casos excepcionales, aunque desafortunadamente no siempre existe una relación entre un volumen de semen mayor y una adecuada calidad seminal.

Las variaciones térmicas del semen una vez obtenido, afectan en gran medida la integridad espermática, ya sea por la muerte celular o malformaciones espermáticas. La temperatura óptima para mantener y diluir el semen es de 35-36°C (1).

El pH es una característica comúnmente evaluada en el laboratorio, que indica la actividad metabólica del espermatozoide, ya que conforme transcurre el tiempo desde la colección, se produce ácido láctico lo cual provoca un descenso en el pH. Los valores normales varían de 7.2 a 7.8 (1).

### **1.3.2. Características Microscópicas.**

Dentro de las características a evaluar se encuentran la motilidad, el vigor, aglutinación, concentración, conteo de malformaciones espermáticas y daño acrosomal.

La motilidad es el movimiento en masa e individual que los espermatozoides muestran al ser evaluados en el microscopio óptico. Con el uso del objetivo seco débil (10x) se puede estimar la movilidad general en una muestra de semen, otorgándole un valor porcentual, el porcentaje aceptado de motilidad oscila entre el 70% y 90%, conforme este valor sea menor la calidad seminal disminuirá, así como la probabilidad de éxito en la inseminación (1, 2).

El vigor se refiere al tipo de movimiento que un espermatozoide tiene, el cual se evalúa con el objetivo seco fuerte (40x). Al evaluar este parámetro, se observan diferentes movimientos, desde nulo, movimientos lentos o en círculo, hasta un movimiento recto y rápido, para evaluar esta característica se le ha dado un valor jerárquico de 0 a 5, siendo este último el valor más alto, por lo tanto el valor esperado en eyaculados de calidad (1).



La aglutinación es el adosamiento espermático producido por la falta de motilidad celular, anormalidades espermáticas o presencia de anticuerpos, o producido por algún tipo celular diferente al espermatozoide que lo provoca. Este parámetro puede ser acentuado por infecciones virales o bacterianas. El valor de aglutinación que un eyaculado puede presentar se asigna de acuerdo a un orden jerárquico que va desde 0 a 4 (1).

La concentración se obtiene mediante el uso de espectofotometría, cámara de Bürker o cámara de Neubauer, realizando una dilución previa del semen fresco, ya sea 1:100 o 1:200 según el tipo de cámara. Esta concentración puede variar por la edad, el estado de salud y nutricional del verraco y el trabajo en exceso. La concentración en la fracción rica del semen se encuentra en un rango de  $6$  a  $10 \times 10^8$  espermatozoides/ml (1, 2).

Los análisis de semen que comúnmente se realizan en los laboratorios de transferencia genética (CTG), para estimar la fertilidad de los verracos, toman como parámetros de evaluación algunas características seminales como las ya mencionadas anteriormente (concentración, motilidad y movimiento progresivo), asumiendo que éstas mediciones brindan información suficiente para conocer el estado del macho. Sin embargo, los parámetros anteriores tienen limitaciones y por si solos, podrían no brindar la información necesaria para determinar si el eyaculado de los sementales tiene la capacidad para fertilizar los gametos femeninos (8, 9).

Con el fin de adquirir un mayor conocimiento sobre la capacidad fertilizante que tiene el semental, se han desarrollado muchas pruebas de laboratorio para evaluar los diferentes parámetros en el semen, aunque el principal problema, además del costo que

éstas presentan, es que toma mucho tiempo realizarlas y es muy probable que no puedan ser aplicables en condiciones de campo (9).

En la actualidad se conoce la importancia del estudio de la funcionalidad de la membrana espermática, debido a que existe intercambio metabólico entre la membrana y el medio en el que se encuentra. Además, los procesos de capacitación, reacción acrosomal y la fusión entre el espermatozoide y la superficie del ovocito, necesitan de una membrana bioquímicamente activa. Por tal motivo se diseñó una técnica para evaluar la función de la membrana llamada Prueba de ensanchamiento hipo-osmótico (Host, por sus siglas en inglés) (8). Su principio se basa en la observación de las alteraciones morfológicas de las células al ser expuestas a condiciones de hipo-osmolaridad (8).

El acrosoma es el único organelo espermático que se origina desde el complejo de Golgi y contiene enzimas necesarias para que el espermatozoide pueda penetrar la envoltura del ovocito durante la fertilización. Consiste en una doble membrana vesiculada, situada sobre el núcleo en la parte anterior de la cabeza espermática (6). Durante la fertilización en los mamíferos, el espermatozoide experimenta un proceso excitotóxico conocido como reacción acrosomal, para llevar a cabo la fertilización del ovocito. Esta reacción incluye procesos como la fusión de la porción apical de la membrana plasmática, con la capa externa de la membrana acrosomal en varios sitios de la cabeza espermática. Esta disrupción en dichas membranas, provoca la salida de enzimas que degradan la zona pelúcida del ovocito permitiendo así, el paso del espermatozoide a través de ella (10).

Para llevar a cabo estudios de fertilidad, es necesario conocer el estado del acrosoma espermático. Actualmente existen varios métodos viables para determinar el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal en una muestra de semen, tal es el caso de la inmunofluorescencia indirecta, en la que se utilizan anticuerpos monoclonales contra proteínas acrosomales, o el marcaje de lectinas con fluorocromos, clortetraciclina fluorescente e incluso la microscopia electrónica. Todas estas son técnicas y herramientas para determinar el estado del acrosoma, aunque muchas de estas son costosas o requieren de reactivos y equipo de alto valor monetario (10).

#### **1.4 Prueba de osmolaridad (HOST).**

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. La evaluación de su integridad constituye una importante información en la evaluación de la fertilidad potencial del macho. Además, la integridad de la membrana no sólo es fundamental para el metabolismo del espermatozoide, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción del acrosoma y, por lo tanto, para la fertilidad del macho (9).

La prueba de Host, permite evaluar la funcionalidad de la membrana plasmática de los espermatozoides, mediante la observación de alteraciones morfológicas que sufren las células espermáticas al ser expuestas a condiciones hipotónicas (incremento de tamaño del espermatozoide y flagelos curvos). Se ha observado que la suspensión de espermatozoides en un medio hipotónico ocasiona desequilibrio osmótico entre el medio extracelular y el intracelular, situación que el espermatozoide trata de corregir movilizand o agua al compartimiento intracelular, como consecuencia, la célula aumenta su volumen y por la flexibilidad que posee la membrana, la cola sufre un

notable cambio en su morfología, plegándose en si misma dando la apariencia de estar enrollada (9).

En condiciones fisiológicas la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente inactiva, aún cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto la prueba hipo-osmótica es un indicador preciso para conocer estado de la membrana celular y acrosoma espermático (8, 9, 10).

## **1.5 Estrés oxidativo y lipoperoxidación de la membrana.**

El desbalance entre sustancias oxidantes y los sistemas antioxidantes, conduce al incremento de radicales libres (RL) (11, 12), a esta condición se le conoce como estrés oxidativo. Este desbalance se debe a:

- Disminución sustancial de antioxidantes, debido a deficiencias de vitaminas E y C.
- Excesiva producción de radicales libres, ya sea por exposición a elevadas concentraciones de oxígeno, presencia de toxinas que son metabolizadas para originar radicales libres, o por excesiva activación de sistemas productores de éstos compuestos en condiciones fisiológicas.

En el estrés oxidativo se presenta la peroxidación de los lípidos que se encuentran en constante exposición a las especies reactivas de oxígeno, es la responsable del daño a los tejidos vivos, en los que pueden producir diferentes procesos patológicos como inflamación e incluso cáncer. Estos efectos se generan debido a la formación de radicales libres, que son producidos a partir de peróxidos provenientes de ácidos grasos con enlaces dobles interrumpidos por metileno, esto es, en los ácidos grasos poliinsaturados naturales. La lipoperoxidación consiste en una reacción en cadena que proporciona un suministro continuo de radicales libres, siendo éstos los que inician y continúan el proceso de lipoperoxidación (11).

El daño celular originado por un exceso de radicales libres, tiene como consecuencia la alteración de la membrana plasmática a través de la oxidación de los

residuos de ácidos grasos de la bicapa lipídica y que ocasiona cambios en la composición química y deterioros en la organización ultraestructural de las membranas celulares, disminuyendo la fluidez de la misma, alterando su permeabilidad e inactivando receptores y enzimas unidas a la membrana (12).

El daño que la lipoperoxidación provoca en el espermatozoide, se ve reflejado en la pérdida de la motilidad, así como en la disminución de la capacidad fertilizante (13), también provoca fragmentación del DNA, modifica las proteínas del citoesqueleto, afecta el desarrollo del axonema espermático e inhibe la fusión del espermatozoide con el ovocito (11, 12).

## **1.6 Antioxidantes.**

Uno de los aspectos importantes para mantener en óptimas condiciones al seminal y por ende la calidad espermática es el uso de antioxidantes, los cuales son sustancias que, ya sea de forma directa o indirecta, protegen a las células contra los efectos adversos de sustancias oxidantes como xenobióticos, drogas y carcinogénicos. Estas sustancias desempeñan un papel muy importante en la prevención de numerosas patologías de tipo cardiovascular o cerebrovascular, tumores y procesos degenerativos producto del envejecimiento natural en todo organismo viviente (14).

Para defenderse de la acción de estas sustancias y de los radicales libres, el organismo incluye una defensa de tipo enzimática como son, la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa; y otra defensa de tipo no enzimática, entre las cuales se incluye a las vitaminas A, E y C, que tienen la función de eliminar el efecto

de los radicales libres y otros compuestos reactivos. Dado lo anterior, la dieta de los sementales está adicionada con vitaminas y minerales para brindarles protección contra los ya mencionados RL, teniendo de éste modo un mayor control sobre la calidad en el eyaculado (11).

Mecanismos enzimáticos.

La enzima **superoxido dismutasa (SOD)**. Se encarga de la reacción de dismutación del radical anión superóxido intracelular. La enzima pertenece a la familia de las metaloenzimas, catalizando la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno (11).

Tres iso-enzimas son producidas en mamíferos, Cu,Zn-SOD, que contiene cobre y zinc como cofactores metálicos y se localiza en el citoplasma de todos los organismos animales y vegetales que viven bajo condiciones aeróbicas, Mn-SOD es una isoforma mitocondrial que contiene manganeso y Fe.SOD es la forma extracelular, estructuralmente es similar a Cu,Zn-SOD ya que también contiene Cu y Zn como cofactores metálicos.

La **Catalasa** es una hemoproteína con cuatro grupos hemo; además de poseer actividad de peroxidasa, es capaz de utilizar una molécula de  $H_2O_2$  como sustrato donador de electrones y otra molécula de  $H_2O_2$  como oxidante o donador de electrones. La catalasa se encuentra en médula ósea, sangre, mucosas, riñones e hígado. Se estima que su función consiste en la destrucción del peróxido de hidrógeno formado a

consecuencia de la acción de las oxidasas. En tejidos como el hígado, se presentan los microcuerpos o peroxisomas, que abundan en oxidasas y catalasas (15).

La **Glutación Peroxidasa** (GPx) tiene una función central en la detoxificación de peróxidos usando la forma reducida del Glutación (GSH) como un donador de electrones. Muchas enzimas clasificadas en diferentes familias de proteínas, exhiben una actividad peroxidasa GSH-dependiente (11). La glutación contiene selenocisteína (Sec) en su centro activo para la detoxificación de peróxidos, y los mamíferos producen isoenzimas GPx conteniendo selenio.

La catalasa y glutación peroxidasa conforman el principal sistema enzimático de remoción de moléculas de peróxido de hidrógeno. La catalasa se localiza a nivel de peroxisomas y la glutación peroxidasa a nivel de citosol y mitocondrias (11).

**La vitamina E** o  $\alpha$ -tocoferol es el principal antioxidante liposoluble presente en las membranas celulares, actúa directamente contra radicales peroxilos y los transforma en formas menos reactivas por lo que juega un papel esencial en la integridad cardiovascular y del sistema nervioso, así como en el mantenimiento de la actividad inmunológica. La vitamina E no se sintetiza por el organismo de mamíferos, su absorción depende del consumo de lípidos en la dieta y ambos dependen de una normal secreción de bilis para su correcta absorción. Es también el componente primario en el sistema antioxidante de los espermatozoides, ya que se encuentra presente en el plasma seminal de mamíferos (16). Es un excelente protector de membrana contra la lipoperoxidación ya que es un componente de la enzima glutación peroxidasa, se ha observado que al suplementar esta vitamina en la dieta, aumenta la concentración



espermática, mejora la motilidad y disminuye el porcentaje de células anormales (16, 12).

El **zinc**, es indispensable para la reproducción, principalmente en el macho y está presente en altas concentraciones en el semen de los mamíferos. Su presencia en el semen se relaciona inicialmente con algunos aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos del espermatozoide. Junto con la vitamina E participa en la síntesis y el metabolismo de ácidos nucleicos y en la transcripción de genes, así como en el desarrollo y tamaño testicular y algunas características físicas espermáticas como son el volumen, motilidad, concentración y porcentaje de células vivas y menor cantidad de anormalidades (16).

La **vitamina C** está presente como ascorbato en la mayoría de los sistemas biológicos, al ser soluble en agua puede actuar tanto dentro como fuera de las células. Dentro de ellas, protege a las proteínas solubles y al DNA del daño provocado por los radicales libres. Se localiza en altas concentraciones en ciertos órganos, especialmente en el ojo. La vitamina C también protege a las membranas biológicas, ya que es capaz de reaccionar con los radicales libres en medio acuoso, reacciona con el radical tocoferilo, regenerando a la vitamina E, convirtiéndose en el radical ascorbilo A, que es igualmente estable. La función bioquímica de la vitamina C se basa en su capacidad para donar uno o dos electrones en reacciones de hidroxilación (17).

El **selenio** es uno de los antioxidantes más importantes, se encuentra en el flagelo de los espermatozoides, y sus funciones son el mantenimiento de la integridad estructural y de la función locomotora del espermatozoide, su deficiencia provoca

alteraciones en la mitocondria. Es un componente estructural de la selenoenzima glutatión peroxidasa en mamíferos (18, 19, 20), la cual protege a la membrana espermática de la lipoperoxidación. Se ha observado que la suplementación de 0.25 a 0.30 ppm, aumenta la motilidad y la calidad morfológica espermática, mejorando el porcentaje de fertilidad (18).

El  **$\beta$  caroteno** es un antioxidante y puede desempeñar una función muy importante en la captura de radicales libres en los tejidos expuestos a bajas concentraciones de oxígeno. Esta función se debe a la estabilización de radicales libres de peróxido orgánico dentro de su estructura. Ya que el  $\beta$  caroteno es efectivo a bajas concentraciones de oxígeno, complementa las propiedades antioxidantes de la vitamina E, la cual sólo es efectiva en altas concentraciones (15, 21).

### 1.7. Ácido lipoico como antioxidante.

El ácido a lipoico (AL), también conocido como ácido tióctico, lipoato, DL-6,8-ácido tióctico, 1,2-ditioilano-3-ácido pentanóico (22,23), se conoce desde la década de los años 50 como un cofactor esencial en el metabolismo oxidativo, y fue en 1951 cuando Reed y colaboradores lograron purificarlo (24). Está compuesto por una cadena de cinco carbonos y un enlace disulfuro (22).

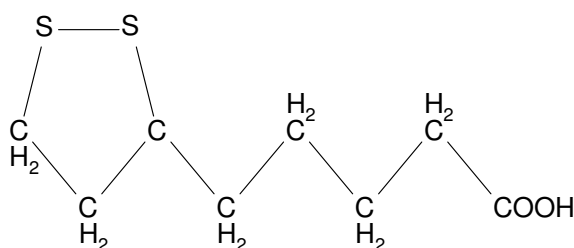


Figura 1 Estructura molecular del ácido lipoico.

Se encuentra de forma natural en la dieta humana, y es abundante en aquellos tejidos con alta actividad metabólica como el corazón, el hígado y los riñones. Todo el ácido lipoico que es suplementado en la dieta, se transporta por el torrente sanguíneo hacia los tejidos y es incorporado a la célula (22, 23).

Está ampliamente distribuido en plantas y animales, tanto en membranas como en el citosol. Al romperse el enlace disulfuro, el AL puede cambiar su estructura molecular a una forma reducida llamada Ácido Dihidrolipoico (DHHLA) (25, 26, 27).

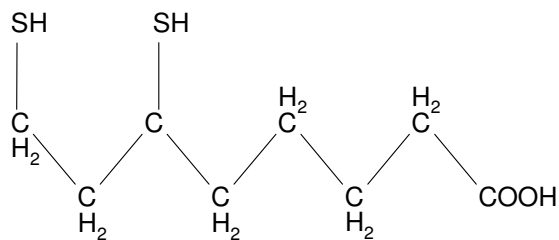


Figura 2. Estructura molecular del ácido dihidrolipoico.

Una de sus propiedades es el ser tanto hidrosoluble como liposoluble, y tanto en su forma libre como en la forma reducida, como ácido dihidrolipoico son potentes antioxidantes, y entre sus funciones se encuentran (25, 26):

- Destrucción de los RL.
- Regeneración de antioxidantes exógenos y endógenos como la vitamina C, E y el glutatión.
- Quelación de iones metálicos.
- Reparación de proteínas oxidadas.

Es un cofactor en la conversión de piruvato a Acetil CoA, como parte del complejo piruvato deshidrogenasa. Esta reacción que es irreversible en los tejidos animales, constituye un paso obligado para la incorporación de todos los glúcidos (por la vía del piruvato) al ciclo de Krebs (15).

El AL protege la integridad de la membrana celular por la interacción que tienen con la Glutación peroxidasa (GSH) y con las vitaminas E y C. En ratas adultas se suplementó el DL-alpha-1 ácido lipoico y mostró un decremento en los niveles de lipoperoxidación, así como un incremento de Glutación, vitamina C y E (Figura 3) (22, 23, 28, 29) y también en enzimas como la isocitrato deshidrogenasa y alfa-cetoglutarato.

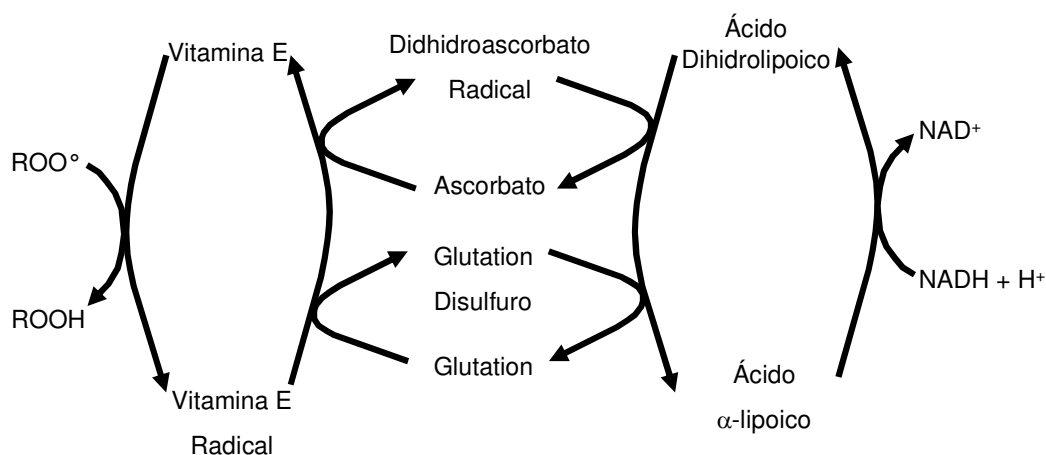


Figura 3. Interacción del Ácido Lipoico con la Vit E, Vit. C y Glutación.

En muchas células, el AL es reducido en la mitocondria, mediante una reacción NADH dependiente con lipoamida deshidrogenasa para formar al DHLA. En las células que carecen de mitocondria, como las bacterias, el AL puede ser reducido a DHLA vía NADPH con glutación y tioredoxina reductasa (25,28, 29).

Se sabe que el ácido lipoico elimina eficientemente al radical hidroxilo, al oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno, entre otros. Su forma reducida, el DHLA también tiene la capacidad de destruir a los radicales peróxido y superóxido, lo que hace que tanto el ácido lipoico como al ácido dihidrolipoico sean uno de los sistemas óxido-reductores más eficaces. Estas dos moléculas también activan otros procesos antioxidantes adicionales mediante la quelación de hierro, cobre y otros metales de transición (22, 23).

El ácido lipoico puede originarse a través de síntesis de *novo* vía ácido lipoico sintasa proveniente del ácido graso octanoico y cisteína en el interior de la mitocondria (22, 23).

Se ha establecido que en mamíferos el AL proveniente de la dieta no es suficiente para generar sus efectos antioxidantes. La síntesis de *novo* toma lugar en el corazón, el hígado y testículos, sin embargo, con este proceso se obtienen muy bajas concentraciones de AL libre circulante, y solo mediante la suplementación se alcanzan niveles preventivos (22, 23, 28, 29).

## **1.8 JUSTIFICACIÓN.**

La calidad del semen depende en gran medida de la integridad de la membrana de las células espermáticas, por ello el ácido lipoico puede utilizarse como una alternativa para la protección antioxidante.

Con base en la literatura revisada y dada la importancia que tiene para la producción porcina la obtención de semen de alta calidad, es relevante contar con nuevas alternativas como lo son los antioxidantes, sin embargo, la información o la experimentación realizada con el AL es escasa, por lo tanto surge la necesidad de evaluar el efecto que tiene la adición de éste en dietas para sementales porcinos, y evaluar su efecto sobre las características del semen producido, a fin de mejorar el desempeño de verracos empleados en los centros de transferencia genética en México.

## **1.9 OBJETIVOS.**

- 1 Establecer la dosis más adecuada de ácido lipoico para los sementales porcinos adultos.
- 2 Evaluar las características macroscópicas (color, olor, volumen, pH y temperatura) y microscópicas (motilidad, vigor, aglutinación, concentración, anomalías) del semen antes, durante y después de la administración del ácido lipoico en la dieta de sementales porcinos, a distintas dosis.
- 3 Evaluar la integridad del acrosoma y la membrana del espermatozoide a través de la prueba de Host corto (10) y con la tinción de Coomassie (11) antes durante y después de la adición del AL a la dieta de los verracos.

## **1.10 HIPÓTESIS.**

La adición de ácido lipoico a distintas dosis en la dieta de verracos, modifica la calidad del eyaculado.

## **2. MATERIAL Y MÉTODOS**

El trabajo experimental se realizó en una granja a pequeña escala productora de lechones ubicada en el Municipio de Otumba, Estado de México, a una altitud media de 2250 msnm, en la zona predomina el clima templado sub-húmedo con lluvias en verano, una temperatura media anual de 14.8°C y precipitación pluvial anual de 573.3 mm (30).

Dicha granja tiene un laboratorio para procesamiento de semen porcino donde se lleva a cabo la evaluación y posterior elaboración de dosis seminales.

### **2.1 Animales.**

Se utilizaron 12 sementales con un peso promedio de 250 kg, (2 Yorkshire, 1 Landrace, 2 Duroc, 2 Yorkshire-Landrace, 1 Yorkshire-Pietrain, 1 Hampshire-Yorkshire, 1 Landrace-Duroc, 1 Duroc-Pietrain y un DP/YL) divididos en tres grupos diferentes con cuatro animales cada uno y se les proporcionó una dosis de 10mg/kg (grupo A), 15mg/kg (grupo B) y 20mg/kg (grupo C) de peso vivo en el alimento, durante 35 días consecutivos, recibiendo además una dieta a base de sorgo-soya (3.5 Kg) en harina, que cubrió las necesidades establecidas por el NRC (1998).

Los sementales se trabajaron una vez por semana. El semen obtenido se evaluó durante cinco semanas previas a la administración del tratamiento, durante los 35 días de administración del tratamiento y las cinco semanas posteriores a la inclusión del ácido lipoico en el alimento.



## 2.2 Colecta de semen:

Para la obtención del semen se empleó la técnica de mano enguantada (1), utilizando un guante de polietileno y otro de vinil, ambos desechables. El guante de polietileno se utilizó para realizar el lavado de la región ventral y pélvica del verraco y la limpieza del divertículo prepucial, esto, con el objeto de eliminar restos de orina; así también, con la ayuda de unas tijeras curvas, se realizó el recorte de pelos prepuciales para evitar contaminación de la muestra. Una vez eliminado este guante se usó el de vinil con el cual se llevó a cabo la colecta de la fracción espermática y post-espermática. Estas fracciones, se depositaron en un termo colector (IMV ®) con una bolsa de agua a 37°C, a dicho termo se le colocaron tres filtros para evitar el paso de la porción gelosa (tapioca) y contaminantes (Fig. 4).



Figura 4. Colección de semen.

## 2.3 Evaluación del semen.

Una vez obtenido el eyaculado, se retiraron los filtros del termo colector, y el semen fue trasladado al laboratorio de evaluación dentro del mismo termo para

mantener su temperatura. El laboratorio de evaluación se ubica a un costado del área de colección y existe comunicación directa entre ambas áreas a través de un cancel.

### **2.3.1 Características Macroscópicas.**

**Color.-** Se observó la tonalidad y consistencia del eyaculado. El color normal de un eyaculado es blanco, de acuoso transparente a cremoso amarillento, según la concentración espermática presente.

**Olor.-** El semen debe ser inodoro, cualquier olor representa una alteración.

**Volumen.-** Esta característica se midió con una báscula digital, realizando la conversión de un gramo equivalente a un mililitro (ml).

**pH.-** Para la evaluación de esta característica se utilizaron tiras reactivas con un rango de 0 a 14 (MERCK®).

**Temperatura.-** Se tomó la temperatura con un termómetro de vidrio (-20 a +110°C) (Brannan ®).

### **2.3.2 Características Microscópicas.**

**Motilidad y Vigor.-** Para observar la motilidad general de los espermatozoides (en masa), se colocó una gota de semen fresco sobre un portaobjetos de vidrio Lauka®, sobre ella un cubreobjetos (ambos atemperados a 37 °C) y se observó a través de un microscopio óptico Karl Zeiss® con el objetivo 10x (seco débil). Posteriormente con el

objetivo 40x (seco fuerte), se determinó el movimiento individual (Vigor) otorgando un valor de acuerdo al movimiento, desde cero (sin movimiento) a 5 (movimiento progresivo absoluto y rápido).

**Concentración.-** Para evaluar ésta característica se empleó la cámara de Bürker. Se realizó una dilución de semen fresco de 1:100 en una solución de citrato formol, de esta dilución se tomó con una pipeta de transferencia de plástico (Pirex®) una gota y se depositó en el retículo de la cámara. El conteo se realizó en un microscopio óptico con el objetivo de 40x, solamente se contaron los espermatozoides que se encontraron dentro de 40 cuadros y que no presentaran alguna anomalía (1).

**Anormalidades.-** Esta evaluación se realizó por medio de un frotis teñido con Azul de Coomassie (10). El procedimiento consistió en tomar una gota de semen fresco con una pipeta de transferencia (Pirex®), se colocó en un extremo de una laminilla de vidrio atemperada a 37°C y con otra laminilla, deslizando la gota, se realizó de esta manera un frotis, y se dejó secar al aire. Una vez seco el frotis fue sumergido en la tinción de Azul de Coomassie (Sigma-Aldrich®) durante dos minutos, pasado este tiempo, se colocó en un vaso de precipitado de vidrio de 100 ml con agua bidestilada durante cinco minutos para retirar el exceso de tinción y se dejó secar nuevamente al aire.

Para fijar las muestras teñidas con Azul de Coomassie se les colocó una gota de resina a base de Xilol sobre la superficie a observar y finalmente un cubreobjetos de vidrio 22 X 50 mm evaluando 100 espermatozoides en el microscopio óptico con el objetivo 100x usando para esto aceite de inmersión (Merck®).

## **Método de evaluación de la integridad de membrana espermática y daño acrosomal (Prueba de Ensanchamiento Hip-osmótico Corto)**

Se preparó una solución hipoosmótica (9), la cual consiste en agregar un ml de diluyente, MR-A, Kubus ® que es el mismo diluyente con el que se prepararon las dosis para su uso en granja, a un tubo de ensaye de vidrio de 10 ml, mas tres ml de agua bidestilada, homogenizando correctamente, de esta solución se obtuvieron dos ml que se colocaron en otro tubo, a este último se le agregaron 100 µl de semen fresco, incubando a 37°C durante tres minutos, pasado este tiempo se tomó una gota de la nueva solución, realizando el frotis, tinción y fijación antes mencionados para la evaluación de las anormalidades.

Finalmente se observó al microscopio óptico (Kart Zeiss®) con el objetivo de 100x. Se evaluaron 100 células para obtener el porcentaje de células positivas y negativas a HOST y daño acrosomal,

### **2.4 Análisis Estadístico.**

Se realizó un diseño de factores anidados para todas las variables, determinándose el efecto de los tratamientos sobre las variables a través de un ANDEVA y por una prueba de Tukey se determinó la diferencia entre medias, empleando para ello el método de modelos lineales generalizados del paquete estadístico JMP (31).

### 3. RESULTADOS.

#### 3.1 Variables Macroscópicas del semen.

Para las variables: temperatura, pH, color y olor de cada tratamiento no se observó ninguna diferencia al momento de ser evaluadas en el laboratorio. ( $p < 0.05$ )

##### 3.1.1 Volumen.

Se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento C (20 mg/Kg.), donde el volumen promedio del grupo aumentó, de 189 ml a 247 ml de eyaculado, al finalizar la prueba. Sin embargo en el tratamiento A (10 mg/Kg) se observó un aumento conforme transcurrieron las etapas de estudio, y aunque no existió una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ), después de la aplicación del AL, el volumen de semen colectado promedio fue de 225 ml, encontrándose una diferencia de 36 ml (Cuadro 1)

**Cuadro 1. Efecto del ácido lipoico sobre la variable volumen.**

Tratamiento/Etapa	Control (ml) 35 días Antes	Durante (ml) 35 días	Después (ml) 35 días
A. 10 mg / Kg.	189.25 <sup>a1</sup>	214.7 <sup>a1</sup>	225.7 <sup>a1</sup>
B. 15 mg / Kg.	189.25 <sup>a1</sup>	253.8 <sup>b2</sup>	166.26 <sup>a1</sup>
C. 20 mg / Kg.	189.25 <sup>a1</sup>	227.35 <sup>a1</sup>	247.6 <sup>b1</sup>

Nota: Diferentes literales indican diferencia estadística significativa entre tratamiento, diferentes números indican diferencia estadística entre etapa ( $P < 0.05$ ).

## 3.2 Variables Microscópicas del semen.

### 3.2.1 Vigor.

En cuanto a la calidad de movimiento se encontró una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento C (20mg/Kg), comenzando con un valor promedio de 2.71 y concluyendo la prueba con un valor de 1.75. Para los tratamientos A y B, el vigor aumentó en promedio de 2.71 a 2.97 y 2.93 respectivamente, valores que en este caso no representó diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Efecto del Ácido lipoico sobre la variable Vigor.**

Tratamiento/Etapa	Control (Antes)	Durante	Después
A. 10 mg / Kg.	2.716 <sup>a1</sup>	2.85 <sup>a1</sup>	2.9 <sup>a1</sup>
B. 15 mg / Kg.	2.716 <sup>a1</sup>	2.1 <sup>a1</sup>	2.933 <sup>a1</sup>
C. 20 mg / Kg.	2.716 <sup>a1</sup>	2.2 <sup>a1,3</sup>	1.75 <sup>b2,3</sup>

Nota: Diferentes literales indican diferencia estadística significativa entre tratamiento, diferentes números indican diferencia estadística significativa entre etapa.

### 3.2.2 Aglutinación.

Para la variable Aglutinación se observó una diferencia ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento B (15 mg/kg) en comparación con los tratamientos A y C, siendo el tratamiento mencionado donde se observó una mayor aglutinación (1.9) que en el caso de los otros dos (1.15 y 1.35 respectivamente) durante la etapa de adición del ácido lipoico. En el caso del tratamiento A, el valor promedio obtenido al final del trabajo fue menor que los valores “control”. Cabe mencionar que existió un ligero cambio en el tratamiento C al final de la prueba, pero en este caso el valor de aglutinación obtenido fue mayor (1.7) al control (1.58). Sin embargo, ésta diferencia no fue estadísticamente significativa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto del ácido lipoico sobre la variable Aglutinación.

Tratamiento/Etapa	Control (Antes)	Durante	Después
10 mg / Kg.	1.583 <sup>a1</sup>	1.15 <sup>a1</sup>	1.1 <sup>a1</sup>
15 mg / Kg.	1.583 <sup>a1</sup>	1.9 <sup>a2</sup>	1.2 <sup>a1</sup>
20 mg / Kg.	1.583 <sup>a1</sup>	1.35 <sup>a1</sup>	1.7 <sup>a1</sup>

Nota: Diferentes literales indican diferencia estadística significativa entre tratamiento, diferentes números indican diferencia estadística significativa entre etapa.

### 3.2.3 Concentración.

Para la variable Concentración, existió una disminución considerable y se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para el tratamiento C (20 mg/Kg), partiendo de que el grupo control mostró una concentración promedio de  $40.38 \times 10^6$  espermatozoides / ml al inicio de la prueba y concluyó la misma con una concentración de  $17.05 \times 10^6$  espermatozoides/ml. En el tratamiento B se observó aumento en la concentración de 40.383 a  $51.4 \times 10^6$  espermatozoides por ml al final del estudio y el tratamiento A concluyó con  $41.7 \times 10^6$  espermatozoides/ml. (Cuadro 4)

**Cuadro 4. Efecto del ácido lipoico sobre la variable Concentración ( $\times 10^6$ /ml.).**

Tratamiento/Etapa	Control (Antes)	Durante	Después
A. 10 mg / Kg.	40.383 <sup>a 1</sup>	38.9 <sup>a 1</sup>	41.7 <sup>a 1</sup>
B. 15 mg / Kg.	40.383 <sup>a 1</sup>	48 <sup>a 1</sup>	51.4 <sup>a 1</sup>
C. 20 mg / Kg.	40.383 <sup>a 1</sup>	35.2 <sup>a 1</sup>	17.05 <sup>b 2</sup>

Nota: Diferentes literales indican diferencia estadística significativa entre tratamientos, diferentes números indican diferencia estadística significativa entre etapas.



### 3.2.4 Malformaciones.

Dentro del tratamiento C, el valor (19.38%) del grupo control fue estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) al valor de la etapa correspondiente a la aplicación del ácido lipoico (25%), y que a su vez es estadísticamente diferente ( $P < 0.05$ ) a la etapa posterior a la aplicación del ácido lipoico (37.8). Al evaluar las diferencias entre tratamientos para esta misma variable, se denota una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) para el tratamiento C con un valor de 37.8% contra 12.5% del tratamiento A y 18.8% para el tratamiento B. (Cuadro 5). El flagelo en látigo fue una malformación recurrente en la evaluación (Fig. 5), mientras que a la evaluación se encontraron pocos flagelos enredados (Fig. 6).



Figura 5. Flagelo en látigo.

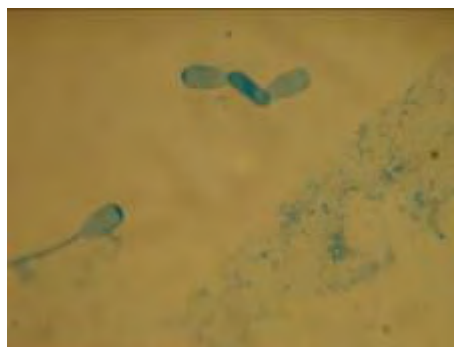


Figura 6. Flagelos espermáticos enredados.

**Cuadro 5. Efecto del Ácido lipoico sobre el porcentaje de malformaciones.**

Tratamiento/Etapa	Control (Antes) (%)	Durante (%)	Después (%)
A. 10 mg. / Kg.	19.38 <sup>a1</sup>	11.55 <sup>a1</sup>	12.25 <sup>a1</sup>
B. 15 mg. / Kg.	19.38 <sup>a1</sup>	19.30 <sup>a1</sup>	18.8 <sup>a1</sup>
C. 20 mg / Kg.	19.38 <sup>a1</sup>	25 <sup>a2</sup>	37.8 <sup>b3</sup>

Variables diferentes indican diferencia estadística significativa entre tratamientos, diferentes números indican diferencia estadística significativa entre etapas.

### 3.2.5 Integridad de Membrana.

En cuanto a la Integridad de Membrana evaluada mediante la prueba de HOST corto, existió diferencia estadística ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento B con relación a los tratamientos A y C en la etapa de aplicación del antioxidante; siendo de 49% en el tratamiento B, 35% para el tratamiento A y 33% para el tratamiento C. Al evaluar las diferencias por cada tratamiento, se observó diferencia significativa en el grupo control (antes de la aplicación) con respecto a las dos etapas posteriores (Cuadro 6). La reacción positiva a Host se observó el plegamiento del flagelo (figuras 7 y 8)

Cuadro 6. Efecto del ácido lipoico sobre la integridad de membrana espermática.

Tratamiento/Etapa	Control (Antes) (%)	Durante (%)	Después (%)
A. 10 mg. / Kg.	46.1 <sup>a1</sup>	35.3 <sup>b2</sup>	46.9 <sup>a1</sup>
B. 15 mg. / Kg.	46.1 <sup>a1</sup>	49.2 <sup>a3</sup>	35.3 <sup>b1</sup>
C. 20 mg / Kg.	46.1 <sup>a1</sup>	33.2 <sup>b2</sup>	32.1 <sup>b2</sup>

Nota: Diferentes variables literales indican diferencia estadística significativa entre tratamientos, diferentes números indican diferencia estadística entre etapas.

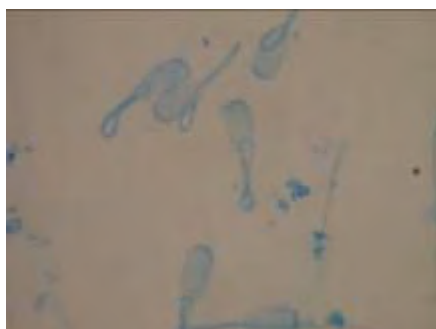


Fig. 7. Reacción positiva a prueba de Host. El flagelo se pliega sobre la cabeza espermática.



Fig. 8. Reacción negativa a prueba de Host.

En las variables **Motilidad** e **Integridad de acrosoma** no se encontraron diferencias estadística significativa (Cuadros 7 y 8).

Cuadro 7. Efecto del ácido lipoico sobre la motilidad espermática.

<b>Tratamiento/Etapa.</b>	<b>Control (%) (Antes)</b>	<b>Durante (%)</b>	<b>Después (%)</b>
<b>A. 10 mg/kg.</b>	84.8	85.5	85.2
<b>B. 15 mg/kg.</b>	84.8	77	84
<b>C. 20 mg/kg.</b>	84.8	84	72.7

Cuadro 8. Efecto del Ácido lipoico sobre la integridad del acrosoma.

<b>Tratamiento/Etapa.</b>	<b>Control (%) (Antes)</b>	<b>Durante (%).</b>	<b>Después (%).</b>
<b>A. 10 mg/kg.</b>	80.6	85	84.3
<b>B. 15 mg/kg.</b>	80.6	79.4	74.7
<b>C. 20 mg/kg.</b>	80.6	86.3	80.0



Figura 9. Espermatozoide con acrosoma íntegro (flecha).



Figura 10. Espermatozoide con acrosoma dañado (Flecha) Reacción acrosomal.

## **4. DISCUSIÓN.**

Desde que se comprobó el efecto benéfico de los antioxidantes sobre el organismo, estos han sido ampliamente utilizados en animales con diferentes fines; para favorecer su crecimiento o aumentar su calidad reproductiva, favoreciendo de ésta manera los índices de fertilidad y prolificidad (14).

Estas sustancias, de forma natural o al ser suplementadas en el alimento o aplicadas directamente al organismo de forma parenteral, participan en los mecanismos de defensa celular contra la acción oxidativa de los radicales libres, producidos por las reacciones metabólicas celulares inherentes en un organismo vivo.

Dadas las características celulares que los espermatozoides poseen, especialmente los espermatozoides porcinos, el empleo de los antioxidantes en sementales es cada vez más común, para obtener una mejor calidad seminal y por ende un mejor desempeño productivo de los verracos.

### **4.1 Volumen.**

En el presente estudio se muestra que el volumen de eyaculado colectado, durante la fase inicial (189.25 ml) antes de aplicar el tratamiento, se vió afectado de manera positiva con la dosis de 20 mg /Kg. de AL, en la etapa posterior a la aplicación (247.6 ml). Por otro lado, al adicionar 10 mg de AL /Kg. de peso vivo también mostró aumento del volumen eyaculado, aunque no significativo de forma estadística, en la última etapa del estudio, alcanzando 225.7 ml de semen. Estos resultados coinciden con

el efecto antioxidante de otras sustancias como la vitamina E y el Zinc, ya que ambos contribuyen a mantener un volumen seminal aceptable en machos, especialmente en el búfalo (14).

## **4.2 Movimiento espermático.**

### **4.2.1 Motilidad.**

Al adicionar el AL en la dieta, los resultados no mostraron diferencia estadística significativa, ya que prácticamente la motilidad al final del estudio fue similar a la observada al inicio, excepto con el tratamiento C (20mg/Kg.), en el cual, la motilidad inicial (antes de aplicar AL) fue de 84.85%, 84% durante la adición de AL y 72.7% después de haber aplicado el tratamiento, aunque sin existir diferencia estadística.

### **4.2.2 Vigor.**

Al analizar los resultados referentes a la dosis de AL de 20 mg/Kg., se produjo un efecto negativo sobre el vigor espermático, sin embargo con las dosis más bajas de AL la respuesta espermática en cuanto a la variable vigor, presentó resultados favorables y aceptables. Como sucede con otros antioxidantes como el selenio, en el cual una sobre-dosificación genera un proceso tóxico al organismo y con ello un efecto contrario al esperado, es posible que al adicionar una dosis de 20 mg de AL/Kg. se genere esta respuesta indeseable, no así a dosis más bajas como 15 o 10 mg/Kg. Stephanie, *et. al.*, (2003) mencionan que en humanos se han aplicado dosis de AL de 200 a 1,800 mg y en otros animales, como las ratas y perros, se puede aplicar AL a

dosís 1,130 y 502 mg/Kg. de peso vivo respectivamente, sin mostrar efectos adversos. El presente estudio mostró efectos adversos al adicionar AL a dosis de 20 mg/Kg. de peso corporal en la dieta de sementales porcinos.

#### **4.2.3 Aglutinación.**

Las vitaminas C y E son antioxidantes que mejoran la calidad seminal al ser adicionados en la dieta de sementales porcinos, y es muy probable que la interacción que el AL tiene con estas dos vitaminas, se vea reflejado en una menor aglutinación, ya que la vitamina C disminuye la aglutinación al activar a la antiaglutinina en los espermatozoides (32), en este estudio, el grupo con 20 mg de AL/Kg. de PV, mostró más aglutinación espermática en comparación con los grupos A y B.

#### **4.3 Concentración.**

Se observó una diferencia estadística con el tratamiento C donde la concentración disminuyó de  $40.38 \times 10^6$  espermatozoides/ml en la etapa control, a  $17.05 \times 10^6$  al final del trabajo, resulta interesante dicho resultado ya que el tratamiento y la etapa de aplicación coinciden con el volumen más alto de semen obtenido para éste estudio (247.6 ml). También se observó un efecto negativo sobre las características del semen, al aplicar la dosis alta de AL.

Los resultados señalados anteriormente, muestran el comportamiento del AL como cualquier otro antioxidante, esto es, al ser aplicado a la dosis necesaria, se observan efectos positivos, sobre las características seminales en estudio. Al igual que

otros antioxidantes como el Zinc (14), la vitamina E (14, 16), vitamina C (17) y selenio (14, 17), el AL, al ser adicionado a dosis altas, los resultados disminuyeron para las mismas características seminales y con ello, la calidad del semen. En este sentido, Hill *et. al.*, (2004) mencionan que el AL puede ser tolerado a dosis orales de 120, 126 y 635 mg/Kg. de PV por humanos, perros y ratas respectivamente, no así en gatos, a los cuales se les adicionó una dosis de 60 mg/Kg. vía oral, con la que se presentaron signos asociados a toxicidad clínica aguda (33).

#### **4.4 Malformaciones.**

En esta variable se observa un efecto negativo a una dosis alta de AL (20 mg/Kg. de peso), al observarse que las malformaciones aumentaron considerablemente (18.42%) a esta dosis, contrario a lo que sucedió con los tratamientos A (10 mg/Kg.) y B (15 mg/Kg.). Esto coincide con Mary G *et. al.*, (2004) quienes mencionan el efecto antioxidante que la vitamina E y el Zinc poseen al mejorar la morfología espermática (16). De igual forma Espinosa y cols., (2003) mencionan que al suplementar selenio de 0.25 a 0.30 ppm, se mejora la calidad seminal, al aumentar la motilidad y morfología celular, en el semen del verraco (34).

#### **4.5 Integridad de Membrana.**

Los espermatozoides porcinos son especialmente susceptibles al daño oxidativo de los radicales libres, por la gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que estructuran parte de los fosfolípidos de membrana, y también a su baja capacidad antioxidante, dado por el poco citoplasma que poseen dichas células (12, 34). Por tanto,

la integridad de la membrana es un parámetro importante para conocer la capacidad fertilizante del semen. En esta investigación, se observó un porcentaje similar en la etapa posterior a la aplicación del antioxidante en relación a la etapa control (46.1% y 46.9% respectivamente) para el tratamiento A. Por el contrario, existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) para el tratamiento C, al disminuir este porcentaje de 46.1% a 32% al final del estudio.

Peña *et. al.*, (2003) mencionan un efecto protector de la Vitamina E sobre la membrana celular espermática en semen diluido. De la misma forma Breininger *et. al.*, (2005) demostraron aumento de la integridad de la membrana espermática de semen porcino congelado, al adicionar Vitamina E *in vitro* (12, 14).



## **5. CONCLUSIONES.**

1. De acuerdo a las condiciones en las que se realizó este estudio, se comprueba de forma evidente que el ácido lipoico tiene un efecto sobre el eyaculado de sementales porcinos y que dependiendo de la dosis aplicada, diferentes características serán afectadas, ya sea de forma positiva o negativa.

2. Se observó que los sementales suplementados con dosis orales de 20 mg/Kg. de peso corporal, disminuyeron su calidad seminal, toda vez que disminuyó el movimiento espermático individual, la concentración espermática y el porcentaje de integridad de membrana, al mismo tiempo aumentó la aglutinación espermática y el porcentaje de malformaciones.

3. De acuerdo a los datos obtenidos en el presente trabajo, la dosis con la que el semen mostró las mejores características en evaluación y por lo tanto es la más adecuada para ser adicionada a la dieta de sementales porcinos, corresponde a 10 mg/Kg.

## **6. LITERATURA CITADA.**

- 1.- Trujillo M E, Martínez G R, Herradora L. M. A.: La piara reproductiva. 1° Ed. México: Ediciones Mundi-Prensa. 2002. Capítulos 14 y 15, págs.: 147-153, 165-170.
- 2.- Hafez E S E and Hafez B.: Reproducción e inseminación artificial en animales. 7° Ed. USA. Mc Graw-Hill. 2002. Capítulo 7, págs.: 98-112.
- 3.- Gerrits R. J., Lunney J. K., Johnson L. A., Pursel V. G., Kraeling R. R., Rohrer G. A. and Dobrinsky J. R.: Perspectives for artificial insemination and genomics to improve global swine populations. *Theriogenology*, 63: 283-299 (2005).
- 4.- Vázquez J.M., Martínez E.A., Roca J., Gil M.A., Parrilla I., Cuello C., Carvajal G., Lucas X. and Vázquez J.L.: Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*, 63: 536-547 (2005).
- 5.- Gordon I.: Reproducción controlada del cerdo. 1° Ed. España: Ed. Acribia. 2000. Págs.: 27-37.
- 6.- Neill, J.D.: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Vol 1. 3° Ed. Estados Unidos. Academic Press. 2006. Capítulo 1, págs.: 3-38.
- 7.- Fuentes, A., G. Lago de S., A. Chang, G. Semidey de S., C. Regueiro y L. Soler. Pubertad en machos porcinos y biometría testicular. *Zootecnia Trop.*, 13(2): 151-162 (1995).

- 8.- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Pérez-Peláez M., Crabo B.G. and Zaneveld L.J.D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.*, 70: 219-228 (1984).
- 9.- Correa J.R. and Zabos P.M.: The Hypoosmotic swelling test: its employments as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42: 351-360 (1994).
- 10.- Larson J.L. and Miller D.J.: Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.*, 52: 445-449 (1999).
- 11.- Fujii J., Iuchi Y. and Okada F.: Fundamental roles of the reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. *Reprod. Biol. Endoc.* 3: 43-53 (2005).
- 12.- Breininger E., Beorlegui N.B., O'Flaherty C.M. and Beconi M.T.: Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*, 63: 2126-2135 (2005).
- 13.- Cerolini S., Maldjian A., Surai P. and Noble R.: Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim. Rep. Sci.*, 58: 90-111 (2000).

- 14.- Peña F.J., Johannisson A., Wallgren M. and Rodríguez H.: Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Rep. Sci.*, 78: 85-98 (2003).
- 15.- Murray R.K., Mayers P.A., Granner D.K. and Rodwell V.W.: *Bioquímica de Harper*. 15<sup>ava</sup> Ed. México: Manual Moderno. 2001. Capítulo 13, págs.: 153-159.
- 16.- Abdel-Malak M.G.: The importance of Zinc and Vitamin E in buffalo seminal plasma. *Assiut Vet. Med. J.*, 50: 386-398 (2004).
- 17.- Sönmez M., Türk G. and Yüce A.: The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, 63: 2063-2072 (2005).
- 18.- Lasota B., Blaszczyk B., Seremak B. and Udała J.: Selenium status and GSH-Px activity in semen and blood of boars at different ages used for artificial insemination. *Reprod. Dom. Anim.*, 39: 309-314 (2004).
- 19.- Kirchgessner M., Hartmann S. and Eder K.: The effect of Selenium deficiency on the fatty-acid composition of various tissues and the osmotic fragility of erythrocytes in the growing pig. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.*, 73: 77-85 (1995).

20.- Mahan D.C. and Peters J.C.: Long-term of dietary organic and inorganic selenium sources and levels of reproducing sows and their progeny. J. Anim. Sci., 82: 1343-1358 (2004).

21.- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C.: Free Radical in Biology and Medicine. New York Oxford University. 1999. Págs.: 223-225.

22.- Ramírez M.G.: Efecto del ácido lipoico en indicadores productivos y del estrés oxidativo en el pollo de engorda. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 2003. Págs.: 18-26.

23.- Serret M.: Efecto del ácido lipoico sobre algunos indicadores del estrés oxidativo en pollos de engorda. Tesis de maestría. Fac. de Med. Vet y Zoot., Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 2003. Págs.: 19-31.

24.- Reed L. J.: From lipoic acid to multi-enzyme complex. Prot. Sci. 7: 220-224 (1998) Available in <http://www.proteinscience.org>. Consultado el 27 de Abril de 2008.

25.- Williams C. A., Hoffman R.M., Kronfeld D.S., Hess T.M., Saber K.E. and Harris P.A.: Lipoic acid as antioxidant in mature thoroughbreds geldings: A preliminary study. Waltham International Symposium: Pet Nutrition Coming of age. 2002. Págs.: 1628S-1631S.

26.- Stephanie D., Wolling and Peter J.H. Jones.:  $\alpha$ -lipoic acid and cardiovascular disease. Recents Adv. Nut. Sci. 3327-3330 (2003).

- 27.- Terjesen B.F., Park K., Tesser M.B., Prtella M.C., Zhang Y, and Dabrowski K.: Lipoic acid and ascorbic acid affect plasma free aminoacids selectively in the Teleost Fish Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Biochem. Mol. Actions Nut.* 2930-2934 (2004).
- 28.- Tritschler H.J., Lester Packer, Eric H.: Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. 1994 Oct-Dic. Available on line 14 January 2000. Available from: URL: <http://www.Sciencedirect.com/science?> Consultado el 17 de Mayo de 2006.
- 29.- Henriksen E. J.: Stimulation by alpha lipoic acid of glucose transport activity in skeletal muscle of lean and obese Zucker rats. *Life Sci.* 61: (8) 805-812 (1997).
- 30.- Bravo. A.A.: Efecto de la exposición a la fracción líquida de residuos de granja obtenidos a partir de un tratamiento físico-químico (Filtración y Cloración) sobre la salud de los cerdos destetados. Tesis de Licenciatura. Fac de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México 2006.
- 31.- JMP. SAS/STAT User Guide. 4th edition. SAS Inst. Inc.: Cary NC, 2000.
- 32.-Kubus SA de CV.: Boletín Técnico, Aglutinación espermática. Disponible en [http://www.kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero24\\_3.pdf](http://www.kubus-sa.com/esp/04/archivos/fichero24_3.pdf). Consultado el 6 de Mayo de 2008.
- 33.- Hill A.S., Werner J.A., Rogers Q.R., Neill S.L.O. and Christopher M.M.: Lipoic Acid is 10 times more toxic in cats than reported in human, dogs or rats. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 88: 150-156 (2004).

34.- Ramírez G, Espinosa S, Nava C. Efecto de los Radicales Libres sobre los Espermatozoides del Cerdo. Los Porcicultores y su entorno. 2003; 35; 17-19.