



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD  
ANIMAL**

**“EFECTO DEL ÁCIDO ÚRICO, TIRÓN Y EL DIPIRIDILO, EN LAS  
CÉLULAS ESPERMÁTICAS DURANTE EL CHOQUE FRÍO, DEL  
CERDO PELÓN MEXICANO Y DE CERDOS DE RAZAS  
MEJORADAS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

EUNICE ELIZABETH RAMÍREZ ACOSTA

TUTOR:  
NAZARIO PESCADOR SALAS

COMITÉ TUTORAL:

DANILO RUBEN MENDEZ MEDINA  
ALBERTO GUZMAN GRENFFEL

México D.F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

Revisión de Literatura  
Planteamiento del Problema  
Objetivos Particulares  
Diseño Experimental  
Resultados  
Conclusiones  
Bibliografía

# **“EFECTO DEL ÁCIDO ÚRICO, TIRÓN Y EL DIPIRIDILO, EN LAS CÉLULAS ESPERMÁTICAS DURANTE EL CHOQUE FRÍO, DEL CERDO PELÓN MEXICANO Y DE CERDOS DE RAZAS MEJORADAS”**

## **I REVISIÓN DE LITETRATURA**

### **1.- Antecedentes del Cerdo Pelón Mexicano**

La porcicultura es una actividad que históricamente ha estado arraigada a las zonas rurales de México, constituyendo por un lado una fuente de ingreso y por otro en un excelente aporte de proteína de origen animal. Sin embargo, los cambios experimentados en la porcinocultura mexicana en los últimos 25 años han transformado básicamente al pequeño y mediano productor, en un nuevo porcicultor empresarial dependiente de las industrias productoras de alimento. Los cambios también han llegado en los aspectos genéticos, modificándose paulatinamente las razas autóctonas por las llamadas razas modernas.

En México todavía hay muchas zonas, donde es común la porcicultura de traspatio, con la utilización de los llamados cerdos "criollos" o híbridos. Esto ha ido cambiando con la introducción de algunas poblaciones de machos Duroc o Hampshire principalmente. Mas recientemente se ha popularizado el uso de la inseminación artificial, con la cual también se ha introducido línea materna, utilizando razas blancas, por lo tanto se ha venido reemplazando paulatinamente los genotipos locales.

No obstante en algunas regiones costeras persisten aun los cerdos criollos, o bien razas muy antiguas como el cuino o el Pelón Mexicano. El estudio de estos genotipos es indispensable para conocer las ventajas que puede representar su utilización en programas de cruzamiento. El rendimiento de estos animales puede ser de 5 a 10 lechones nacidos vivos por hembra y de 1 a 1.5 partos por año.

Esto obviamente es inferior a lo obtenido en explotaciones modernas, pero es absurdo la comparación pues la finalidad es diferente así como el modo y el costo de producción.

Los cerdos Pelón Mexicano se orientan hacia la producción de grasa, no por su conformación, sino por la alimentación casi exclusiva de maíz a que se les somete en su engorda (Rojas, 1994). Son animales de gran rusticidad, adaptados perfectamente a las condiciones del medio ambiente en que viven, son buenos medradores y aprovechan gran cantidad de plantas forrajeras, raíces, tubérculos, insectos y otras alimañas. (Flores, 1976). Su nombre deriva de la carencia completa de cerdas en la superficie corporal y se caracteriza por tener la piel de color gris pizarra y rugosa. Las hembras se consideran relativamente prolíficas, teniendo camadas de 8-10 lechones al parto y con un buen instinto maternal, destetando a casi todos los lechones que pare (Rojas, 1994).

Por otra parte, el treinta por ciento de todas las razas de animales domésticos en el mundo se encuentran en peligro de extinción, sobre todo las razas locales que se explotan de manera tradicional en las zonas rurales. México esta considerado como un país megadiverso, no obstante, presenta la amenaza de perder cada día su riqueza biológica. Ante esta situación se debe sensibilizar de la necesidad urgente de conservar su patrimonio genético local como alternativa de futuro ligado a su propio desarrollo (Vázquez, 2000).

Actualmente, alrededor del 30% de todos los recursos genéticos de animales domésticos del mundo fueron categorizados con un alto riesgo de extinción. Por su parte, el Cerdo Pelón Mexicano, también fue reportado en peligro por la FAO (DAD-IS, 1997) (Loftus and Schertf, 1993).

La aplicación de la técnica de criopreservación espermática podría ayudar a la conservación del material genético durante largos periodos de tiempo.

Estos cerdos indígenas mexicanos descienden de cerdos tipo ibérico, céltico y napolitano, y fueron traídos a México después de la conquista, provenientes de Cuba, mezclándose entre sí, junto con cerdos de tipo Asiático (*Sus vittatus*), estos animales, fueron llevados a México por su fácil transportación y alimentación, distribuyéndose por todo el territorio, principalmente por las regiones costeras del sur de México. Actualmente estos cerdos se localizan en Veracruz, Puebla, Tabasco, Campeche, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (López y col., 1999).

La cabeza es alargada con un perfil subcóncavo, la línea fronto nasal es ligeramente curva en el punto de unión de la cara y cráneo, su trompa es larga y estrecha. Los ojos son grandes y vivaces, sus orejas son largas (Baldizón, 1971), dirigidas hacia adelante y hacia abajo tapando ligeramente los ojos (Rojas, 1994). El cuello es corto y grueso, bien implantado al tronco, su pecho es angosto, tórax amplio, la línea dorso lumbar casi recta y un abdomen caído de gran capacidad. Tiene la grupa un poco caída, miembros aplomados, largos y fuertes (Baldizón, 1971). El tren posterior es más alto que el anterior (Cenobio, 1993), y alcanza un peso aproximado a 80 kg. a los 9 meses de edad (Baldizón, 1971). El jamón es pequeño y descarnado, costillas poco arqueadas y la cola, de unos 15 a 20 cm de largo, está bien implantada, es larga y dirigida hacia abajo (Flores, 1976).

## **2.- ESPERMATOZOIDES**

Los pioneros en la inseminación Artificial (IA) en cerdos fueron Ito (1948) y Polge (1956), desde entonces se ha empleado cada vez más. En la actualidad el semen del verraco que es usado para la IA, es almacenado a una temperatura de 16-19 °C adicionándole un diluyente. El éxito de la selección de suplementos adicionados al semen ha sido muy estudiada. Sin embargo, los diluyentes no pueden prevenir totalmente los cambios que sufren los espermatozoides ya que

esto ocurre muy rápidamente, como resultados de tales cambios estructurales y bioquímicos existe una reducción significativa en la capacidad de fertilización y una baja eficiencia de la inseminación artificial. Una concentración mayor por dosis, se ha estado utilizando pero esto no compensa la capacidad reducida de la fertilización.

Aunque la refrigeración es el método de almacenamiento más utilizado, para la preservación del semen de verraco solo se mantiene viable por algunos días. Sin embargo la criopreservación es una técnica valiosa, especialmente para la conservación de recursos genéticos, a través de los bancos de espermatozoides, o como una fuente comercial (Cerolini, S., et al., 2001).

## **2.1. SEMEN.**

El semen es una mezcla de células contenidas dentro del plasma seminal el cual es una secreción que consiste en una combinación de productos diversos sintetizados a lo largo de la zona genital del verraco incluyendo los tubulos seminíferos y las glándulas accesorias. El semen incluyen a los espermatozoides maduros y no maduros y células en diversas etapas del proceso de la espermatogénesis, leucocitos y otros tipos de células. (Garrido, N. et al., 2004).

## **2.2. LA MEMBRANA PLASMÁTICA DEL ESPERMATOZOIDE**

La membrana plasmática y el acrosoma influyen en la forma de la célula espermática, en la motilidad, la producción de energía, la permeabilidad, la capacitación y la reacción acrosomal (RA), y por consiguiente en la interacción con los ovocitos. La integridad estructural y funcional de la membrana plasmática es muy importante para las células espermáticas (He, L., et al., 2001).

Cuando los espermatozoides son conservados con la técnica de criopreservación, se ha estudiado que los efectos del choque frío pueden estar relacionados con la composición de los lípidos de la bicapa de la membrana plasmática, que afectan la fluidez de esta. Pues a bajas temperaturas la restricción del movimiento lateral de los fosfolípidos de la membrana podría dar lugar a una transición del estado líquido de la membrana a una especie de gel, por esta razón la respuesta de la membrana a bajas temperaturas esta relacionada fuertemente con su composición.(Jonson, L.A, et al., 2000).

Las diferencias observadas en los procesos de conservación del semen, entre los espermatozoides del toro y las células espermáticas del verraco en las que interviene el un proceso donde se baja la temperatura de estas células se ha observado una mayor sensibilidad en los espermatozoides del verraco y esto se puede explicar por las diferencias en la composición de sus la membrana. La composición de los ácidos grasos que constituyen a los fosfolípidos son diferentes entre las dos especies existiendo un porcentaje más bajo de fosfatidilcolina y un porcentaje mayor del fosfatidiletanolamina y de esfingomiolina en el verraco, esto hace difícil la estabilidad de la membrana (Jonson, L.A, et al., 2000). Una de las características de las membranas es que todas tienen una disposición asimétrica por los lípidos que forman la bicapa. Por otro lado, la composición de los lípidos de la membrana plasmática de los espermatozoides es diferente a las de las células somáticas. Tienen mayor contenido de ácidos grasos insaturados en sus fosfolípidos, por lo tanto son inducibles al daño producido por Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Los lípidos son los principales responsables de la fluidez de la bicapa, y de los cambios en la composición de la membrana plasmática de las células espermáticas, que se llevan acabo durante su maduración en el epidídimo y de su capacitación en la zona reproductiva en la hembra. Las células espermáticas experimentan cambios en el contenido de los lípidos durante su paso a través del epidídimo. Como consecuencia de estos cambios los



plasmalógenos se convierten en fosfolípidos importantes de la membrana (Sanocka, et al., 2004).

Todos los lípidos establecidos en la membrana están implicados en la regulación y maduración del esperma, espermatogénesis, capacitación, reacción acrosomal y la eventual fusión de la membrana con la membrana del ovocito. Obviamente, la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana del esperma puede también alterar todas las funciones que ya se mencionaron (Garrido, N. et al., 2004).

Otro factor que influye en el comportamiento de las membranas es el colesterol. El cociente de colesterol/fosfolípidos en los espermatozoides del verraco es muy bajo comparado con otras especies. El colesterol está distribuido asimétricamente, este se presenta más en la parte interna de la bicapa. Esta combinación podría hacer que la monocapa interna fuera especialmente vulnerable al choque frío. La nueva organización de la membrana causada por el choque frío podría influir en su función. Esto incluye un aumento en la permeabilidad (salida de cationes y de enzimas), una reducción en la actividad enzimática, en los procesos de difusión que controlados por la membrana y cambios en los movimientos laterales. Esto causa la peroxidación de los lípidos, debido al contenido relativamente alto de ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de la membrana. (Jonson, L.A, et al., 2000).

Por esta razón, las células espermáticas del verraco parecen ser especialmente sensibles al daño de las especies reactivas de oxígeno, (debido al alto contenido de ácidos grasos no saturados de los fosfolípidos de sus membranas (Peña, F.J et al, 2003).

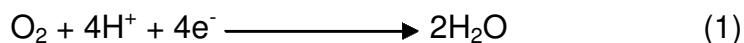
### **3. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ERO)**

Los radicales libres son los intermediarios químicos reactivos de breve duración, que contienen uno o más electrones no apareados. Son altamente reactivos y oxidan a los lípidos, aminoácidos y a los carbohidratos, también causan mutaciones al DNA. La formación patológica de las ERO en un organismo vivo puede ser causada por varios mecanismos como: La radiación ionización, las células inflamatorias, la liberación de metales de transición en las células como parte en la respiración mitocondrial, y activación de la enzima oxidasas (Garrido, N. et al., 2004).

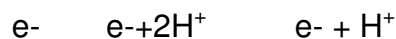
En los organismos o células con metabolismo aeróbico o aún parcialmente aeróbico, conduce a la producción de las ERO (Peña, F.J., et al., 2000; Yamada, J., et al., 2003).

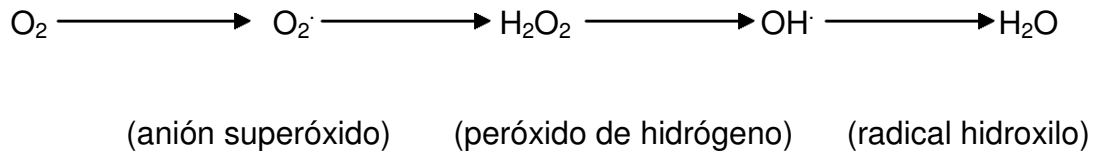
A pesar de que el oxígeno es indispensable para la vida aeróbica, es tóxico a altas concentraciones. Algunas evidencias de toxicidad del oxígeno son las siguientes: la respiración de O<sub>2</sub> al 100% es letal para la rata en menos de 72 horas; los seres humanos recién nacidos sometidos a oxigenoterapia prolongada sufren lesiones retinas y pulmonares; en los síndromes de isquemia/reperfusión (infarto de miocardio, choque circulatorio y trasplantes de órgano) el daño tisular se extiende y agrava precisamente durante la reperfusión (Khaper N., et al, 1997).

La mayor parte del oxígeno utilizado por los organismos aerobios es reducido a agua por la acción del complejo citocromo oxidasa (citocromo a3) de la cadena respiratoria mitocondrial, según la siguiente reacción global:



Esta reducción también puede llevarse a cabo en cuatro pasos univalentes:





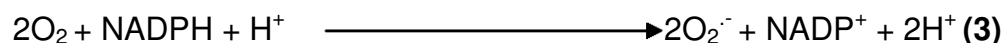
Estos intermediarios quedan unidos al sitio activo de la citocromo oxidasa y no se difunden al resto de la célula. Estos derivados del oxígeno o especies reactivas de oxígeno (ERO) se forman por la reducción incompleta del oxígeno molecular. Una de las exigencias de la aerobiosis es contar con una batería de moléculas y enzimas que atrapen o metabolicen las especies reactivas de oxígeno: anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) y singulete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ) (B.P., ET AL., 1994).

### 3.1. PRODUCCIÓN BIOLÓGICA DE LAS ERO

**3.1.A. Anión superóxido.** Cuando una molécula de oxígeno acepta un electrón, se convierte en un radical con carga negativa, o sea el anión superóxido.

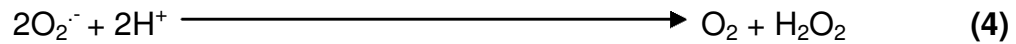
Una pequeña producción de  $\text{O}_2$  utilizado en la respiración mitocondrial, escapa como superóxido (1 a 2% del oxígeno consumido). Quizá la fuente más importante de radicales superóxido *in vivo* es la cadena respiratoria (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocitarias activadas por contacto con partículas extrañas. En la membrana citoplasmática de estas células se encuentran un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que cataliza la siguiente reacción:

#### NADPH oxidasa



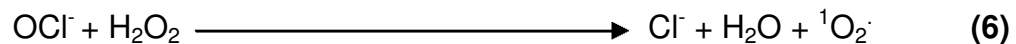
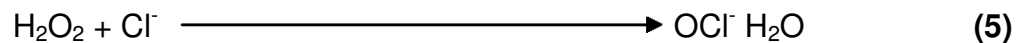
La enzima superóxido dismutasa en el citoplasma del fagocito, cataliza las siguientes reacciones:

### Superóxido dismutasa



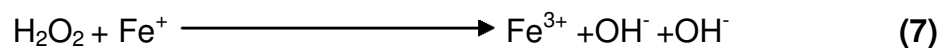
Las fagocitos contienen también una mieloperoxidasa, que utiliza el poder oxidativo del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para transformar los halogenuros, según las siguientes reacciones:

### Mieloperoxidasa



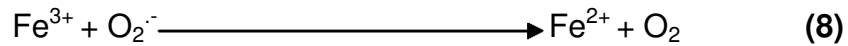
**3.1.B Radical hidroxilo.** Se forma al estar presente el radical anión superóxido y el peróxido de hidrógeno en un medio biológico que contiene hierro y otro metal. Es un oxidante en extremo reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos.

El peróxido de hidrógeno formado en la reacción 4, a pesar de no ser un radical, tiene una importancia vital, ya que en presencia de los metales de transición  $\text{Cu}^+$  o  $\text{Fe}^+$  da lugar a la reacción de Fenton:

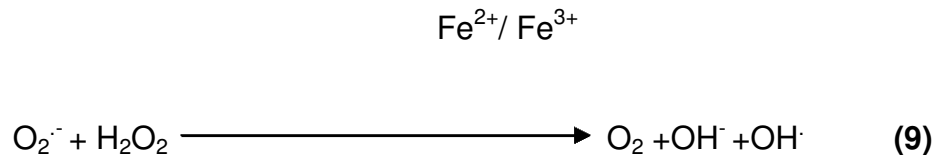


Con la producción del radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ).

Por otro lado, el anión superóxido aumenta la producción de  $\text{Fe}^{2+}$ , y por lo tanto, la reacción de Fenton, por medio de la siguiente reacción.



El conjunto de las reacciones descritas, o sea la dismutación del radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) que produce peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el cual a su vez, se descompone en el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) con intervención del  $\text{Fe}^{2+}$  y la regeneración de este último por medio del anión superóxido, constituyen el ciclo de Haber-Weiss (reacción 9).



La coexistencia del anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, en un medio biológico que inevitablemente contiene hierro, es muy peligrosa, ya que el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) formado, es un oxidante en extremo reactivo que interacciona con casi todas las moléculas que se encuentran en los organismos a velocidades que sólo son limitaciones por su difusión.

**3.1.C Singulete de oxígeno.** Como el singulete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ) no tiene electrones desapareados, no constituye realmente un radical libre de oxígeno, pero por su gran reactividad e intervención en muchas reacciones en las que participa el oxígeno molecular, por esta razón se incluye aquí. Se forma, sobre todo, cuando algunos pigmentos biológicos se iluminan en presencia de oxígeno, por ejemplo, clorofila, flavinas y porfirinas. Tiene una gran capacidad oxidante frente a muchas moléculas biológicas, sobre todo lípidos de las membranas (B.P., ET AL., 1994)..

## 4. DEFENSAS BIOLÓGICAS CONTRA LAS ERO

Estas defensas consisten primeramente en evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa, el cual reduce más del 90% del oxígeno en el organismo humano.

En segundo lugar están enzimas especializadas: Superóxido dismutasa (SOD), catalaza (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px)

### 4.1.A. Superóxido Dismutasa (SOD).

Las isoformas de SOD son metaloenzimas que catalizan la dismutación del ion superóxido para producir oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno según la reacción 4.

Se han identificado tres isoformas de SOD: la que contiene Cu y Zn (cuZnSOD) que se localiza principalmente en el citoplasma y en el espacio intermembranal en mitocondria, la SOD que contiene Mn (MnSOD) que se localiza principalmente en mitocondria y la isoforma homotetramérica extracelular (EC-SOD) (5) que contiene cuatro átomos de cobre y posiblemente 4 átomos de zinc, con un peso molecular de aproximadamente 135 kDa (cada subunidad pesa aproximadamente 30kDa), y se localiza en matriz intersticial y en fluidos intravasculares y extracelulares (Bannister, J.V., et al, 1987).

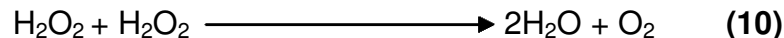
La SOD no es realmente una enzima detoxificante, ya que el producto de su actividad, el peróxido de hidrógeno, es un agente tóxico. Sin Embargo, la dismutación del ion superóxido es el primer paso de la cascada enzimática que

conduce a la inactivación completa del ion superóxido formado. El segundo paso, depende de la catalasa.

#### **4.2.B. Catalasa (CAT)**

Esta enzima antioxidante cataliza la transformación de peróxido de hidrógeno a agua. La CAT (EC1.11.1.6) es una hemoproteína homotetramérica de 240 kDa, con cuatro ferriprotoporfirinas por molécula (**Aebi H.E.,1982**). Su vida media en la circulación es de 6 a 8 minutos (Price, V.E., et al., 1962). En mamíferos esta enzima presente en altas concentraciones en hígado y riñón, y en bajos niveles en tejidos conectivos (Nakashima, H., et al., 1989). En las células se han localizado en el citosol, mitocondrias y organitos subcelulares como los peroxisomas (los peroxisomas son abundantes en las células epiteliales de túbulo proximal del riñón) y su reacción de catalizar es la siguiente:

#### **Catalaza**



#### **4.2.C Glutación Peroxidasa (GSH-Px).**

Las peroxidasas son otras enzimas que catalizan la reducción  $\text{H}_2\text{O}_2$  por diversos donadores de electrones. Se han identificado hasta cuatro tipos de GSH-Px (glutación:  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreductasa EC 1.11.1.9) dependiente de selenio: a) la citosólica (eGSH-Px), b) Plasmática (pGSH-Px). c) la gastrointestinal (glGSH-Px), y d) la de fosfolípidos (PLGSH-Px).

**4.2.C.1.** La cGSH-Px se descubrió en eritrocitos. Es una proteína tetramérica con cuatro subunidades idénticas (homotetrámero) y con un peso molecular de 84kDa. Se han estudiado en hígado de rata, el selenio (Se) en esta enzima está en forma de Se-Cys y es la porción catalítica de la glutación

peroxidasa (Forstrom, J.W., et al.,1978). La cGSH-Px tiene la función de almacenamiento del elemento traza y de antioxidante bajo condiciones donde hay relativamente grandes cantidades de  $H_2O_2$  o hidroperóxido de lípidos que son producidos en el citosol (Burk, R.F., et al., 1991).

**4.2.C.2.** La pGSH-PX o extracelular es distinta de cGSH-Px en estructura, sitio de función, especificidad por el sustrato y localización cromosomal. (Yoshimura, S., et al., 1994). Puede metabolizar peróxido de hidrógeno e hidroperóxido de ácidos grasos eficientemente pero metaboliza pobremente hidroperóxido de fosfolípidos e hidroperóxidos de colesterol y está presente en plasma y leche.

**4.2.C.3.** La gGSH-Px es un tetrámero de 75 kDa y se localiza en citosol. Puede metabolizar peróxido de hidrógeno e hidroperóxido de ácido graso eficientemente pero metaboliza pobremente hidroperóxidosde fosfolípidos e hidroperóxidos de colesterol.



**4.2.C.4.** La PHGSH-Px es diferente de las tres isoformas mencionadas anteriormente, ya que es un monómero de aproximadamente de 20-22kDa, tiene un mol de Se por monómero. Degradada hidroperóxidos de fosfolípidos y fosfatidilcolina hidroperóxido, los cuales no son sustratos para la GSH-Px citosólica (Sunde R.A., et al., 1990), además, es menos específica con respecto a GSH como su sustrato, y está estrechamente asociada a la cara interna de la membrana(Thomas, J.P., et al., 1990; Ursini, F. et al., 1985; and Maiorino, M., et al., 1991.). La actividad de PHGSH-Px se preserva en la deficiencia de Se en comparación con las otras isomorfias de glutatión peroxidasa. La distribución de PHGSH-Px en los tejidos es diferente, es abundante en los testículos y puede ser regulada por gonadotropinas (Roveri, A., et al., 1992). También tiene un sitio de fosforilación, el cual puede tener un papel en la regulación de la actividad de la enzima.

Las cuatro isoformas catalizan la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidada (GSSG), el cual, a su vez, es reducido por la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH, impidiendo así que se agoten las reservas de GSH.

### **4.3 OTRAS DEFENSAS CONTRA EL DAÑO OXIDATIVO**

Además de las enzimas mencionadas varios minerales como el selenio, zinc y cobre, o vitaminas como riboflavina, ácido ascórbico (vitamina C) y  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), son esenciales para la defensa contra el daño oxidativo (36,37) debido a que actúa como cofactores de las enzimas detoxificantes o como atrapadores endógenos.

## **5. ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO EN LA FISIOLÓGIA DEL ESPERMATOZOIDE**

Todas las células que viven en condiciones aerobias, como los espermatozoides producen especie reactiva del oxígeno (ERO), originado sobre todo por la actividad metabólica normal. Los espermatozoides generan el anión superóxido ( $O_2^-$ ) por lo cual de forma espontánea o enzimática se produce el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).

El  $O_2^-$  tiene una baja reactividad y corto periodo de "vida", sin embargo no es en mismo el más tóxico, ya que cuando reacciona con sus blancos puede producir especies reactivas más tóxicas, como son los radicales thioles ( $RS^\cdot$ ). Sin embargo el  $H_2O_2$  que es relativamente más estable tiene un potencial más alto oxidativo y puede cruzar libremente las membranas de la célula. Las concentraciones muy bajas de hierro presentes en casi cualquier solución es suficiente para catalizar la formación del radical del oxhidrilo ( $\cdot OH$ ) el cual se forma a partir de  $O_2$  y  $H_2O_2$ , estas ERO reacciona con cualquier componente de la célula.

Los espermatozoides y el plasma seminal contienen una gran cantidad de scavengers (limpiadores), de ERO, incluyendo las enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y el sistema del glutatión peroxidasa/reductasa, y también una variedad de sustancias con las que el la SOD o la catalasa tiene actividad por ejemplo el  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión, piruvato, taurina, hipotaurina, albúmina y ácido úrico.

El equilibrio entre la formación de ERO y de los scavengers, así como el momento y la localización en los cuales los espermatozoides tienen contacto con las ERO determina los daños de estos.

La excesiva formación de ERO que supera la capacidad del los scavengers de atrapar a las ERO están relacionados con la infertilidad. Altas concentraciones en la producción de ERO son producidas por los mismos espermatozoides o por la combinación de la xantina o de la combinación de la xantina oxidasa, o del

hierro ( $Fe^{2+}$ ), que inducen la formación de los peróxidos tóxicos afectan la viabilidad de la esperma. Las muy bajas concentraciones de ERO causan una pérdida reversible en la motilidad del esperma que es debido al agotamiento intracelular del ATP y a la fosforilación axonemal escasa de la proteína.

El  $H_2O_2$  es principal responsable de la pérdida de funciones del esperma el principal scavenger de este, es la catalasa, que degrada selectivamente esta ERO, es el único limpiador a conferir protección completa a los espermatozoides (de Lamirande y Gagnon, 1992a, b; Aitken *et al.*, 1993; Etnl de Griveau, 1995a).

La capacitación del esperma y la reacción acrosomal son reguladas por un complejo mecanismo de trasducción de señal y ya hay evidencia de que las cantidades muy pequeñas de ERO son necesarias para estos procesos.

La reducción secuencial del oxígeno conduce a la generación inevitable del daño por el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), (Peña, F.J., et al., 2000; Yamada, J., et al., 2003). Los sistemas enzimáticos mediante los cuales las especies reactivas de oxígeno se forman en términos generales comprenden, al sistema NADPH oxidasa, cadena respiratoria mitocondrial, Xantina oxidasa, enzimas del catabolismo del ácido araquidónico (ciclo-oxigenasa, lipo-oxigenasa) y otras enzimas de óxido reducción.

Recientemente, se ha demostrado que las muestras del semen con la viabilidad más alta después de congelar y descongelar, fueron caracterizadas por la alta actividad de la superóxido dismutasa (Peña, F.J et al, 2003).

Las especies reactivas del oxígeno desempeñan un papel dual en la fertilidad del macho. Esto es por que la formación de las ERO tiene una función importante en los procesos de hiperactividad en la motilidad, la capacitación, la reacción acrosomal y la fertilización. Por otro lado las ERO en exceso también

puede inducir un daño severo a los espermatozoides, por que sus mecanismos de defensa son limitados. Los espermatozoides mantienen un balance continuo en el flujo de éstos, ya que una producción controlada de las ERO tiene importancia vital para la función reproductiva, mientras que la superproducción de ERO conduce a un estrés oxidante, teniendo un impacto negativo en la fertilidad (Floris, W.P.C, et al., 2000). El plasma seminal es un liquido especialmente importante para la protección de los espermatozoides contra las ERO. El plasma seminal proporciona un ambiente de protección importante para los espermatozoides, ya que se ha demostrado que contienen varios sistemas enzimáticos y no-enzimáticos que los protegen, contra el posible daño oxidativo(Garrido, N., et al., 2004).

Las defensas intracelulares de los espermatozoides controlan la acción de ERO. Estas consisten principalmente en las enzimas, superoxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa, mientras que los antioxidantes no-enzimáticos desempeñan solamente una función de menor importancia. Extracelularmente, los espermatozoides son protegidos por el plasma seminal después de la eyaculación, este contiene varios antioxidantes no-enzimáticos contra las ERO, contribuyendo a una actividad antioxidante de gran alcance. Estos antioxidantes incluyen al ácido ascórbico, el ácido úrico, la albúmina, glutatión, taurina, la vitamina E, la enzima catalasa, la superoxido dismutasa, la glutatión peroxidasa y glutatión reductasa, altas concentraciones de grupos sulfidrilos (Floris, W.P.C, et al., 2000; Potts, R.J., et al., 1999).

El daño oxidativo a la membrana de la mitocondria puede ser un factor importante en la baja fertilidad del semen criopreservado, esto debido a que la mitocondria genera la energía para que el esperma tenga motilidad (Peña F.J., et al., 2003).

## **6. LOS ANTIOXIDANTES.**

Durante los últimos 50 años los biólogos y los químicos sabían de la existencia de los antioxidantes y los radicales libres, sin embargo su participación en los procesos no fue puesta en evidencia hasta el año de 1954, cuando Daniel Gilbert, Rebecca Gerschman y sus colegas relacionaron los efectos tóxicos de los niveles elevados de oxígeno en condiciones aerobias con la radiación de ionización y propusieron la toxicidad del oxígeno, debido a que puede formar radicales libres. Este concepto no capturo la curiosidad de la comunidad científica hasta que en 1968 McCord y Fridovich descubrieron a la enzima superóxido dismutasa (Gutteridge, M.C. and Halliwell B., 2000).

La suplementación de antioxidante durante el enfriamiento ha mejorado la motilidad en los espermatozoides congelados-descongelados del verraco. Se ha estudiado adición de la vitamina E en diferentes concentraciones, y se ha observado que tiene un efecto sobre la motilidad del esperma, y la suplementación de antioxidantes da como resultado una alta actividad mitocondrial (Peña, F.J., et al., 2003). Los efectos benéficos que los antioxidantes proporcionan son una disminución en los daños a las membranas durante el proceso de criopreservación, (Chatterjee, S., et al., 2001).

Se tiene evidencia de que los antioxidantes tienen un efecto protector contra el daño oxidativo, asociado al proceso de congelación (Floris, W.P.C, et al., 2000).

Existen algunos compuestos que se conocen como limpiadores (en inglés scavengers) de las ERO como el Tirón (ácido 4,5-dihidroxil-1,3-benzanodisulfónico). El mecanismo que tiene estos limpiadores sobre los radicales libres, es la reducción de las ERO intracelulares, por esta razón reducen sus efectos dañinos (Yamada, J., et al., 2003). por la que actúa como antioxidante (Jung, L., et al., 2003). Otro efecto importante que tiene es la disminución del calcio intracelular

(Sugishita, K., et al 2003). Algunos estudios han demostrado que es posible disminuir los efectos dañinos de las ERO que tienen sobre la actividad funcional del esperma (Bardi, G., et al., 1997).

Se tiene evidencia que cuando las células somáticas son sometidas a un estado que se conoce como choque frío (4°C) y posteriormente a una temperatura fisiológica (37°C) hay una liberación de metales de transición, esto provoca la generación de ERO. Un agente quelante (secuestrantes) de metales de transición intracelular es el 2,2-dipiridilo (DP) la utilización de este compuesto en los hepatocitos de rata sometidos al choque frío provoca la disminución de ERO por parte de las células, lo cual apoya la hipótesis de la participación de los metales de transición en este proceso (Rauen, U. and Groot, H., 1998).

## **7. METODO PARA CUANTIFICAR LA PRODUCCIÓN DE ERO.**

La 2-7 diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCDHF) es un indicador intracelular de las ERO y del peroxinitrito y se a utilizado comúnmente para estos propósitos (Funahashi H., 2002).

La DCDHF-diacetato es lipofílico y se difunden a través de las membranas celulares, por esta razón se ha utilizado para determinar la producción de la respuesta oxidante de la célula a varios estímulos. Sin embargo la naturaleza exacta de cómo las especies reactivas la oxidan no se conoce bien, pero se asume que el peróxido de hidrógeno es su principal indicador (John, P., 1996).

Como ya se menciona los radicales libres de oxígeno, (principalmente el radical ·OH), pueden reaccionar con los ácidos grasos insaturados de diversos lípidos, para producir una serie de reacciones conocidas como lipoperoxidación. Este es un proceso mediante el cual el radical libre de oxígeno con suficiente energía es capaz de sustraer un átomo de hidrógeno de un ácido graso

generándose un nuevo radical libre en la molécula de éste, el cual después de una transposición de sus dobles enlaces forma dienos conjugados, para posteriormente unir una molécula de oxígeno y formar un radical libre peroxilo en el ácido graso. Este radical peroxilo reacciona con un segundo ácido graso dando como productos a un lipo-hidroperóxido y un nuevo radical libre en el segundo ácido graso. Este proceso puede continuar mientras existen sistemas que generen radicales libres de oxígeno (Hernández, A.S.R., et al, 1995).

Estos productos de peroxidación de los lípidos reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) produciendo un complejo colorido, propiedad que se utiliza para la cuantificación de la lipoperoxidación mediante el uso de este reactivo. (Hernández, A.S.R., et al, 1995).

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De acuerdo a la información presentada se puede observar que durante el choque frío los SPZ producen una mayor cantidad de ERO esto provoca que la gran mayoría mueran o tengan una capacitación prematura, disminuyendo la fertilidad.

Por esta razón estudiamos los efectos que tiene un antioxidante natural como el ácido úrico y un antioxidante que es utilizado en otro tipo de células como el Tirón, al igual que un quelante de metales de transición (Dipiridilo), que pueden provocar un aumento en la generación de ERO.

## **III. HIPÓTESIS**

Durante el choque frío (4°C) los espermatozoides de Cerdo Pelón Mexicano y Razas Mejoradas, tienen un aumento en la producción de ERO disminuyendo la viabilidad. Por lo tanto la utilización de antioxidantes en los diluyentes de conservación mejora la calidad de las células espermáticas.



#### **IV. OBJETIVOS GENERALES**

- Medir la producción de especies reactivas de oxígeno durante el choque frío.
- Comparar la producción de especies reactivas de oxígeno en dos diferentes razas de cerdos.

#### **V. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar el porcentaje de motilidad y viabilidad durante la etapa choque frío.
- Medir la lipoperoxidación mediante la formación de compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (CRATs), en presencia y ausencia de antioxidantes.
- Cuantificar la producción de anión superóxido mediante el uso de azul de nitro tetrazolium (NBT) durante la fase de la choque frío.
- Con el empleo de la DCDF-Diacetato medir la producción de ERO y conocer si los metales de transición participan en dicho proceso.

## **VI . DISEÑO EXPERIMENTAL**

El estudio consistió en dos fases donde se evaluarán diferentes aspectos que son:

Fase 1. Evaluación y elección de los sementales.

Fase 2. Medición de la lipoperoxidación (CRATs), producción de ERO en las células espermáticas, durante el proceso de choque frío.

### **1. Fase1.**

Para la obtención de los eyaculados se utilizarán tres semental raza Cerdo Pelón Mexicano, entre 1 a 3 años, los cuales pertenecen al CEIEPP–Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Porcina-Jilotepec FMVZ-UNAM. Fueron colectados una vez por semana.

La colecta se realizará por medio de la técnica de la mano enguantada, utilizando para tal propósito un termo móvil, guantes de látex y filtro.

#### **1.A- Valoración del semen**

Concentración (cámara de Neu Bauer): En una pipeta para conteo de glóbulos blancos, se extraerá el semen hasta la marca de 0.5 ml, limpiando posteriormente la punta para después extraer glutaraldehído al 3% hasta la marca del número 101 que se encuentra en la parte superior de la pipeta. Luego se agitará lentamente para homogeneizar la alícuota.

De esta muestra se agregará una gota en cada lado del hemocitómetro estándar, dejando reposar para la sedimentación de los espermatozoides, observándolos posteriormente al microscopio con un aumento de 100x.

Motilidad. Se evaluará colocando una muestra de semen sobre un portaobjetos previamente calentado en una platina térmica a 37 °C, y al cual se colocará un cubreobjetos observándolo al microscopio a 10 y 40x. Los resultados de la motilidad se expresarán como el porcentaje de células espermáticas móviles (0-100%). ( Córdoba, 1999).

Viabilidad. Sobre un portaobjetos atemperado a 37°C se depositará una gota de semen y una gota de eosina al 0.5%. Después se efectuará la extensión sobre otro portaobjetos dejándose secar a temperatura ambiente, observándose después al microscopio óptico y hacer el conteo de 100 espermatozoides por medio de un contador manual, identificando los teñidos como los muertos y los que no se tiñeron como los que estuvieron vivos.

## **2. Fase 2**

La valoración de especies reactivas de oxígeno durante el proceso de criopreservación. Estas pruebas serán realizadas en Instituto Nacional de enfermedades Respiratorias, en el Área de Investigación en el Laboratorio de bioquímica inorgánica.

### **2.A. Cuantificación del grado de lipoperoxidación**

La recolección del semen se realizó con medio Beltsville TS (BTS; Albersnet al., 1983), el semen se dividió en 10 alícuotas de 5ml y fué adicionado en tubos para centrifuga de plástico de 15ml con medio BTS que contenía medio y ácido úrico a diferentes concentraciones, (2.5mM, 1.25mM, 0.62mM, 0.31mM). Estos tubos fueron divididos en dos unos colocados a 4°C y los otros a 15°C, por 2 hrs. Una vez que fue concluido el tiempo de incubación se realizo un lavado por centrifugación a 2500rpm/5min y se realizo una dilución para obtener  $480 \times 10^6$

spz/ml. El sobrenadante se desecho y las células fueron resuspendidas en el medio BTS conteniendo las mismas concentraciones de ácido úrico y un control.

Composición química del BTS:

205.5 mM (37gr) D-Glucosa  
14.88mM (1.25gr) bicarbonato de sodio  
3.3 mM (1.25gr) EDTA  
23.2mM (6gr) Citrato de sodio  
10.06mM (0.75gr) Cloruro de potasio  
(0.2 gr.) Penicilina  
Agua destilada hasta 1000 ml  
pH de 7

La detección de la lipoperoxidación fué determinada por la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA). La reacción del TBA con los peróxidos lípidicos da un pigmento rojo, que fue determinado espectrofotométricamente a 532nm (Yagui, 1984).

Se realizó una segunda centrifugación, el sobrenadante se eliminó y el paquete celular fué resuspendido con 2ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a una concentración de 0.166M, y 0.5ml de ácido fosfotungstico al 10%, se centrifugó a 2500rpm/5min y se eliminó el sobrenadante, se adicionó 1 ml de TBA 0.375 %, se colocó a ebullición por 10 min. Se enfrió durante 2min y se adicionó 0.5 ml de ácido clorhídrico 0.2N, se agregó 1.5ml de n-butanol y se agitó en un vortex para extraer el compuesto colorido, se realizó otra centrifugación a 2500rpm/10min el cual se leyó en un espectrofotómetro a 532 nm.

## **2.B. Determinación de ERO.**

Se utilizaron cajas de 96 pozos transparentes de fondo plano.

La 2,7-DCDHF-diacetato se diluye con etanol para preparar una solución concentrada a 4mM, para utilizar se realiza una segunda dilución 1:5 con H<sub>2</sub>O.

Del Tirón se pesan 0.09g y se disuelven en 1.35ml de PBS, para obtener una concentración final de 0.2M. El dipiridilo se diluye en etanol y obtenemos una concentración de 0.5mM.

Las muestras fueron divididas en 5 ml utilizando tubos para centrifuga de plástico de 15 ml los cuales contenían BTS con diferentes concentraciones de ácido úrico (2.5mM, 1.25mM, 0.62mM, 0.31mM y 0), también se adicionó a otros tubos con Tirón y Dipiridilo en concentraciones de 0.5mM, estos tubos fueron colocados a 4°C y otro juego de tubos fueron colocados a 15°C por 2 horas, después de este tiempo se realizó un lavado con centrifugación fría a 2500rpm/5min, se desechó el sobrenadante y se ajustó la concentración de espermatozoides a  $480 \times 10^6$  spz/ml. De la suspensión de espermatozoides se colocaron 150µl en los pozos de las cajas antes mencionadas, conteniendo 5 µl de 2,7-DCHF-diacetato, y se encubaron a 37°C durante 1 hora posteriormente se leyó la fluorescencia en un Fluorometro (Fluoroskan) utilizando una longitud de onda de excitación a 485nm y una de emisión de 527nm.

## **2.C. Formación de $\cdot\text{O}_2$ determinada por el NBT**

La determinación de la formación de anión superoxido fué determinada por el análisis de la reducción de azul de nitro tetrazolium(NBT). El NBT fue adicionado a una solución de BTS en una proporción de 1 mg/ml. Para esta determinación se utilizó semen colocando 5 ml de éste utilizando tubos para centrifuga de plástico de 15 ml los cuales contenían BTS con diferentes

concentraciones de ácido úrico (2.5mM, 1.25mM, 0.62mM, 0.31mM y 0), también se adicionó a otros tubos tirón y Dipiridilo en concentraciones de 0.5mM estos tubos fueron colocados a 4°C y otro juego de tubos fueron colocados a 15°C por 2 horas, después de este tiempo se realizó un lavado con centrifugación fría a 2500rpm/5min, se desechó el sobrenadante y se ajustó la concentración de espermatozoides a  $480 \times 10^6$  spz/ml. A 400  $\mu$ l de la suspensión obtenida se agregó 100  $\mu$ l del NBT preparado y se incubó durante 1 hora a 37°C y al termino de este tiempo se adicionó 1 ml de ciclohexanona para realizar la extracción de color posteriormente se realizó una centrifugación de 2500rpm/10min y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 560nm.

## **VII. ANALIS DE DATOS**

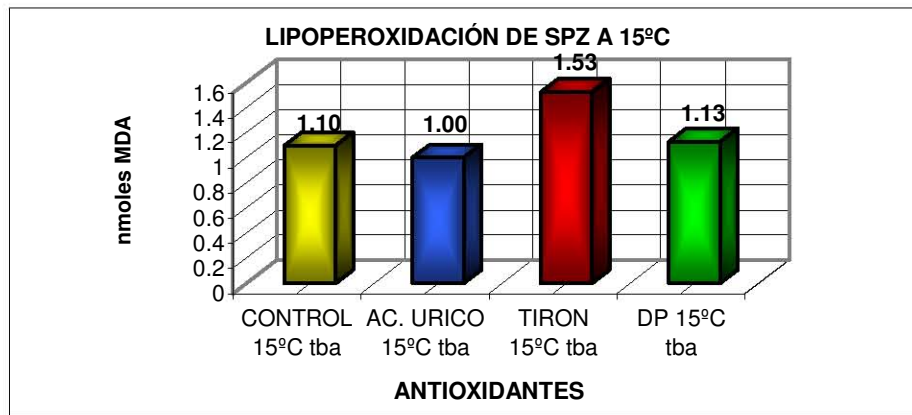
Los datos se analizaron por ANOVA y comparaciones múltiple usando prueba *t* de Bonferroni, mediante el programa Prisma 2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) y se presentaron como la media  $\pm$  DE. Un valor de  $P < 0.05$  se consideró significativo.

## VII. RESULTADOS

1. Resultados de la lipoperoxidación de los espermatozoides, la detección de la lipoperoxidación fue determinada por la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA). La reacción del TBA con los peróxidos lípidicos da un pigmento rojo (Malonaldehído MDA), que fue determinado espectrofotométricamente a 532nm (Yagui, 1984).

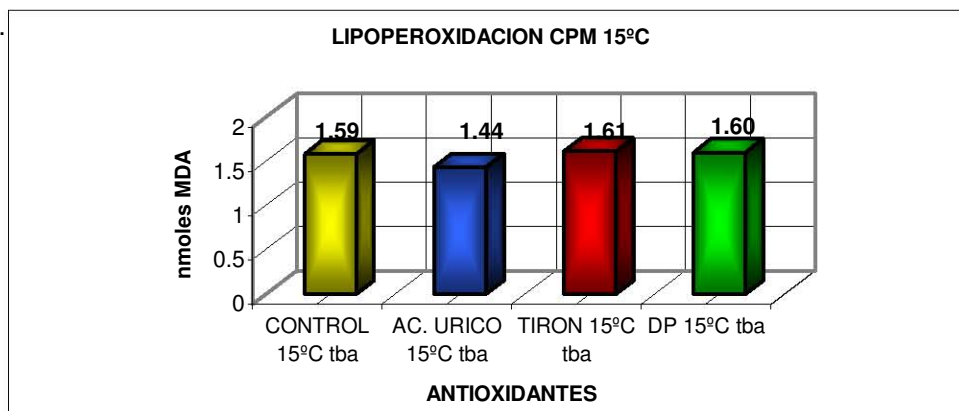
Los datos se mostraron juntando ambas razas, y por separado.

Grafica 1. lipoperoxidación CPM y CRM



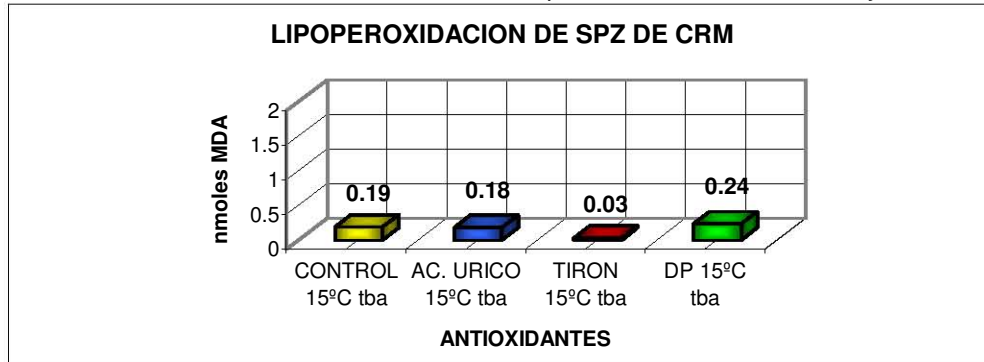
En los resultados obtenidos cuando se juntan ambas razas, no se encontró diferencias significativa en lo que corresponde a la lipoperoxidación de las membranas plasmáticas.

Grafica 2. Producción de nmoles de MDA en spz de Cerdo Pelón Mexicano.



La producción de MDA en spz de CPM no tuvo diferencias significativa.

Grafico 3. Producción de nmoles de MDA en spz de Cerdos de Razas Mejoradas.



No se encontró diferencia significativa en la concentración de MDA en CRM a 15°C.

En base a los resultados obtenidos se realizó una comparación entre el comportamiento de los spz de ambas razas y se encontró que si hay diferencia significativa.

Cuadro 1. Comparación de la lipoperoxidación de CPM y CRM

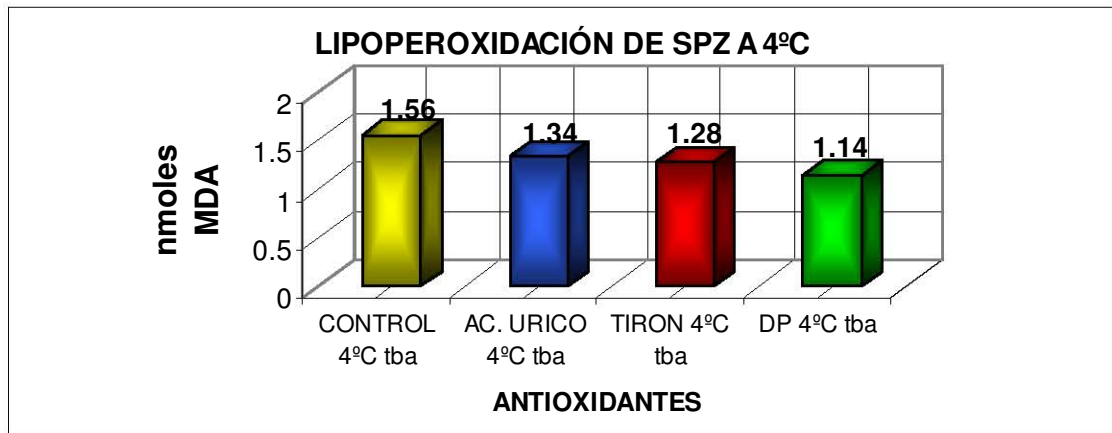
Bonferroni's Multiple Comparison Test	P value
Control 15°C CPM vs Control 15°C CRM	P < 0.001
Acido úrico 15°C CPM vs Acido úrico 15°C CRM	P < 0.001
Tirón 15°C CPM vs Tirón 15°C CRM	P < 0.001
Dp15 °C CPM vs Dp 15°C CRM	P < 0.001

Si hay una diferencia significativa entre ambas razas, siendo evidente que los spz de Cerdo de Razas Mejoradas.



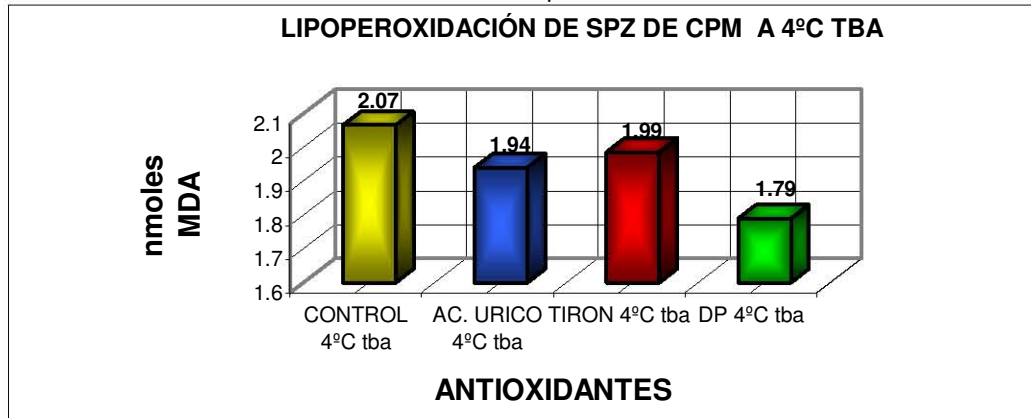
Los resultados de ambas razas a 4°C se muestran a continuación.

Grafica 4. lipoperoxidación CPM y CRM



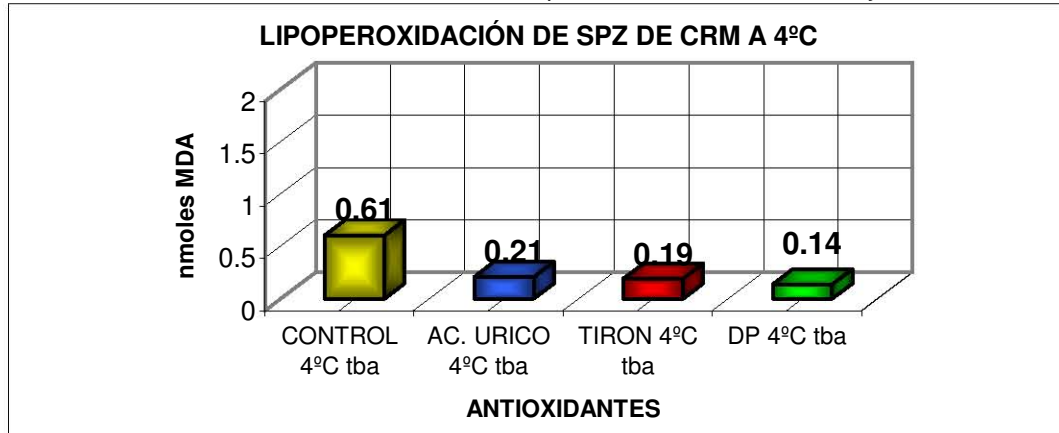
No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a los spz cuando se analizan los resultados de manera conjunta de CPM y CRM.

Grafico 5. Producción de nmoles de MDA en spz de Cerdo Pelón Mexicano



No se encontraron diferencias significativas, entre la utilización de antioxidantes en los spz de CPM.

Grafico 6. Producción de nmoles de MDA en spz de Cerdos de Razas Mejoradas.



En los spz de CRM si se encontró diferencia significativa en los tratamientos con antioxidantes.

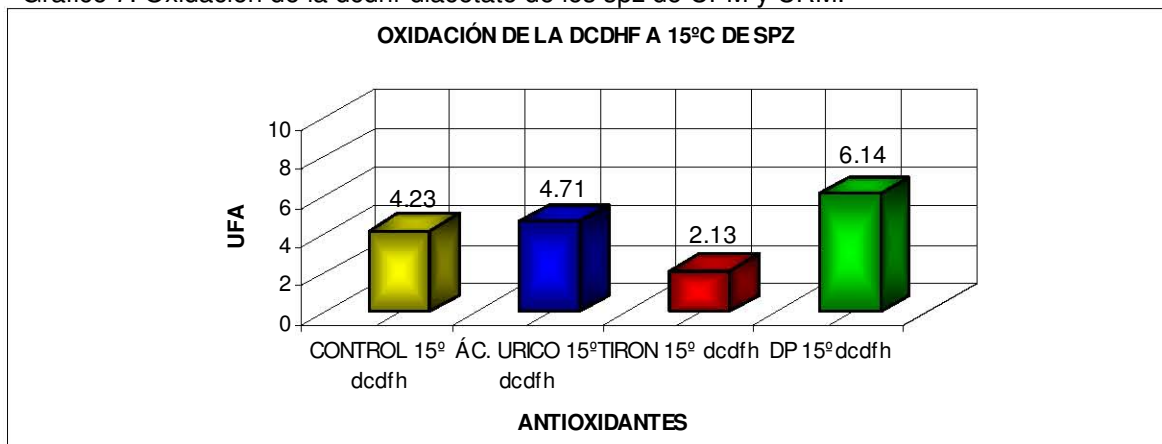
Cuadro 2. Comparación de la concentración de MDA en CRM con los diferentes antioxidantes.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	P value
CONTROL vs TIRON	P < 0.05
CONTROL vs Dp	P < 0.05

Entre los spz de ambas razas también se encontraron diferencias significativas, con spz de CPM y CRM tratados con los mismo antioxidantes.

2. La oxidación de la DCDHF-Diacetato, se utilizó para medir la formación de anión superóxido intracelular, la lectura se realiza con la ayuda de un Fluorometro, (fluoreskan).

Grafico 7. Oxidación de la dcdhf-diacetato de los spz de CPM y CRM.



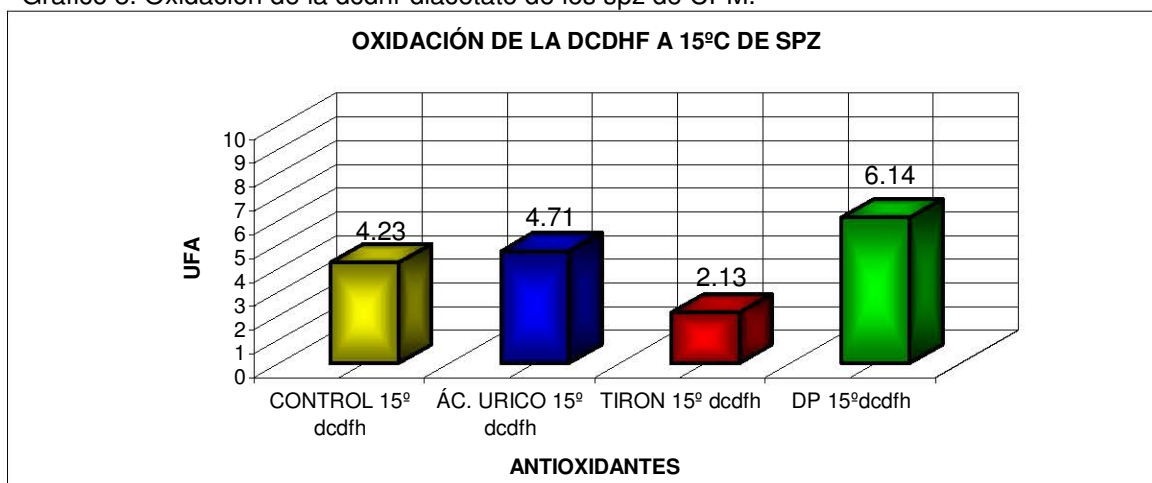
Si se encontraron diferencias significativas en los tratamientos con la DCDFH-diacetato.

Cuadro 3. Oxidación de la DCDFH-diacetato de CPM y CRM A 15°C.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	P value
Control vs Tirón	P < 0.05
Acido úrico vs TIRON	P < 0.01
Tirón vs Dp	P < 0.001

Los resultados de la oxidación de la sonda DCDHF de spz de CPM con antioxidantes a 15°C se muestran a continuación.

Grafico 8. Oxidación de la dcdhf-diacetato de los spz de CPM.



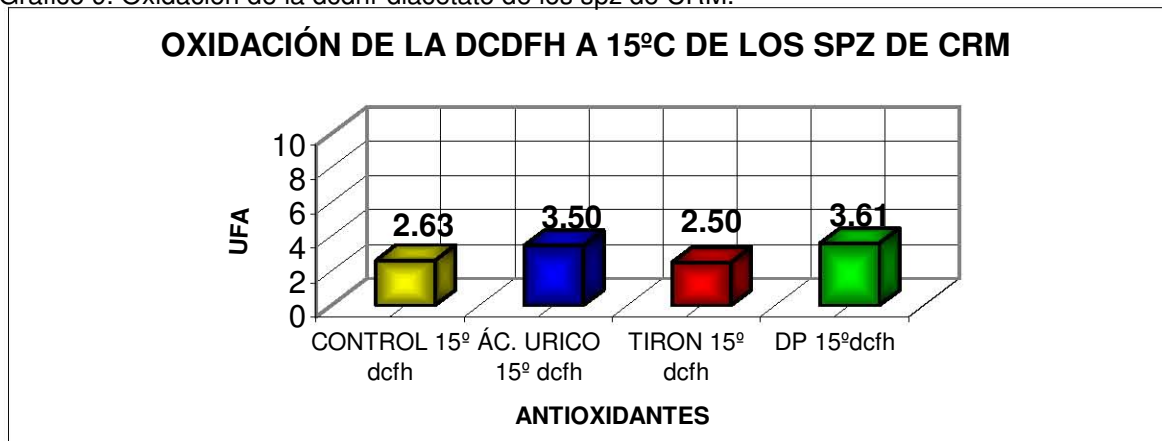
Las diferencias significativas son las siguientes:

Cuadro 4. Oxidación de la DCDFH-diacetato de CPM a 15°C.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	P value
Control vs Tirón	P < 0.05
Acido úrico vs TIRON	P < 0.01
Tirón vs Dp	P < 0.001

Resultado de la oxidación de la DCDFH-diacetato de los spz de CRM a 15°C.

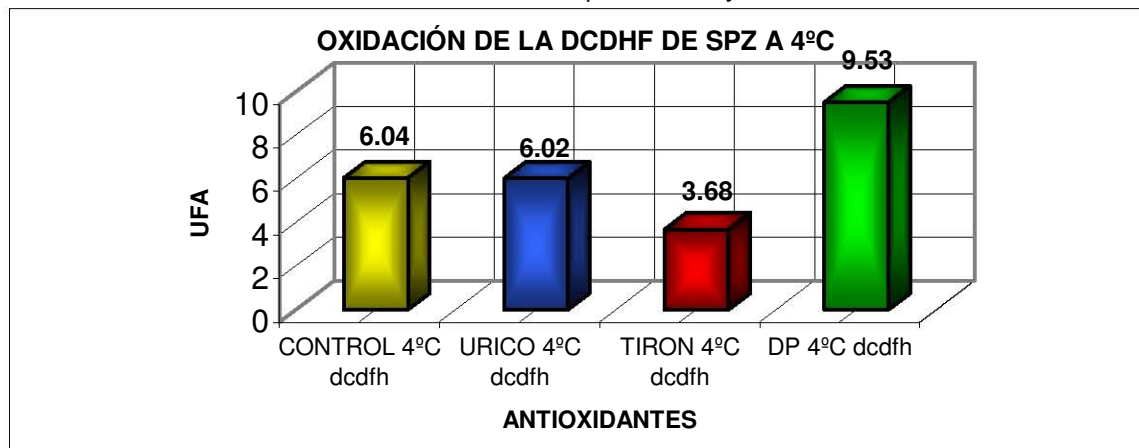
Grafico 9. Oxidación de la dcdhf-diacetato de los spz de CRM.



No se encontraron diferencias significativas.

En el tratamiento de los spz con la DCDFH-diacetato con spz a 4°C los resultados se muestran a continuación.

Grafico 10. Oxidación de la dcdhf-diacetato de los spz de CPM y CRM a 4°C .



Si se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a los spz de CPM y CRM, cuando se analizaron juntos.

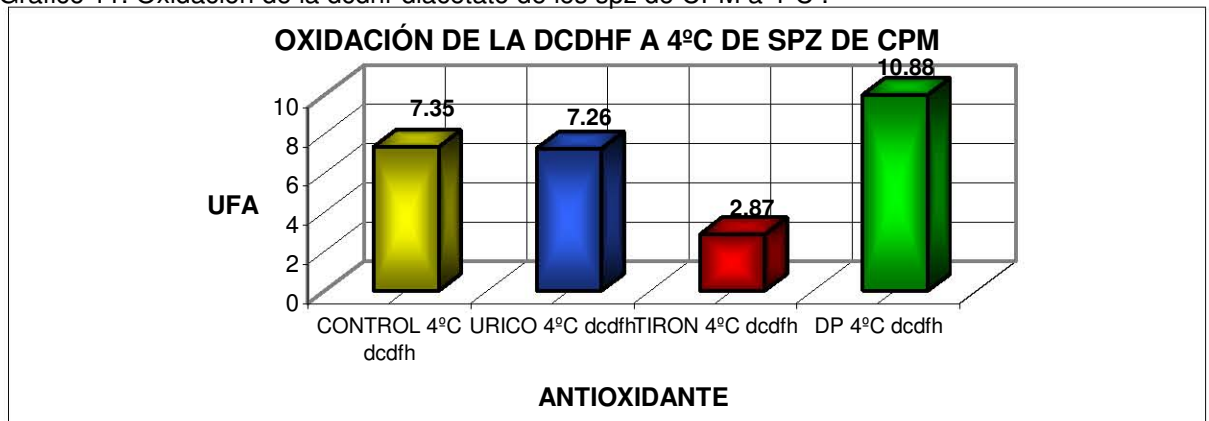
Cuadro 5. Oxidación de la DCDFH-diacetato de CPM y CRM a 4°C.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	P value
Control vs Dp	P < 0.001
Acido úrico vs Dp	P < 0.01
Tirón vs Dp	P < 0.001

Se observó que hay una diferencia significativa entre la reacción del tirón a comparación con la de los otros antioxidantes.

Con lo que respecta al la sonda DCDFH a los spz de los CPM su comportamiento fue el siguiente.

Grafico 11. Oxidación de la dcdhf-diacetato de los spz de CPM a 4°C .

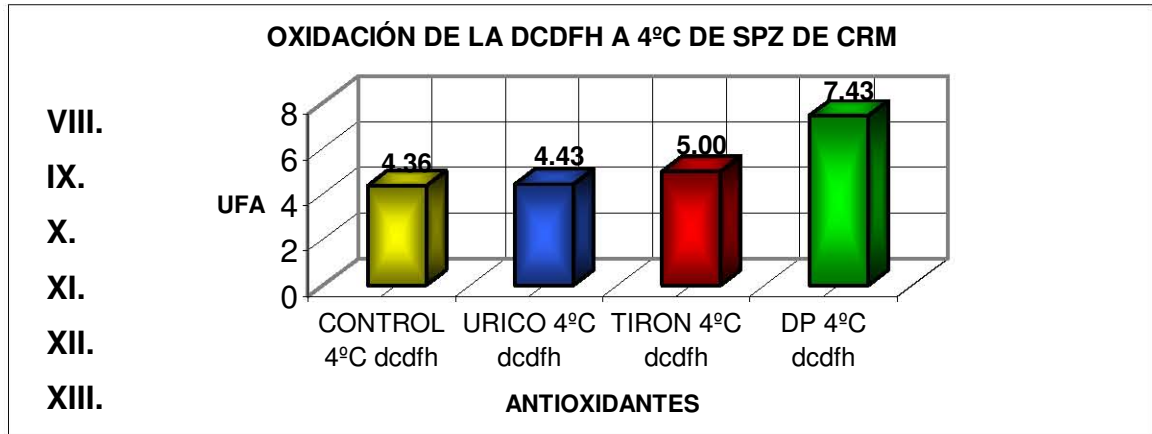


La diferencia se encuentra entre el tratamiento con el tirón y el dipiridilo.

Cuadro 6. Oxidación de la DCDFH-diacetato de CPM a 4°C.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	P value
Tirón vs Dp	P < 0.001

Grafico 12. Oxidación de la dcdhf-diacetato de los spz de CRM a 4°C .



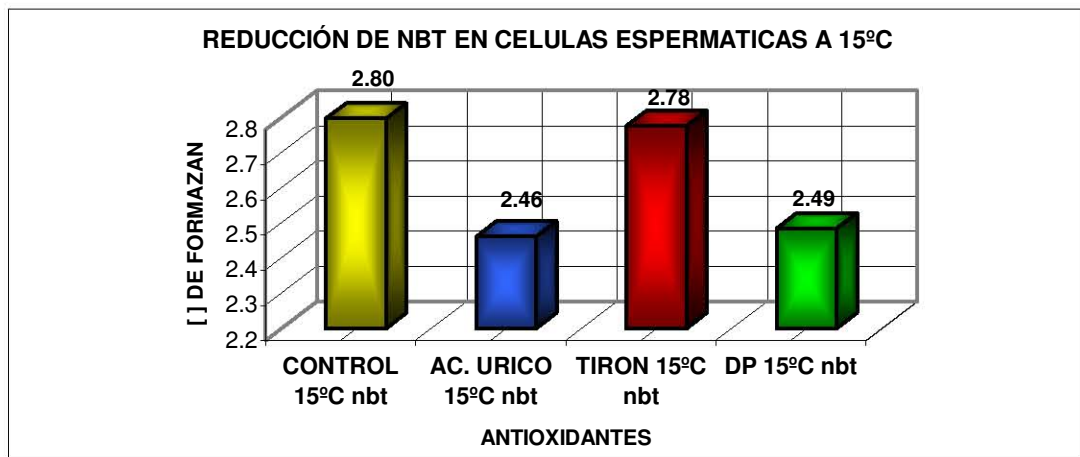
Si se encontraron diferencias significativas entre el Dp y los demás antioxidantes.

Cuadro 7. Oxidación de la DCDFH-diacetato de CRM a 4°C.

Bonferroni's Multiple Comparison Test	P value
Control vs Dp	P < 0.001
Acido úrico vs Dp	P < 0.01
Tirón vs Dp	P < 0.001

3. Reducción de NBT este método funciona para medir la producción de anión superoxido.

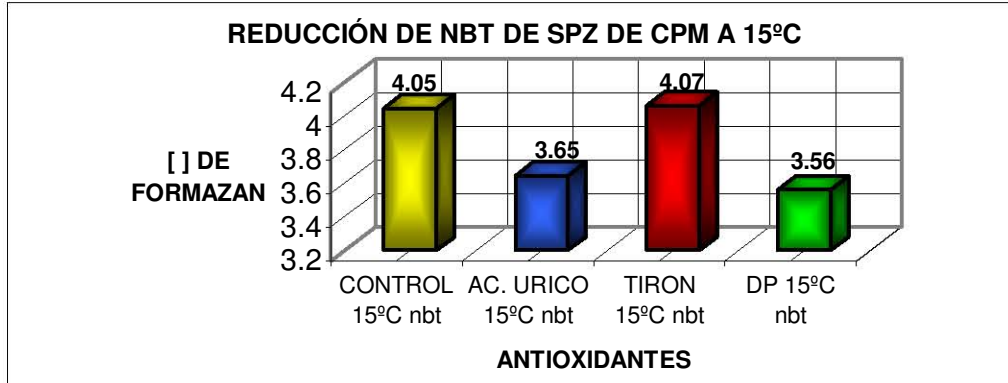
Grafico 13. reducción del NBT, para medir la producción de anión superoxido en los spz.



No se encontraron diferencias significativas.

Los datos de CPM a 15 Son:

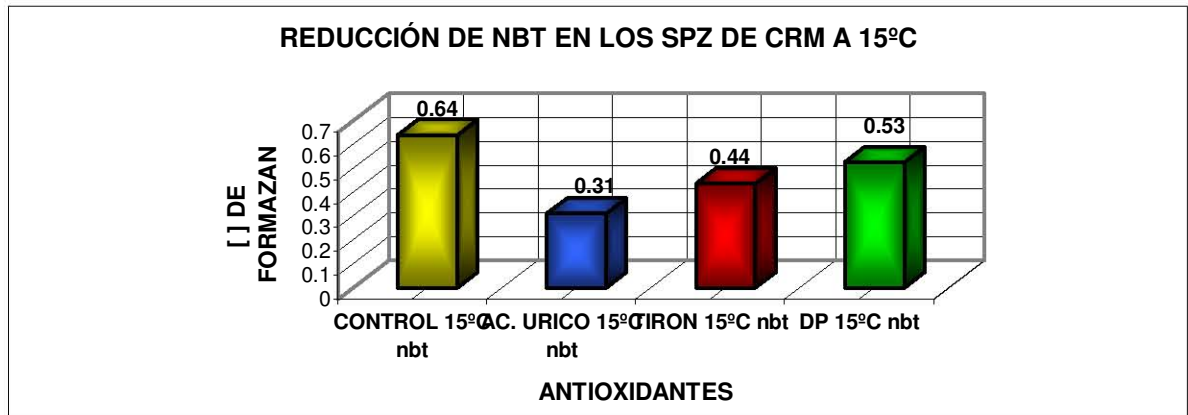
Grafico 14. reducción del NBT, para medir la producción de anión superoxido de los spz de CPM a 15°C spz.



No se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos de los spz de CPM para la reducción del formazan.

Los datos par los spz de CRM son:

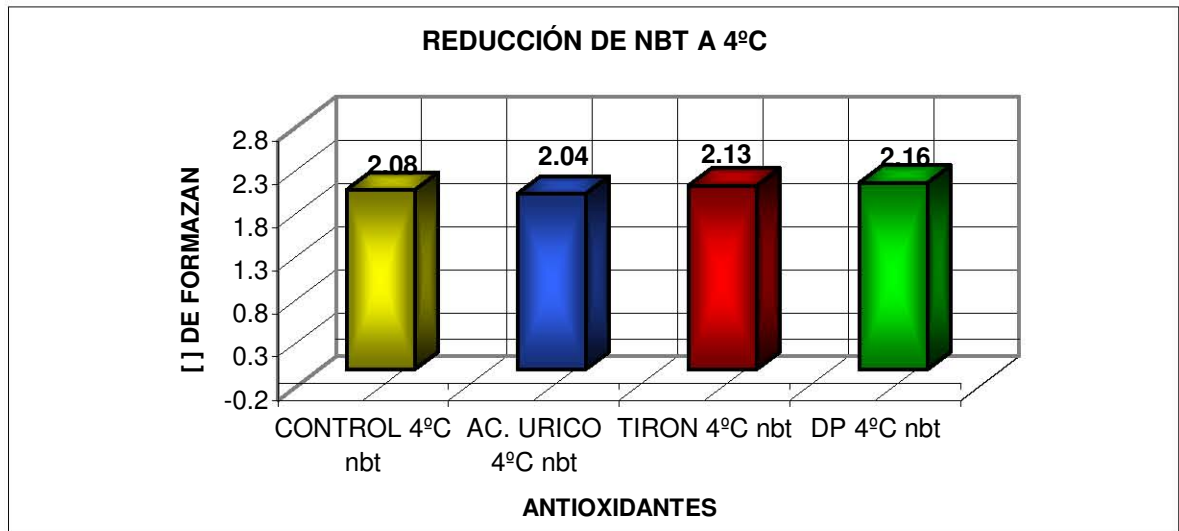
Grafico 15. Reducción del NBT, para medir la producción de anión superoxido de los spz de CRM a 15°C spz.



No se encontraron diferencias significativas.

En lo que se refiere a los spz a 4°C los resultados son los siguientes:

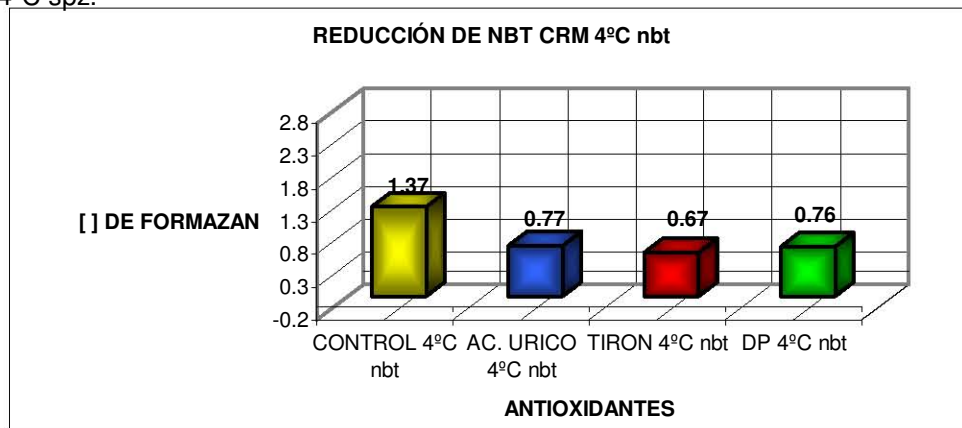
Grafico 16. Reducción del NBT, para medir la producción de anión superóxido de los spz en CPM y CRM a 4°C spz.



No existieron diferencias significativas.

Para los spz de CPM la reducción de NBT tampoco fue significativa.

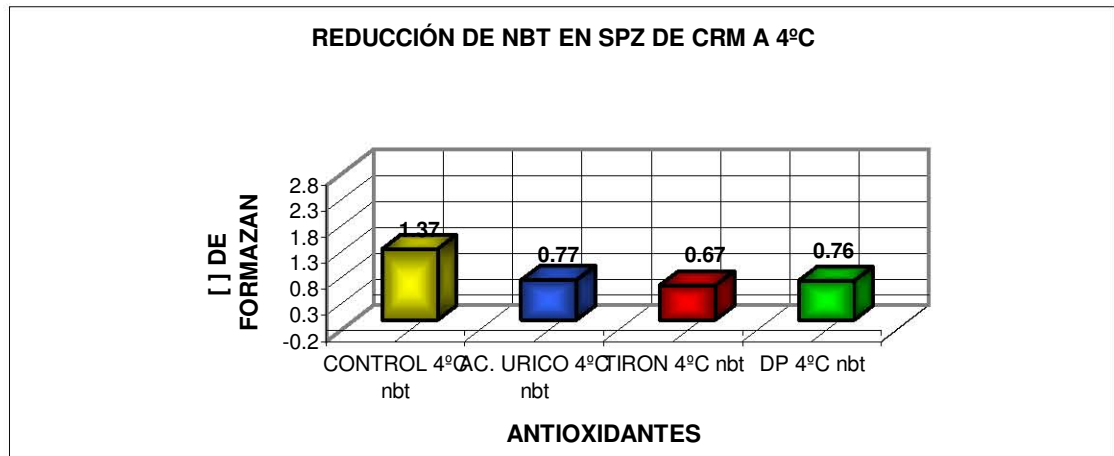
Grafico 17. Reducción del NBT, para medir la producción de anión superóxido de los spz en CPM a 4°C spz.



No se encontraron diferencias significativas.



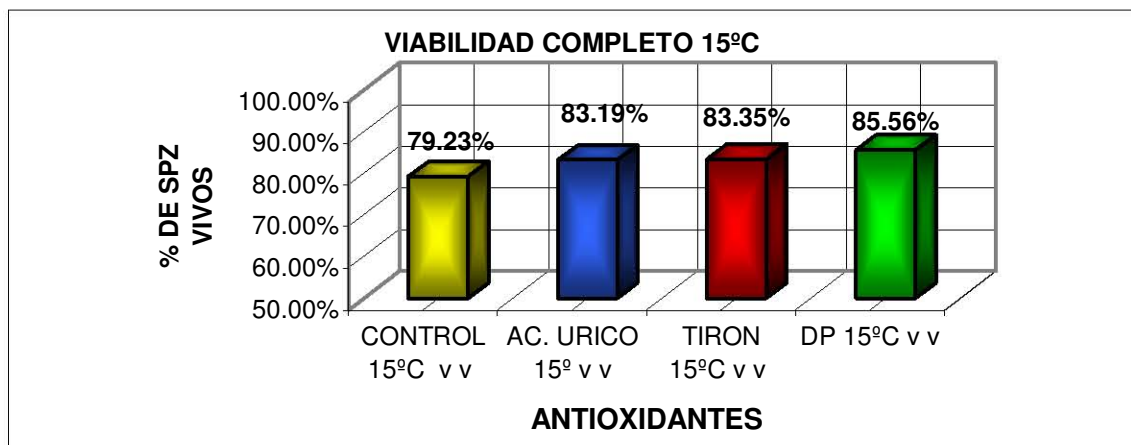
Grafico 18. Reducción del NBT, para medir la producción de anión superóxido de los spz en CRM a 4°C spz.



No se encontraron diferencias significativas.

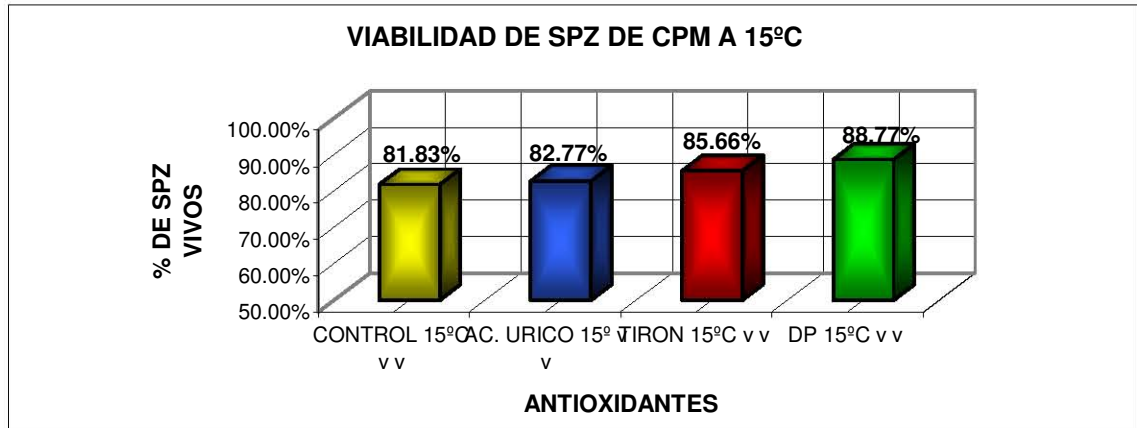
#### 4. Viabilidad

Grafico 19. Viabilidad de los spz de CPM y CRM a 15°C



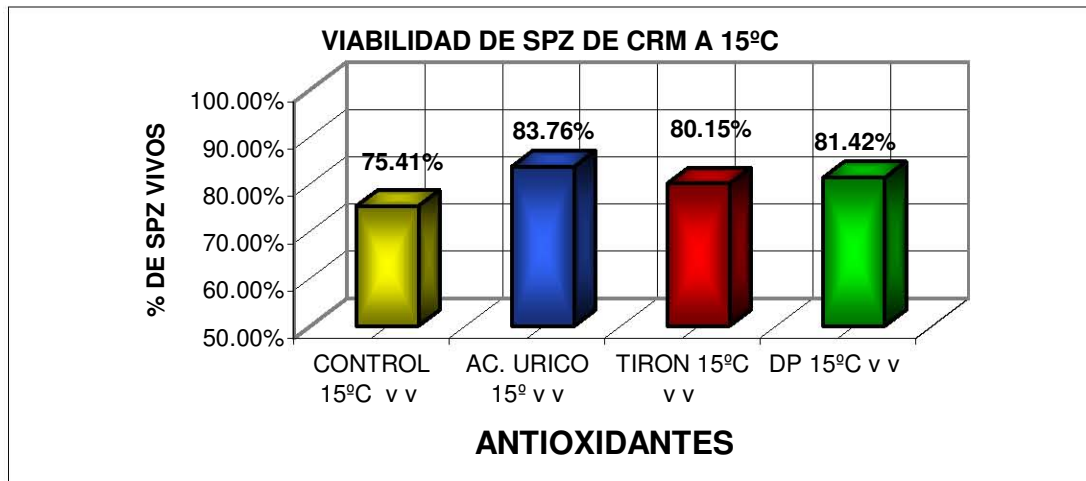
No hay diferencias significativas con las dos especies.

Grafico 20. Viabilidad de los spz de CPM a 15°C.



No se encontraron diferencias significativas, pero si es posible observar que hay una mayor cantidad de spz vivos con la adición de antioxidantes.

Grafico 21. Viabilidad de los spz de CRM a 15°C.



No se encontraron diferencias significativas.

Para los pza a 4°C los resultados se muestran en las siguientes graficas:

Grafico 22. Viabilidad de los spz de CPM y CRM a 4°C.

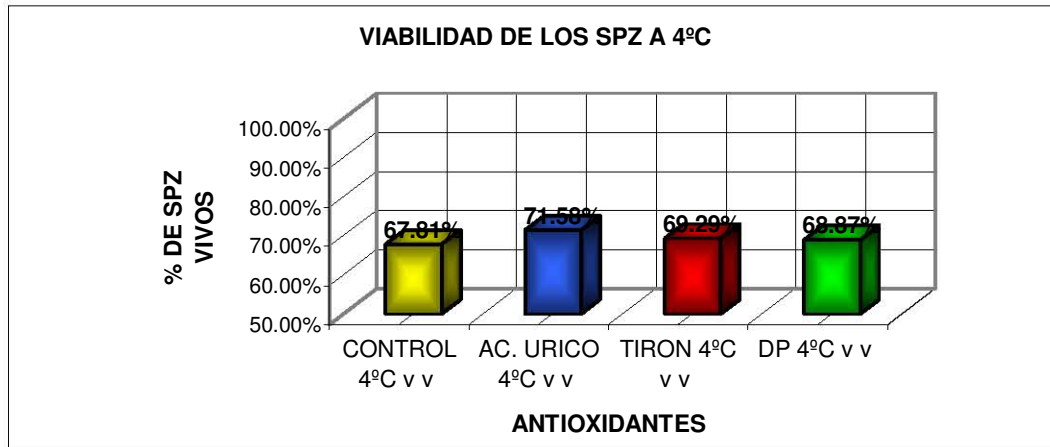


Grafico 23. Viabilidad de los spz de CPM a 4°C.

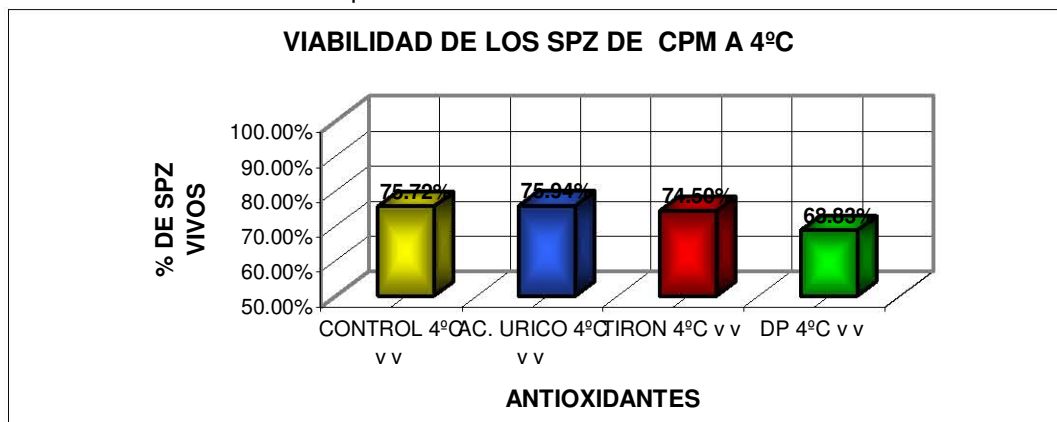
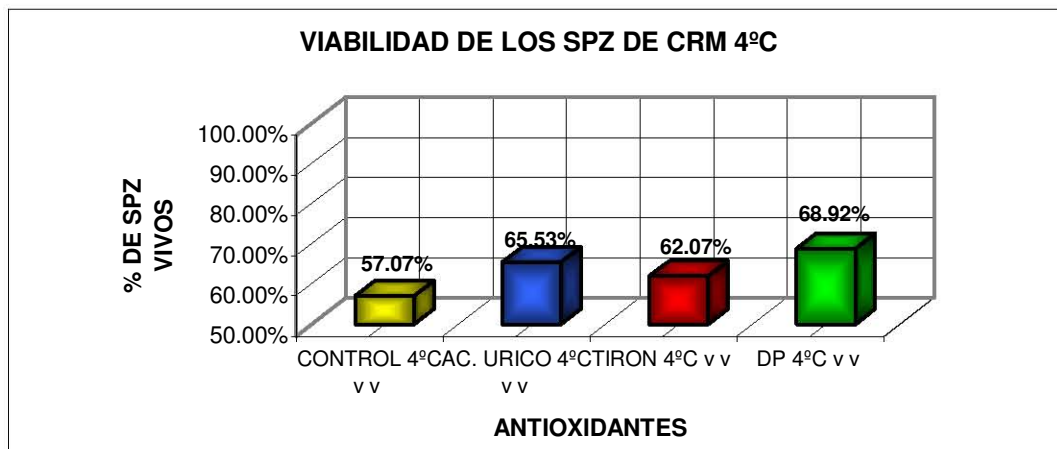


Grafico 22. Viabilidad de los spz de CRM a 4°C.



En ninguno de los tratamientos se encontró diferencias significativas.

## Conclusiones

En lo que se refiere a la lipoperoxidación de las membranas de los espermatozoides, se encontró que si hay diferencia significativa, con respecto a los cerdos de razas mejoradas vs los cerdos de raza pelón mexicano, los primeros presentaron un menor daño a las membranas, esto en lo que se refiere a los spz que se mantuvieron a una temperatura de 15°C, el efecto de los antioxidantes se comporto de manera diferente para ambas razas.

Mientras que en los spz de CPM se encontró mayor lipoperoxidación que en los CRB en los que prácticamente no hubo reacción al TBA. Las diferencias entre ambas razas fueron significativas.

Los espermatozoides que estuvieron sometidos a choque frío (4°C), si se observó una disminución en ambas razas, a la adición de antioxidantes, sobre todo a los del CPM, ya que al parecer eran los más susceptibles, como se observó, en los resultados anteriores. Los spz de CRM fueron más resistentes a este cambio de temperatura, y sus membranas también se conservaron en mejores condiciones.

El análisis para la oxidación de la sonda DCDHF-diaceto, que nos indica la producción de ERO, se observa que el que mejor reacciono fue el tirón, en ambas razas, y en general los 3 antioxidantes cumplieron con una mejor protección en los spz de CPM y si se encontró una diferencia significativa en la producción de ERO entre los CPM y CRM, esto en los spz que se colocaron a una temperatura de 15°C y se mantuvieron a esa temperatura. Los spz que se llevaron hasta la temperatura de 4°C se encontró una reacción diferente, aunque en ambas especies el tirón que evito más la producción de ERO, se observó una reacción diferente que a 15°C, ya que, hubo una gran producción ERO en los spz que se les adicionó el Dp, esto fue para ambas razas, y si se

encontró una diferencia significativa, entre la producción de ERO del Dp y el control en ambas razas.

Para la reducción del NBT en los spz que se encuentran a la temperatura donde se conservan los spz (15°C), se encontró que hubo una protección en los spz de ambas razas con la adición de ácido úrico y el Dp, pero no así con el tirón, esto muy posiblemente nos indique que la mayor producción de ERO se encuentra fuera de las células espermáticas y no dentro.

En lo que se refiere a los spz que se sometieron a choque frío, no se encontró diferencia significativa en lo que se refiere a la protección de los antioxidantes y el control, pero sí en lo que se refiere a razas ya que hubo una mayor producción de anión superóxido en los spz de CPM que en los de CRM.

En lo que se refiere a las viabilidades no se encontró una diferencia significativa estadísticamente pero si se puede observar que fue mejor en las spz que se les adiciono algún antioxidante esto en ambas razas a 15°C.

En lo que se refiere a los spz de choque frío, los spz de CPM se encontró que son mas susceptibles a las temperaturas bajas ya que si hay una diferencia significativa entre estos y los spz de CRM.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALMLID T. And Hofmo P.O. (1996); A brief review of frozen semen application under Norwegian A.I. service conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 31 (1): 169-173.
- BWANGA, C.O., De Braganca, M.M, Einarsson, S. and Rodríguez-Martínez, H. (1990). Cryopreservation of boar semen in mini- and maxi-straws. *Journal of Veterinary medical Association* 37: 651-658.
- BWANGA, C.O (1991). Cryopreservation of boar semen I: a literature review. *Acta Vet. Scand.* 32: 431-453
- BWANGA, C.O, Einarsson, S. and Rodríguez-Martínez, H. (1991a). Cryopreservation of boar semen II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta vet. Scand.* 455-461.
- BWANGA, C.O., Ekwall, H. and Rodríguez – Martínez, H. (1991b) Cryopreservation of boar semen III: Ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra-rapidly at various stages of conventional freezing and thawing. *Acta. Vet. Scand.* 32: 463-471.
- CARBONELL, R.M. (1988). Efecto económico del uso del semen congelado. Tesis U.N.A.M.- F.M.V.Z.
- Contreras, C.A, (1999). El cerdo criollo mexicano, especie a mejorar, para comercializarla. *Gaceta Universitaria* pag. 12.
- CÓRDOVA, I.A. (1999) Respuesta del semen congelado en la fecundación *in VITRO*. Tesis Doctoral, Madrid, España.
- Crow, J.P., (1997). Dichlorodihydrofluorescein and Dihydrorhodamine 123 Are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for indicators measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide.* 1 (2): 145-157.
- DIDION, B.A. and Schoenbeck R.A. (1996). Fertility of frozen boar semen used for I.A. in comercial settings. *Reprod. Dom. Anim.* 31 (1): 175-178.
- Floris, W.P.C., Overveld, V. Haenen R.M.M. and Rhemrev J. (2000). Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico-Biological Interactions.* 2-3 (127) 151-161.

- GILMORE J. A. ; Du J.; Tao J.; Petear A.T. and Crister J.K., (1996); Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to criopreservation. *J. Reprod. Fert.* 107 (1): 87-95.
- Green C.E. and Watson P.F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with capacitation. *Reproduction.* 122 889-898.
- HE L, Bailey J.L. and Buhr M.M., (2001). Incorporating in boar sperm decreases chilling sensitivity but not capacitation potential. *Biology of reproduction.* (64) 69-79.
- HICKS, G. J.J., Medina , S.R. (2003). Introducción a la bioquímica de los radicales libres. *Radicales libres en la medicina.* 1 : 3-17.
- Herrero, M.B., Lamirande, E. and Gagnon C. (2001). Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxyxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Molecular Human Reproduction.* 7(10) 913-921.
- Medrano, A., Watson, P.F. And W.V. Holt. (2002). Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction.* 123, 315-322.
- NATH, M.C., Deka, B.C. and Borgohain, B.N. (1994) Effect of holding time on quality of frozen boar semen. *Indian Vet. J.* 71: 250-252.
- Peinado, B., Poto, A., Gadea, J. y S. Ruiz.(1998). Estudios premitares en la criopreservación de espermatozoides porcinos de raza chato murciano. *Arch. Zootec.* 43:305-310.
- Poto, A., Peinado, B., Barba C., y J.V. Delgado. (2000). Congelación de semen porcino de razas autóctonas en peligro de extinción. Influencia de la metodología en bancos de germoplasma para pequeñas poblaciones. *Arch. Zootec.* 49:493-496.
- Sierra, A.C., Poot, T.B., Díaz, A.H., Cordero y Delgado V.J. (2005). El cerdo pelón mexicano, una raza en peligro. *Arch. Zootec.*54:165-170.
- Vázquez, S. (2000), Conservación genética de Cerdo Pelón en Yucatán y su integración a un sistema de producción sostenible: Primera aproximación. *Arch. Zootec.* 49:415-421.