



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN
DOSIS SEMINALES DE CERDO, UTILIZANDO EL
DILUYENTE DE LARGA DURACIÓN GEDIL®.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA :

CLAUDIA IVETT REYES FELIPE

ASESORES : DR. OSCAR GUTIÉRREZ PÉREZ

MVZ. MC. SUSANA ESPINOSA HERNÁNDEZ



MÉXICO, D.F.

2013.



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.



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.

CONTENIDO

ÍNDICE	PÁGINA
1. RESUMEN -----	1
1.1 Abstract -----	3
2. INTRODUCCIÓN -----	5
2.1 Importancia de la inseminación artificial -----	5
2.2 La evaluación de la calidad seminal -----	5
2.2.1 Espermiograma -----	6
2.2.2 Características macroscópicas -----	6
2.2.3 Características microscópicas -----	7
2.2.4 Pruebas de integridad y funcionalidad espermática -----	14
2.2.5 Pruebas de integridad -----	15
2.2.6 Pruebas funcionales -----	17
2.2.7 Pruebas de osmolaridad -----	18
2.3 El espermatozoide: estructura y función -----	20
2.3.1 Acrosoma -----	22
2.3.2 Membrana plasmática -----	24
2.3.3 Motilidad espermática -----	26
2.4 Mitocondria: estructura y función oxidativa -----	29
2.5 Prueba de DAB -----	33
2.6 Diluyentes -----	34
3. JUSTIFICACIÓN -----	41

4. HIPÓTESIS -----	42
5. OBJETIVOS -----	43
5.1 Objetivo general -----	43
5.2 Objetivos específicos -----	43
6. MATERIAL Y MÉTODOS -----	44
6.1 Diagrama experimental -----	45
6.2 Procedimientos -----	47
6.3 Toma de fotografías -----	52
6.4 Análisis estadístico -----	52
7. RESULTADOS -----	53
7.1 Fotografías: prueba dual Coomassie/HOST -----	56
7.2 Fotografías: prueba de la DAB -----	62
8. DISCUSIÓN -----	63
9. CONCLUSIÓN -----	71
10. BIBLIOGRAFÍA -----	72
11. ANEXOS -----	80

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

- | | |
|---|----|
| 1. Volumen y concentración espermática del eyaculado de verraco según distintos autores. | 12 |
| 2. Malformaciones espermáticas, de acuerdo a su origen. | 14 |
| 3. Dimensiones normales del espermatozoide porcino. | 20 |
| 4. Enzimas acrosomales. | 22 |
| 5. Composición química general de los diluyentes para semen porcino. | 36 |
| 6. Composición (en g/l) de los diluyentes de inseminación artificial porcina más utilizados. | 39 |
| 7. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de motilidad general con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento. | 53 |
| 8. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de acrosomas íntegros con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento. | 54 |
| 9. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de HOST + con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento. | 55 |
| 10. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 1 con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento. | 57 |
| 11. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 2 con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento. | 58 |

- 12.** Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 3 59
con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento.
- 13.** Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 4 60
con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento.
- 14.** Resultados obtenidos al comparar el porcentaje total de mitocondrias 61
Dañadas (grado 2, 3 y 4) con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS®
al día 1 y 10 de almacenamiento.

LISTA DE FIGURAS	PÁGINA
1. Recuento espermático en cámara de Bürker.	12
2. Espermatozoides con flagelo enrollado (HOST +), aquel con flagelo recto se interpreta como HOST – (a).	19
3. Diagrama estructural del espermatozoide.	21
4. Corte sagital de cabeza de espermatozoide en donde se observan los dominios de la membrana.	26
5. Partes de la membrana y axonema flagelar involucrado en la motilidad espermática.	28
6. Estructura de la mitocondria.	30
7. Host +, con acrosomas íntegros.	56
8. Host +, la flecha señala el acrosoma dañado.	56
9. Espermatozoide con reacción acrosomal.	56
10. Host +, la flecha señala el acrosoma ausente.	56
11. Diferentes grados de daño mitocondrial Grado 1 (a) y Grado 3 (b).	62
12. Diferentes grados de daño mitocondrial Grado 1 (a), Grado 2 (b) y Grado 4 (c).	62

13. Diferentes grados de daño mitocondrial Grado 1 (a), Grado 3 (b) y Grado 4 (c)	62
14. Evaluación de la motilidad general al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	80
15. Evaluación de la integridad de los acrosomas al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	80
16. Evaluación de la integridad de la membrana (HOST +) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	81
17. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 1) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	81
18. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 2) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	82
19. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 3) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	82
20. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 4) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	83
21. Evaluación de la suma total de mitocondrias dañadas (Grado 2, 3 y 4) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.	

Dedicatoria.

A mis padres:

María: Porque sin tu apoyo no lo hubiera logrado, por tu esfuerzo para que nuestra familia saliera adelante, por tus cuidados y por enseñarme que la mejor forma de ser exitoso en la vida es a través de los estudios, la dedicación y la superación diaria y por enseñarme que rendirse no es una opción, este logro definitivamente es tanto mío como tuyo.

Rafael: Porque aunque ya no estás aquí conmigo siempre lo estas en mis recuerdos y en mi corazón, papá sé que eres el ángel que guía mis pasos, te extraño y quiero dedicarte este logro para que también sea tuyo, sé que desde donde estés, estarás orgulloso de mí.

A mis hermanos:

Lupe: Por ser un ejemplo para mí, por compartir momentos tanto de felicidad como de gran tristeza y por crecer a mi lado.

Paty: Por tus consejos, por estar conmigo desde la infancia, espero encuentres un camino lleno de triunfos en tu profesión.

Joaquincito: Porque con tus travesuras, tu inocencia y tus sonrisas nos pones a prueba todos los días, aunque no te esperábamos trajiste mucha alegría a nuestra casa, espero te conviertas en un hombre de bien y crezcas lleno de felicidad, recuerda que siempre seré tu hermana y tu apoyo.

A mis sobrinitas:

Elenita y Fátima: Por traer alegría y felicidad a mi vida, espero que algún día me vean como un ejemplo a seguir, sepan que su tía siempre estará con ustedes para ser su confidente, cómplice y amiga.

A mis primas: Quisiera nombrarlas a todas pero son muchas, pero saben que cada una de ustedes son especiales para mí, espero sigamos teniendo momentos de alegría y locura y sigamos siendo unidas en momentos difíciles, me siento bendecida al tenerlas.

A mis amigos: Graciela, Lety, Oralia, Miriam, Angélica y Braulio, personitas especiales que me mando dios y que se volvieron parte de mi familia, porque siempre están cuando los necesito, dándome ánimos, no dejándome caer, brindándome consejos, los quiero muchísimo.

A Joaquín: Por tu apoyo moral y económico y por hacer más feliz a mi madre.

Muchas Gracias a todos ustedes, son el regalo que dios me ha dado y espero algún día retribuirles algo de lo mucho que me han dado y por eso quiero dedicarles este triunfo, a cada uno de ustedes, quiero decirles que los amo profundamente y siempre los llevo en mi corazón.

He finalizado mi tesis con la esperanza de un futuro maravilloso y este es solo el primer paso de ese futuro que con mucho esfuerzo lograre...

Agradecimientos.

Agradezco a Dios por todos esos ángeles que ha puesto en mi camino porque todos ellos me han dado una lección de vida. Por darme perseverancia en los días grises en los cuales me quería rendir, por darme salud, dedicación y constancia para hacer realidad este sueño.

Gracias infinitas a mis asesores de tesis, el Dr. Oscar Gutiérrez Pérez y la Dra. Susana Espinosa Hernández, los cuales a pesar de su apretada agenda siempre se hacían un espacio para atenderme y terminar este proyecto y que a pesar de las dificultades nunca dejaron de apoyarme, los admiro profundamente, de ustedes me llevó grandes conocimientos, gracias además por brindarme su valiosa amistad, es una bendición el haberlos conocido, sin la colaboración de ambos esto definitivamente no hubiera podido ser posible.

Al MVZ Juvencio García Sánchez, así como al Ing. Orlando responsable del CTG en Tlaxcala el cual se tomó la molestia de proporcionarme las dosis para la realización de este trabajo.

A la empresa IMV technologies por todo el material para llevar a cabo este proyecto.

A mí jurado por sus aportaciones para mejorar este trabajo: María Elena Trujillo, Jorge Hernández, Alejandra Mercadillo y Héctor Flores.

A los docentes del DMZC en especial el Dr. Iván Sánchez Betancourt jefe del departamento, la Dra. Carmen Mercado por aceptarme como su ayudante un honor trabajar con usted, a las Dras. Rosalba Carreón, Alejandra Mercadillo y Esperanza Galván, que me aguantaron tantas horas en el laboratorio, mostrándose siempre accesibles ante cualquiera de mis dudas. A Miriam que se quedó hasta tarde en el laboratorio a apoyarme cuando sentía que nada salía como esperaba. Al personal del laboratorio, los cuales siempre estuvieron dispuestos a prestarme su ayuda y además me brindaron su amistad, fui afortunada al conocer a personas tan buenas y amables.

A los amigos que conocí en la carrera y de los cuales siempre recibí apoyo en todo momento: Graciela, Oralia, Adrianita, Lety y Adriancito, los adoro niños.

A mis compañeros del SS los cuales fueron mi apoyo durante el tiempo que permanecí en el CEIEPP: Miriam, Rafita, Gustavo, Daniel, Erick y Ray y al Dr. Roberto Martínez encargado del CEIEPP y tutor, por las facilidades otorgadas durante mi SS.

A mí amada FMVZ y a la UNAM, por ser mi segunda casa y darme tantas experiencias maravillosas y tantos conocimientos nuevos, aquí conocí gente genial que se volvió parte importante en mi vida y docentes que me transmitieron un poco de su amplio conocimiento, a todos ellos muchas gracias.

A los animalitos que se prestaron para que yo pudiera aprender de ellos y con los cuales quiero seguir trabajando toda mi vida. A mis amados puerquitos.

1. RESUMEN.

CLAUDIA IVETT REYES FELIPE: EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL EN DOSIS SEMINALES DE CERDO, UTILIZANDO EL DILUYENTE DE LARGA DURACIÓN GEDIL®. (Dirigida por el Dr. Oscar Gutiérrez Pérez y la MVZ MC. Susana Espinosa Hernández).

El objetivo de este estudio fue estandarizar la prueba de la Diaminobenzidina (DAB), con el fin de realizar una evaluación de la funcionalidad de la mitocondria de los espermatozoides de cerdo almacenados en un diluyente de corta duración y uno de larga duración y hacer una comparación de los resultados obtenidos al día 1 y 10 de almacenamiento. Para ello se utilizaron dosis seminales de 5 machos activos en granja, realizando 3 muestreos por cada semental. A cada muestra se le realizó un espermograma básico y para la formación de grupos experimentales se identificaron dos botellas con el diluyente Gedil® y como grupo control otras dos botellas con el diluyente de corta duración BTS®, las cuales correspondían a los días de evaluación de la prueba. En el día 1 y 10 de almacenamiento se hizo el procesamiento de las muestras correspondientes, a través de la evaluación de la motilidad general, seguidamente se realizó la prueba dual Coomassie/HOST en el que se hizo un conteo de al menos 200 células por muestra para obtener el porcentaje de HOST+ (es decir aquellas células que respondieron a la prueba de osmoresistencia hipo osmótica) y además para el porcentaje de integridad acrosomal. Se estandarizó la prueba de la DAB y se hizo una evaluación de la funcionalidad mitocondrial en cada grupo en el que se realizó un conteo de mínimo 200 células por laminilla, con la siguiente clasificación: Grado 1 (la pieza intermedia del espermatozoide estaba teñida al 100%, el color era marrón uniforme), Grado 2 (la pieza intermedia estaba teñida en un porcentaje mayor al 50%, el color era marrón uniforme), Grado 3 (la pieza intermedia estaba teñida en un porcentaje menor al 50%, el color era marrón uniforme o marrón pálido) o Grado 4 (la pieza intermedia no estaba teñida, no se presentaba coloración de ningún tipo). Encontrando que los resultados para motilidad general fueron en el día 1: $83.00 \pm 0.81\%$, $83.66 \pm 0.90\%$ y en el día 10: $37.00 \pm 2.53\%$, $51.67 \pm 1.59\%$. Para el porcentaje de acrosomas íntegros en el día 1: $85.07 \pm 1.52\%$, $91.50 \pm 0.49\%$ y en el día 10: $32.99 \pm 3.21\%$, $52.81 \pm 3.59\%$. En cuanto al porcentaje de HOST + los resultados fueron en

el día 1: $40.00 \pm 2.28\%$, $50.28 \pm 2.24\%$ y en el día 10: $19.50 \pm 2.00\%$, $29.22 \pm 1.75\%$. Respecto a la prueba de la DAB el porcentaje para el Grado 1, en el día 1 de almacenamiento: $80.88 \pm 1.64\%$, $83.92 \pm 1.35\%$ y en el día 10: $12.93 \pm 1.14\%$, $23.52 \pm 1.97\%$, para el Grado 2, en el día 1 de almacenamiento: $14.98 \pm 1.51\%$, $12.32 \pm 1.17\%$ y en el día 10: $69.91 \pm 1.68\%$, $62.70 \pm 1.91\%$, para el Grado 3, en el día 1 de almacenamiento: $3.01 \pm 0.133\%$, $2.75 \pm 0.25\%$ y en el día 10: $13.77 \pm 0.79\%$, $10.76 \pm 0.67\%$, para el Grado 4: $1.11 \pm 0.24\%$, $0.99 \pm 0.28\%$ y en el día 10: $3.38 \pm 0.33\%$, $3.01 \pm 0.22\%$, además se realizó una evaluación del porcentaje total de mitocondrias dañadas (suma de grados 2, 3 y 4) encontrándose los siguientes resultados, en el día 1 de almacenamiento: $19.1 \pm 1.88\%$, $16.06 \pm 1.7\%$ y en el día 10: $86.61 \pm 2.8\%$, $76.4 \pm 2.8\%$. Todos estos resultados fueron del diluyente BTS[®] y Gedil[®] respectivamente. Los resultados se analizaron con la prueba estadística de Mann-Whitney. Al comparar los resultados de ambos diluyentes se encontraron diferencias significativas al día 10 ($p < 0.05$) y una disminución progresiva en motilidad general. En porcentaje de acrosomas íntegros se encontraron diferencias significativas al día 1 y 10 de almacenamiento ($p < 0.05$) y una disminución progresiva. En cuanto al porcentaje de HOST+ se encontraron diferencias significativas al día 1 y 10 de almacenamiento ($p < 0.05$) y una disminución progresiva. Para la prueba de la DAB, en Grado 1 se presentaron diferencias significativas al día 10 ($p < 0.05$) y una disminución progresiva, en Grado 2 se presentaron diferencias significativas al día 10 ($p < 0.05$) y un aumento progresivo, en Grado 3 se presentaron diferencias significativas al día 10 ($p < 0.05$) y un aumento progresivo y para el Grado 4 a pesar de que hubo un aumento progresivo no se presentaron diferencias significativas. En todas las pruebas realizadas el diluyente Gedil[®] mostró ser superior.

1.1 ABSTRACT.

CLAUDIA IVETT REYES FELIPE: MITOCHONDRIAL FUNCTION ASSESSMENT IN DOSES SEMINAL SWINE, USING THE LONG TERM DILUENT GEDIL[®]. (Directed by Dr. Oscar Gutiérrez Pérez and MVZ. MC. Susana Espinosa Hernández)

The aim in this work was to standardize the Diaminobenzidine test (DABt) in order to make a comparison between the mitochondrial functionality of boar sperm stored in both a short and long term extenders. This involved the use of 5 Boars with the assessment of three ejaculates for each boar. Each sample underwent basic semen analysis. Two semen samples for each boar was diluted in Gedil[®] extender and two semen samples was diluted in BTS[®] extender. On day 1 of storage first samples of both extenders and then to 10 days of storage second sample of both extenders was assessed to motility average followed by dual Coomassie/ HOST test. At least 200 cells per sample was counted and the HOST + (ie cells responded to hipo osmotic resistant test) and acrosome integrity was reported DAB test was standardized to assessment mitochondrial functionality in each group which that conducted a count at least 200 cells per slide, with the following grade classification: 1 (the sperm midpiece was stained 100 %, showed an uniform brown color), 2 (sperm midpiece was stained up than 50% with an uniform brown color), 3 (midpiece was dipped in less than 50%, and the color was uniform brown or pale brown) and 4 (mid piece was not stained) Findings of progressive motility were on day 1: 83.00 ± 0.81% , 83.66 ± 0.90 % and on day 10 : 37.00 ± 2.53 % , 51.67 ± 1.59 %. For acrosome integrity results on day 1 showed a 85.07 ± 1.52 % , 91.50 ± 0.49 % and on day 10: 32.99 ± 3.21 % , 52.81 ± 3.59 %. In terms of percentage of HOST + the results were on day 1 : 40.00 ± 2.28 % , 50.28 ± 2.24 % and on day 10 : 19.50 ± 2.00 % , 29.22 ± 1.75 %. For testing of the DAB , the rate for Grade 1 , on day 1 of storage : 80.88 ± 1.64 % , 83.92 ± 1.35 % and on day 10 : 12.93 ± 1.14 % , 23.52 ± 1.97 % for the Grade 2 , on day 1 of storage : 14.98 ± 1.51 % , 12.32 ± 1.17 % and on day 10 : 69.91 ± 1.68 % , 62.70 ± 1.91% for the Grade 3 , on day 1 of storage : 3.01 ± 0.133 % , 2.75 ± 0.25 % and on day 10: 13.77 ± 0.79% , 10.76 ± 0.67 % for the Grade 4 : 1.11 ± 0.24 % , 0.99 ± 0.28 % and on day 10 : 3.38 ± 0.33 % , 3.01 ± 0.22 % , also an evaluation of the total percentage of damaged

mitochondria (sum of grades 2, 3 and 4) meeting the following results , on day 1 of storage : $19.1 \pm 1.88 \%$, $16.06 \pm 1.7 \%$ and on day 10 : $86.61 \pm 2.8\%$, $76.4 \pm 2.8 \%$. All these results were diluent BTS[®] and Gedil[®], respectively. The results were analyzed with the statistical test of Mann -Whitney. When comparing the results of both extenders were no significant differences at day 10 ($p < 0.05$) and a progressive decline in motility. In intact acrosome percentage differences were significant at day 1 and 10 of storage ($p < 0.05$) and a progressive decrease. In terms of percentage of HOST + significant difference at day 1 and 10 of storage ($p < 0.05$) and a progressive decrease. To test for the DAB, in Grade 1 were significant differences at day 10 ($p < 0.05$) and a progressive decrease in Grade 2 were significant differences at day 10 ($p < 0.05$) and a progressive increase in Grade 3 differences were significant at day 10 ($p < 0.05$) and a progressive increase for Grade 4 and even though there was a progressive increase was not significantly different. In all tests the diluent Gedil[®] shown to be superior.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Importancia de la Inseminación Artificial.

La inseminación artificial (IA) en su sentido amplio se define como la transferencia de los gametos del macho para llegar al óvulo por medios distintos al apareamiento natural. ^{1,2}

La IA es ampliamente utilizada por los productores de la especie porcina de todo el mundo, jugando un papel fundamental en la mejora de la producción porcina mundial.^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7}. Es una de las mejores herramientas para aumentar la eficiencia reproductiva, permite una mayor difusión del material genético, además de tener ventajas de manejo y sanitarias. Su uso se ha incrementado con el propósito de aprovechar al máximo a los verracos con los que se cuentan y disminuir así los costos de producción. ^{1, 2, 3, 6, 7}

En nuestro país más de un 60% de las cerdas en producción tecnificada son inseminadas artificialmente y esta tendencia va en aumento día con día.⁴ Sin embargo para lograr una IA adecuada es necesario hacer una evaluación de la calidad seminal para poder partir de una materia prima adecuada a lo hora de elaborar las dosis seminales. ^{1, 2, 8, 9, 10, 11}

2.2 La evaluación de la calidad seminal.

Por calidad seminal se entiende el conjunto de parámetros que caracterizan la viabilidad del espermatozoide. En un principio se hacía referencia a los caracteres que definen la morfología y el movimiento de los espermatozoides, pero posteriormente se le han añadido otra serie de parámetros que tienen por objetivo cuantificar de algún modo la funcionalidad del espermatozoide. ^{8, 9, 10}

La calidad seminal ha sido tradicionalmente evaluada a través del espermiograma clásico. ^{8, 9, 10, 11}

2.2.1 Espermiograma.

Se define como espermiograma, a un conjunto de pruebas macroscópicas y microscópicas de una ejecución relativamente simple, que pueden ser realizadas con un costo moderado y cuyo fin es permitir la diferenciación entre eyaculados aptos y no aptos para la IA. ^{8, 9, 10, 11}

Las características que deben tener los espermatozoides de un eyaculado fecundante son: motilidad progresiva, morfología normal, metabolismo energético, capacidad para desarrollar una motilidad hiperactivada, integridad estructural y funcional de la membrana, integridad de las enzimas asociadas con la fecundación, capacidad de penetración y transferencia óptima del material genético. ^{1, 2, 8, 9, 10, 11}

A continuación se describen las características macro y microscópicas a evaluar:

2.2.2 Características macroscópicas.

El análisis macroscópico del eyaculado consiste en una valoración general y rápida de aquellas características del mismo, que se pueden evaluar a simple vista, de primera intención y sin la utilización de equipos especiales. Aunque, la valoración de estas características es imprecisa y subjetiva, proporcionan información especialmente valiosa ante problemas muy evidentes de calidad. ^{2, 11} A continuación se enlistan y se definen:

Color: El color normal de un eyaculado es blanco variando la consistencia y tonalidad de acuoso transparente a cremoso amarillento. La presencia de otras coloraciones en el eyaculado puede ser indicador de diferentes patologías, contaminación o mala praxis en la recogida. Normalmente, cuando el eyaculado tiene un color amarillento está contaminado con orina, mientras que si es rosáceo, lo cual denota la presencia de sangre, se debe de sospechar de alteraciones patológicas del tracto genitourinario. ^{1, 2, 11}

Olor: Debe de ser *sui generis*, cualquier olor representa una alteración. ^{1,2}

Volumen: Según la edad, tamaño testicular, raza y estado fisiológico de cada verraco el volumen del eyaculado oscila entre 100 y 500 ml, pero el rango más frecuente en un verraco adulto es de 200-300 ml y el volumen de fracción rica (fracción espermática) del eyaculado oscila entre 50 y 125 ml aproximadamente. ^{1, 2, 11}

La obtención de eyaculados con un bajo volumen es normal en verracos muy jóvenes, pero en verracos adultos, puede deberse a un defecto en la espermatogénesis, de una sobreutilización del macho o de algún tipo de patología, causando una baja fertilidad. ^{9, 11}

pH: Los valores normales varían de 7.2 a 7.8. El pH es únicamente un indicador de la actividad metabólica de los espermatozoides, ya que al envejecer el eyaculado se aumenta la concentración de ácido láctico y con esto se da un descenso del valor del pH. ^{1,2}

Temperatura: Es importante registrar y controlar la temperatura del semen para evitar las variaciones durante todo su procesamiento para prevenir una disminución en la viabilidad de los espermatozoides. Es importante mantener el semen a una temperatura constante de 35-36°C antes de diluir. ^{1,2}

2.2.3 Características microscópicas.

El espermiograma clásico incluye una batería de pruebas microscópicas para la valoración relativamente precisa de la calidad de un eyaculado, en función de la cual se determinará su rendimiento productivo. Estas pruebas requieren por lo menos de un microscopio para su valoración. ^{1,2}

Motilidad (movimiento general o masa).

La motilidad es el parámetro de calidad espermática más comúnmente utilizado para determinar la viabilidad del eyaculado. Dado que es necesaria una buena motilidad para alcanzar el lugar de la fecundación y culminar exitosamente el proceso de penetración del espermatozoide en el ovocito, tradicionalmente, ha sido considerada como uno de los factores mejor correlacionados con la capacidad fecundante.^{9, 10, 11}

El procedimiento para su evaluación es sencillo, se coloca una gota del eyaculado sobre un portaobjetos y se tapa con un cubreobjetos ambos atemperados a 37°C. Se observa en un microscopio óptico de 100 a 200 aumentos (10x-20x) y se analiza el movimiento superficial que refleja la movilidad de las células en su conjunto, otorgándole un valor porcentual de 0-100%. Se consideran valores de buena calidad seminal los superiores al 75% mientras que aquellos eyaculados con motilidades inferiores al 60% no son aptos para IA.^{1, 2, 10, 11}

Vigor (tipo de movimiento o motilidad individual).

Una vez determinado el porcentaje de espermatozoides móviles de la muestra, se procede a la valoración de la motilidad individual y la calidad de movimiento. Para ello, se observa la muestra con un microscopio a 100 a 400 aumentos (10x-40x) y se observan varios campos, al evaluar este parámetro, se observan diferentes movimientos, desde nulo, movimientos lentos, en círculos o vibratorios, hasta movimientos rectos y rápidos, para evaluar el tipo de movimiento de los espermatozoides se les da un valor en una escala de 0 a 5:

Valor de 0: Sin movimiento (necropermia)

Valor de 1: Sin movimiento progresivo, girando sobre sí mismos.

Valor de 2: Con movimientos anormales y algunos progresivos.

Valor de 3: Con movimientos progresivos lentos y sinuosos.

Valor de 4: Con movimientos progresivos rápidos.

Valor de 5: Con movimientos progresivos muy rápidos.

El vigor tiene una alta correlación con la capacidad individual de almacenaje del semen de cada verraco. ^{1, 2, 10, 11}

Aglutinación.

La aglutinación consiste en la unión de varios espermatozoides formando acúmulos siendo la unión cabeza-cabeza la más frecuente, aunque también se observan uniones cabeza-cola y cola-cola y que puede ser observado durante la contrastación con el microscopio, tanto en el eyaculado fresco, como en el semen diluido en conservación. ^{11, 12}

Es un parámetro de gran importancia ya que, reduce la capacidad fecundante de la dosis al entorpecer el movimiento progresivo de los espermatozoides necesarios para ascender hasta el oviducto donde se produce la fecundación e induce a la degradación de la célula espermática. ¹¹

El grado de aglutinación suele medirse de 0 a 3. El grado 3 de aglutinación corresponde a más de un 30-40% de espermatozoides aglutinados. Si esta aglutinación se une a otros parámetros, como baja motilidad y presencia de abundantes formas anormales, se recomienda no continuar el procesado del eyaculado. ^{2, 12}

En algunas ocasiones, la presencia de aglutinación leve, desaparece al realizar la mezcla del eyaculado con el diluyente, gracias a la estabilización química que proporciona éste, observándose posteriormente, una disminución importante de la presencia de espermatozoides aglutinados en las dosis conservadas. ^{2, 12}

Existen varios tipos de aglutinación según su origen y el estado de la célula espermática: ¹¹

- Aglutinación verdadera: se usa este término para definir la formación de agregados formados por células vivas. A su vez existen, según su origen, dos tipos de aglutinación verdadera:
 - Aglutinación bioquímica: producida por alteraciones de la composición proteica y mineral del plasma seminal, relacionadas con fenómenos inflamatorios de las glándulas accesorias. También ha sido relacionada con la pérdida o alteración de ciertas proteínas de la membrana espermática.
 - Aglutinación inmunomediada: como consecuencia de fenómenos de auto-inmunidad, el sistema inmunológico del verraco elabora anticuerpos anti-espermatozoide. Como consecuencia de esta unión específica antígeno-anticuerpo, se produce la precipitación y la aglutinación espermática.
- Aglutinación falsa: con este término se definen aquellos casos en que los acúmulos de espermatozoides están formados por células muertas. Es el tipo de aglutinación más frecuente en los centros de IA y puede tener múltiples orígenes como, por ejemplo, una temperatura de recogida inadecuada, alteraciones en el diluyente, contaminación del eyaculado con orina o características genéticas del propio verraco.¹¹

Grado de contaminación (Agregación).

Se valora de la misma forma que el grado de aglutinación. Se considera un eyaculado contaminado a aquel que presente sustancias, objetos o microorganismos que forman parte de él. Los contaminantes pueden ser células inflamatorias (leucocitos) que pueden observarse después de procesos infecciosos, células epiteliales de descamación, que aunque están presentes de manera normal por la renovación de los epitelios del tracto reproductivo, después de procesos inflamatorios se pueden hallar en una mayor cantidad. Las bacterias, las excretas, el polvo de la sementalera, el talco de los guantes y la orina, también pueden ser contaminantes del

semen presentes por un pobre manejo higiénico a la hora de la recolección o un ambiente inadecuado (corrientes de aire). La contaminación bacteriana puede comprobarse mediante su aislamiento bacteriológico.²

Concentración espermática.

Esta se define como el número de espermatozoides presentes por mililitro en un eyaculado o una dosis seminal.

Cualquier centro de inseminación debe garantizar a sus clientes que las dosis seminales proporcionadas contienen el número de espermatozoides necesario para asegurar niveles óptimos de fecundidad. Por ello, la correcta evaluación de la concentración espermática es fundamental en el proceso del eyaculado ya que va a permitir determinar el número máximo de dosis seminales que se pueden elaborar en cada caso.^{2, 10, 11}

La concentración espermática se puede calcular con diferentes instrumentos como: el espectrofotómetro o el fotocolorímetro, la cámara de Bürker, y la cámara de Neubauer, entre otros, las cámaras son las que más se utilizan en el país.^{1, 2, 9, 10, 11}

El recuento con la cámara de Bürker es el método recomendado en granjas y pequeños centros de IA por su facilidad de cálculo y visualización a través del microscopio. El procedimiento es el siguiente:

Se realiza una dilución de semen puro 1:100 en una solución de citrato de sodio al 4%, posteriormente se toma una gota con pipeta Pasteur la cual se deposita en el retículo de la cámara. El contaje se realiza en un microscopio a 400 aumentos (40x) y contando el número de espermatozoides de cada platina que se encuentran dentro de 40 cuadrillos de cada una (**Figura 1.**), después se multiplica por 10, 000,000 para obtener la concentración de espermatozoides por mm^3 .^{1, 2}

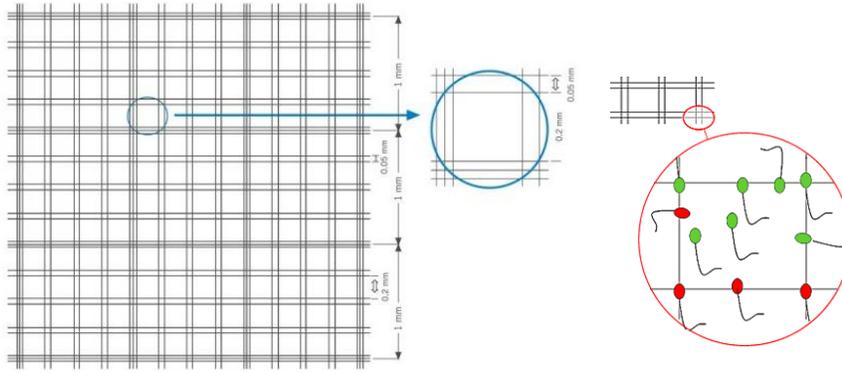


Figura 1. Recuento espermático en cámara de Bürker. Adaptado de ^{13, 14}.

El uso de un espectrofotómetro o fotocolorímetro permite agilizar el proceso productivo, es un método rápido y de fácil uso, que se ha extendido en gran medida en los grandes centros de IA porcina, donde se procesa un gran número de muestras seminales. El sistema se basa en la capacidad de medir la luz que atraviesa una determinada solución y un receptor que mide la luz transmitida que se relaciona con la concentración de espermatozoides. ^{9, 11}

La concentración espermática de un eyaculado puede verse afectada por diversos factores como la raza, edad, frecuencia de extracción o la época del año. Posiblemente, este es el motivo por el cual no existe consenso a la hora de establecer los valores fisiológicos en ganado porcino (**Cuadro 1.**). No obstante, la mayoría de los autores consideran como valor límite 300×10^9 espermatozoides. ^{9, 11}

Cuadro 1. Volumen y concentración espermática del eyaculado de verraco según distintos autores.

Eyaculado	Volumen medio (ml)	Concentración (10^9 spz/ml)	Autor
Completo	250 (150-500)	100 (25-300)	Mann y Lutwak-Mann, 1981
Completo	180	400-600	Xu et al., 1996
Fracción rica	40-100	400-1300	Martínez et al., 1992
Fracción rica	108.3	740	Saiz et al., 1994

Adaptado de ¹¹.

Malformaciones espermáticas.

Es un parámetro que nos indica si los espermatozoides procedentes del semen tienen alteraciones morfológicas que pueden afectar su capacidad reproductiva. Numerosos trabajos han puesto de manifiesto una relación inversa entre el porcentaje de formas anormales en el eyaculado y la capacidad fecundante del mismo. Por este motivo, el estudio de la morfología espermática constituye un factor de suma importancia en la elaboración de dosis seminales para IA. ^{1, 9, 11}

Las malformaciones espermáticas de acuerdo a su origen se dividen en tres grupos en: anomalías primarias, secundarias y terciarias (**Cuadro 2.**) ^{1, 2, 11}

Las **anomalías primarias**, ocurren a nivel de testículo durante el proceso de la espermatogénesis y de la espermiogénesis, son lo que se denomina espermatozoides aberrantes.

Las **anomalías secundarias** se presentan durante el proceso de la maduración a nivel de epidídimo.

Un aumento en la cantidad de ambos tipos de anomalías en los espermatozoides de más del 15% trae como consecuencia una disminución de la fertilidad hasta 12% y también un lechón menos al parto. ^{1, 2, 11}

Una tercera división son las **malformaciones terciarias** que son provocadas por el mal procesado de la muestra y/o la elaboración de dosis (colas dobladas, colas sueltas, cabezas hinchadas, cabezas sueltas y acrosoma desprendido).

Existen diversas técnicas para la valoración de la morfología espermática, desde las técnicas clásicas de microscopía óptica, hasta las complejas técnicas de microscopía electrónica o el análisis computarizado de imagen. El elevado costo y la dificultad técnica de estas últimas, ocasionan que en los machos destinados a producción se utilicen normalmente diferentes tipos de tinciones: Tripán azul, Cristal

violeta, Azul de metileno, Azul de anilina, Papanicolau, Giemsa y la más empleada por su sencillez y bajo costo la tinción con Eosina-Nigrosina.^{1, 2, 11}

Cuadro 2. Malformaciones espermáticas, de acuerdo a su origen.

Anormalidades primarias	Anormalidades secundarias
-Cresta nuclear	-Acrosoma vacuolado
-Defecto en la protuberancia acrosómica	-Aglutinación de flagelo con flagelo
-Defecto en el tamaño de la cabeza:	-Múltiples cabezas (dos, tres)
Macrocabeza	-Flagelo enroscado:
Microcabeza	Segmento intermedio
-Defecto en la forma de la cabeza: Ovalada, Elongada, Elíptica, Piriforme, Triangular, Cuadrangular, Achatada o Alargada.	Segmento principal Segmento terminal
-Flagelo grueso	-Gotas citoplasmáticas, proximal y distal
-Flagelo delgado	
-Múltiples flagelos	
-Flagelo largo	

Adaptado de ¹¹.

2.2.4 Pruebas de integridad y funcionalidad espermática.

En el trabajo diario en los centros de inseminación artificial se detectan animales que tienen una fertilidad reducida (sub-fértiles) y que al realizar un análisis de rutina presentan un espermiograma anormal. Sin embargo en otras ocasiones se presentan espermiogramas normales correspondientes a verracos infértiles o subfértiles. Por ello, ninguno de los parámetros del espermiograma clásico por sí solo parece ser suficiente para predecir adecuadamente la fertilidad, aunque la información combinada de todos ellos ofrece una buena estimación de la calidad seminal, permitiendo la clasificación y selección de los mejores eyaculados para su almacenamiento y aplicación.^{2, 6, 8, 9}

Es importante señalar que el análisis espermático básico no logra identificar daños específicos en la estructura y fisiología espermática que involucren su capacidad fertilizante y solamente lo hace en casos muy evidentes que pongan de manifiesto alteraciones en la morfología y/o motilidad espermática.⁶

Una vez que se reconoció que el espermiograma clásico no proporciona información confiable que permita predecir la fertilidad del verraco, fue necesario el desarrollo de nuevas pruebas que exploran la capacidad funcional de los espermatozoides.

Se define a una prueba funcional del esperma como un análisis de laboratorio de los procesos celulares exhibidos por los espermatozoides entre el momento en que dejan el líquido seminal hasta el paso final de la fertilización. Estas pruebas intentan determinar la capacidad de los espermatozoides para capacitar y fertilizar.^{2, 8, 15}

A continuación se describirán algunas de ellas:

2.2.5 Pruebas de integridad.

Viabilidad: células vivas y muertas.

Las pruebas de viabilidad, vitalidad o tinciones vitales reflejan una valoración del estado de la membrana plasmática del espermatozoide.

Para contar espermatozoides vivos y muertos se pueden utilizar diferentes medios de coloración, los cuales están fundamentados en los mecanismos de la integridad membranal, de tal manera que si está intacta no deja pasar colorante, como el Tripán Azul en donde el espermatozoide vivo se observa blanco y el muerto en azul o la Eosina-Nigrosina en donde el espermatozoide vivo se ve blanco y el muerto rojizo.^{2, 11, 16}

Otras técnicas son apoyadas con el uso de microscopio de contraste de fases, microscopía electrónica o de barrido, también se pueden usar tinciones fluorescentes como: ioduro de propidio, bromuro de etidio o hidroetidina y naranja de acridina.^{2, 12}

Los valores de vitalidad considerados normales oscilan entre el 75 y el 90%, mientras que el valor límite por debajo del cual se considera al eyaculado no apto para inseminación es del 60%.¹¹

Valoración del estado del acrosoma.

El acrosoma consiste en una vesícula que se presenta en la porción anterior de la cabeza espermática la cual juega un papel crucial en la fecundación y que por cambios fisiológicos (capacitación espermática y reacción acrosomal) y actividad hidrolítica de las enzimas que contiene, le es posible la penetración al ovocito. La presencia de anomalías morfológicas de esta región está asociada a una reducción de la fertilidad.^{1, 2, 9, 10, 11, 17}

En un espermatozoide que tenga el acrosoma en perfectas condiciones se pueden distinguir tres regiones claramente diferenciadas en la cabeza: la zona acrosomal, con su borde apical, la zona postacrosomal y el segmento ecuatorial entre ambas. Estas corresponden a su vez a los tres diferentes dominios de membrana de la cabeza espermática.^{2, 10}

Existen diferentes tinciones para determinar el estado del acrosoma entre estas tenemos: tinciones simples con Giemsa; tinciones dobles como Kovacs y Foote (K-F) que es a base de Tripán azul y Giemsa; rojo Congo y Tripán azul o bien con una triple tinción, la eosina-fast Green, la eosina-nigrosina, amarillo naftol S, eritrosina B, Azul de Coomassie y tinciones comerciales como el Spermac[®]. Las muestras también pueden ser observadas en contraste de fases después de la fijación con glutaraldehído, mientras que otras técnicas más laboriosas incluyen la utilización de anticuerpos y lectinas marcadas con fluorocromos o bien técnicas de microscopía electrónica de transmisión.^{1, 2, 9, 10, 11, 17}

Las alteraciones de la morfología del acrosoma son debidas a procesos fisiológicos asociados por un lado al envejecimiento de la célula espermática y por otro al proceso de fecundación. No obstante también se producen cambios en el acrosoma como consecuencia de shock térmico, en los procesos de congelación-descongelación,

en los cambios de presión osmótica, por diluciones y por lavados, centrifugaciones repetidas o contaminación bacteriana. Esta alteración cuando es inducida se conoce como capacitación inducida, criocapacitación en el caso de la congelación o capacitación por envejecimiento en el caso del semen almacenado. El porcentaje de acrosomas intactos considerado normal en la especie porcina es mayor del 60%.^{9, 11}

2.2.6 Pruebas funcionales.

Las técnicas de viabilidad (tinciones vitales) evalúan la integridad estructural de la membrana plasmática del espermatozoide, requisito indispensable para la buena funcionalidad de la misma. Sin embargo, no siempre la integridad estructural va unida a la funcionalidad de la membrana, siendo esta última la que juega un papel fundamental en la capacitación y la reacción acrosomal, en el mantenimiento del metabolismo espermático y en el proceso de unión a la superficie del ovocito.^{2, 9, 10, 11, 18}

Debido a que el espermatozoide es un osmómetro natural que trata de mantener el equilibrio osmótico intracelular ante cualquier agresión exógena, las pruebas que se utilizan para analizarla se basan en el principio de que una célula espermática inmersa en una solución hipoosmótica captará agua en un intento de restablecer el equilibrio entre las presiones osmóticas a ambos lados de la membrana celular, este principio se cumplirá si dicha estructura se encuentra íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente.^{2, 17}

Para analizar la funcionalidad de las membranas se han desarrollado diversas técnicas entre las que se encuentran el test de endósmosis o hipoosmótico (HOST), test de resistencia osmótica (ORT) y evaluación de la funcionalidad de la membrana con sustancias fluorescentes.

2.2.7 Pruebas de osmolaridad.

Prueba de Hipoosmolaridad: HOST.

La prueba de HOST (Hypo Osmotic Sweeling Test/ Test de estrés hipoosmótico/Host test/Prueba de endosmosis) consiste en someter al espermatozoide a un estrés hipoosmótico (75-150 mOsm/Kg) (la fisiológica es 300 mOsm/Kg) a 37°C, durante un tiempo que oscila entre los 5 y los 120 minutos según protocolos.

En cualquier caso, aquellos espermatozoides cuyas membranas son funcionales tratarán de reestablecer su equilibrio osmótico permitiendo la entrada de agua al interior. Esta entrada de agua, produce un aumento del volumen espermático provocando que la membrana espermática se expanda, disminuyendo drásticamente la relación superficie/volumen. La zona de la cola espermática parece más sensible a las condiciones hipoosmóticas y se produce el fenómeno conocido como torsión de la cola (**Figura 2.**)^{2, 9, 10, 17, 18}

El enrollamiento o torsión de la cola comienza en la zona distal y progresa hacia la porción intermedia y la cabeza del espermatozoide. Los medios hipoosmóticos utilizados deben producir una diferencia osmótica suficiente para inducir un enrollamiento de la cola que pueda ser observado y no excesivamente elevada para no provocar la lisis de la membrana espermática.⁹

Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo. Los valores obtenidos en esta prueba se correlacionan con otros parámetros de calidad seminal, como la motilidad, la viabilidad o la morfología.^{9, 17}

Se ha desarrollado una prueba dual de corta duración, en la que se evalúa a la vez acrosoma y membrana y que facilita su uso en los centros de IA.²

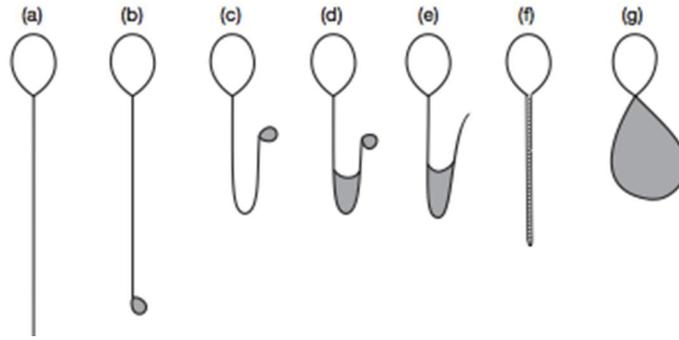


Figura 2. Espermatozoides con flagelo enrollado (HOST +), aquel con flagelo recto se interpreta como HOST - (a). Adaptado de ¹⁹.

Prueba de Resistencia Osmótica: ORT.

El test de resistencia osmótica (*Osmotic resistance test*, ORT) consiste en la valoración de la resistencia de la membrana del acrosoma tras un periodo de incubación en condiciones isosmóticas (300 mOsm/Kg) e hiposmóticas (150 mOsm/Kg) y así evaluar las lesiones estructurales evidentes tras la incubación que se producen a nivel del acrosoma, de forma que aquellos que hayan sido capaces de resistir la agresión osmótica sin alteraciones acrosomales serán considerados como funcionales. ^{2, 9, 10, 11, 17}

Mediante esta técnica se evalúa la calidad espermática, detectándose una alta correlación positiva con la motilidad y con el número de acrosomas normales tanto para muestras congeladas como refrigeradas. Se ha demostrado que los verracos cuyos eyaculados presentan porcentajes más altos en el ORT ofrecen niveles superiores de fertilidad y prolificidad. ^{9, 10}

Se ha desarrollado una variante con un periodo de incubación de solo 5 minutos, denominado ORT corto (ORTC), que facilita su uso en los centros de IA. ^{10, 17}

2.3 El espermatozoide: estructura y función.

El espermatozoide es el producto final del proceso de gametogénesis en el macho, lo cual ocurre dentro de los túbulos seminíferos de los testículos. Es una célula haploide y portadora de la información genética paterna. Este proceso envuelve una serie de divisiones mitóticas de las células madre de las espermatogonias, dos divisiones meióticas de los espermatocitos, una extensa remodelación morfológica de los espermátides durante la espermiogénesis, y la liberación de células libres dentro del lumen de los túbulos seminíferos por espermiación.^{6, 17, 20, 21}

Morfológicamente podemos dividir al espermatozoide en tres componentes principales: la cabeza y el flagelo o cola y un cuello que une la cabeza del espermatozoide con su flagelo, el cual a su vez se subdivide en los segmentos medio, principal y caudal o terminal (**Figura 3.**), cabe mencionar que las dimensiones de cada uno de los componentes varían (**Cuadro 3.**)^{6, 11, 17, 20, 21}

Cuadro 3. Dimensiones normales del espermatozoide porcino.

Concepto	Longitud (µm)	Diámetro (µm)
Completo	45	
Cabeza	7	3.7
Cuello	0.7	0.5
Cola:		
-Pieza intermedia	9	0.7
-Pieza principal	26.2	0.4
-Pieza terminal	2.2	0.2

Adaptado de¹¹.

Cabeza.

Las cabezas de los espermatozoides de mamíferos presentan formas y tamaños muy variados, siendo la de cerdo ovoide. En la cabeza se distinguen: el núcleo, el acrosoma y cantidades moderadas de componentes del citoesqueleto y el citoplasma.

La característica principal de la cabeza del espermatozoide es el núcleo aplanado oval, que contiene cromatina muy compacta. La cromatina condensada consiste en un complejo formado por ácido desoxirribonucleico (ADN) y una clase especial de proteínas básicas llamadas protaminas espermáticas, las cuales son relativamente pequeñas (27-65 aminoácidos) y ricas en arginina y cisteína.

La cromatina nuclear está tan altamente condensada que es imposible la transcripción del ADN, por lo anterior ocupa un volumen significativamente menor que en las células somáticas. Este empaquetamiento parece ser necesario para proteger al material genético de un posible daño, durante el almacenamiento en el tracto reproductor masculino como en el tránsito por el aparato reproductor de la hembra. Su número cromosómico y, por tanto, el contenido de ADN nuclear es haploide; es decir, posee la mitad de cromosomas que el núcleo de las células somáticas de la misma especie. ^{6, 17, 20, 21}

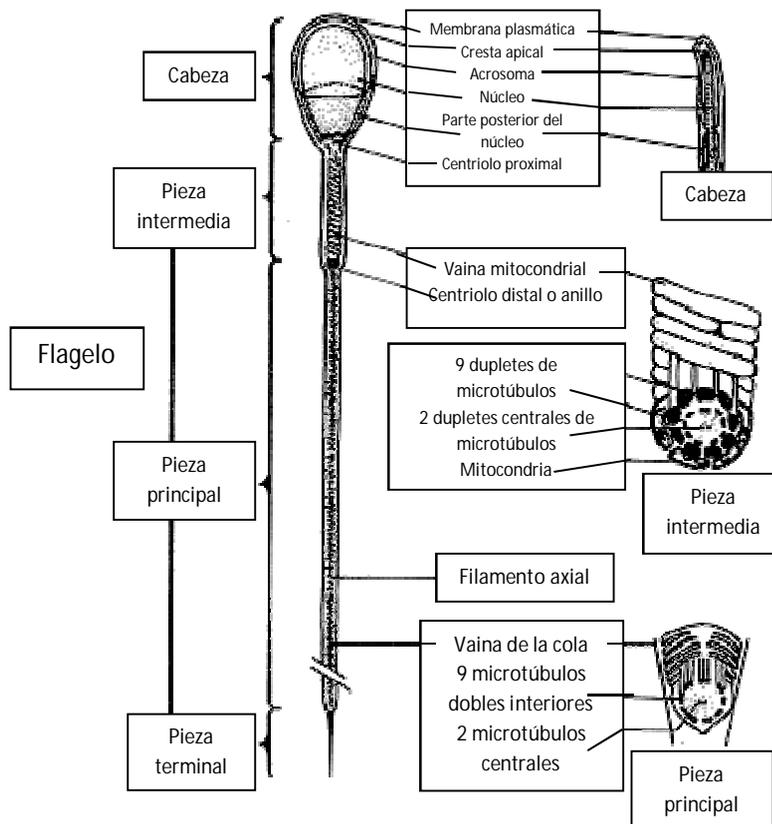


Figura 3. Diagrama estructural del espermatozoide. Adaptado de ²².

2.3.1 Acrosoma.

El acrosoma es una vesícula intracelular, membranosa y aplanada que cubre la parte anterior del núcleo. Este organelo se forma durante las últimas etapas de la formación del espermatozoide a partir del complejo de Golgi de las espermátidas. En el acrosoma distinguimos la membrana acrosomal interna y la membrana acrosomal externa. La membrana acrosomal interna se superpone a la parte anterior de la membrana externa del núcleo. Es continuo con la otra membrana acrosomal que se encuentra cerca de la superficie interna de la membrana plasmática en la parte anterior de la cabeza del espermatozoide.

El acrosoma consiste de dos segmentos, el capuchón del acrosoma (parte anterior del acrosoma) y el segmento ecuatorial (parte posterior del acrosoma) el cual corresponde a la distribución de los dominios de la membrana plasmática con los mismos nombres.

Es el único organelo del espermatozoide que es requerido para la fertilización en mamíferos. Múltiples enzimas están presentes en el acrosoma, incluyendo varias hidrolasas ácidas comúnmente encontradas en lisosomas y otras enzimas específicas a las células espermatogénicas. Durante la reacción acrosomal, el contenido acrosomal es liberado por el calcio mediante exocitosis en respuesta a señales específicas. Siguiendo la liberación y activación de enzimas acrosomales (**Cuadro 4.**), el espermatozoide penetra la zona pelúcida rodeando el ovocito, un proceso que puede ser bloqueado por proteasas inhibitoras.^{17, 20, 21}

Cuadro 4. Enzimas acrosomales.

Enzimas		
B-N-Acetilglucosaminidasa	Calpaina II	Beta-galactosidasa
Fosfatasa ácida	Dipeptidil-peptidasa	Neuraminidasa (sialidasa)
Acrosina	Estearasa	Peptidasa de tipo Catepsina-D y colagenasa
Aril-amidasa.	Fosfolipasa A ₂	Hialuronidasa
Aril-sulfatasa A	Fosfolipasa C	Aspartalamidasa

Adaptado de ^{6, 20}.

Flagelo o cola.

El flagelo del espermatozoide de mamíferos consta de cuatro segmentos distintos, la pieza de conexión (cuello), la pieza intermedia, la pieza principal, y la pieza final.^{17, 20, 21}

El *cuello*, también denominado pieza conectiva, se trata de una pequeña franja encargada de conectar la cabeza con la cola del espermatozoide. Los componentes principales del cuello son: el *capitulum*, las columnas estriadas, la placa basal y el anillo posterior. El cuello forma una placa basal que embona en una depresión en el extremo posterior del núcleo. Estas estructuras están alineadas con el centriolo, estructura desde la que se originan las fibras y microtúbulos de la cola y sirve como centro organizativo en la formación del axonema y las columnas estriadas. Sin embargo, la presencia del centriolo no es necesaria para la iniciación o propagación del movimiento ondulatorio de la cola.

La *pieza intermedia* se sitúa a continuación del cuello, conteniendo debajo de la membrana plasmática mitocondrias dispuestas helicoidalmente y envolviendo al axonema. La hélice mitocondrial está adherida a un complejo filamentoso subyacente llamado retículo submitocondrial; los filamentos de esta red se conectan entre si lateralmente y se fusionan con el *annulus*, en el punto de unión entre la pieza intermedia y la pieza principal. El axonema se compone de 9 pares de microtúbulos dispuestos radialmente alrededor de 2 filamentos centrales. El segmento medio está en disposición 9 más 2 de los microtúbulos está rodeado por 9 fibras gruesas o densas que al parecer están relacionadas con los 9 dobletes del axonema.

La *pieza principal*, que continúa en sentido posterior desde el anillo citoplasmático y se extiende casi hasta la punta de la cola, está formado por el axonema en el centro y sus fibras gruesas asociadas. La vaina fibrosa da estabilidad a los elementos contráctiles de la cola.

La *pieza caudal*, posterior a la terminación de la vaina fibrosa, contiene solo el axonema central cubierto por la membrana plasmática. El axonema da motilidad al

espermatozoide. Los pares externos de microtúbulos del patrón 9 más 2 generan las ondas de flexión de la cola por un movimiento deslizante entre pares adyacentes, conocido como bateo.^{17, 20, 21}

2.3.2 Membrana plasmática.

Todo el espermatozoide está contenido en la membrana plasmática, la cual se ensancha en áreas especializadas y forma el componente más externo del espermatozoide. Permanece intacta, excepto en la región del acrosoma previo a la fertilización o como resultado de la muerte del espermatozoide.

Una característica única del espermatozoide es que la membrana plasmática se subdivide en dominios regionales bien delineados que difieren en la composición y función.

Los principales dominios de la membrana plasmática de la cabeza del espermatozoide de la mayoría de los mamíferos son la región acrosomal (anterior de la cabeza) y la región postacrosomal (posterior de la cabeza) (**Figura 4.**).

La membrana plasmática de la región acrosomal se subdivide a su vez en dos segmentos, el subdominio marginal (sobre el margen anterior del acrosoma) y el subdominio ecuatorial (sobre la parte posterior del acrosoma).

La región postacrosomal, dominio que incluye la membrana plasmática entre el margen posterior del acrosoma y el cuello. El margen entre las regiones acrosomal y postacrosomal puede ser delimitado por la banda dentada, que circunda la cabeza del espermatozoide en el borde posterior del segmento ecuatorial.

El anillo posterior llamado *capitulum* que es la unión entre la cabeza y la cola y, aparentemente, forma un sello hermético entre los compartimentos citoplasmáticos de las dos porciones principales del espermatozoide. La membrana plasmática del flagelo se separa en el dominio pieza intermedia que recubre la vaina mitocondrial y la cola posterior del dominio.

La estructura general de la membrana está constituida por tres capas distintas: una bicapa de lípidos, una interfase fosfolípidos-agua y un glicocalix (**Figura 5.**).

La bicapa lipídica esta subdividida en fosfolípidos polares, que se orientan de tal forma que los grupos de cabezas polares hidrofílicas están situadas externamente y las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicas orientadas internamente unas a otras.

Los principales lípidos en la membrana son los fosfolípidos y el colesterol. Entre los fosfolípidos destacan la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la esfingomielina, la cardiolipina y pequeñas cantidades de fosfatidilserina y fosfatidilinositol. La fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina se encuentran en la capa interna, mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomielina se encuentran en la capa externa.

En estudios recientes realizados en células espermáticas de verraco, se observó que en eyaculados de alta calidad, la fosfatidilcolina está presente en mayor cantidad y la esfingomielina en menor proporción, disminuyendo y aumentando respectivamente cuando la calidad es peor.

La proporción fosfolípidos/colesterol es un indicador de la fluidez de la membrana, su relación molar no es constante entre especies, siendo para espermatozoides de verraco 0,20. El colesterol, junto con las proteínas integrales, actúa como estabilizador de la membrana. La concentración de colesterol varía en las diferentes regiones de la membrana plasmática, siendo en la región del acrosoma donde se presenta en mayor proporción.

La membrana plasmática del espermatozoide presenta una mayor proporción de proteínas que las membranas de las células somáticas, suponiendo hasta el 50% de la composición de la misma. Su presencia permite la realización de múltiples funciones, al actuar como: canales de paso de sustancias, enzimas, receptores o proteínas transportadoras.

La disposición de las proteínas en la membrana puede ser: desde aquéllas que se encuentran integradas en la misma (bien atravesándola completamente o bien

inmersas), a las que se encuentran adheridas a la misma de forma covalente o no, siendo su anclaje las proteínas integrales.

La capa más externa de la membrana es un glicocálix formado por oligosacáridos que se unen covalentemente a las proteínas y lípidos de membrana. Una de las funciones del glicocálix es proteger al espermatozoide de agentes físicos o químicos que pudieran dañarle, pero también puede intervenir en la interacción del espermatozoide con otras células.^{10, 17, 20, 23}

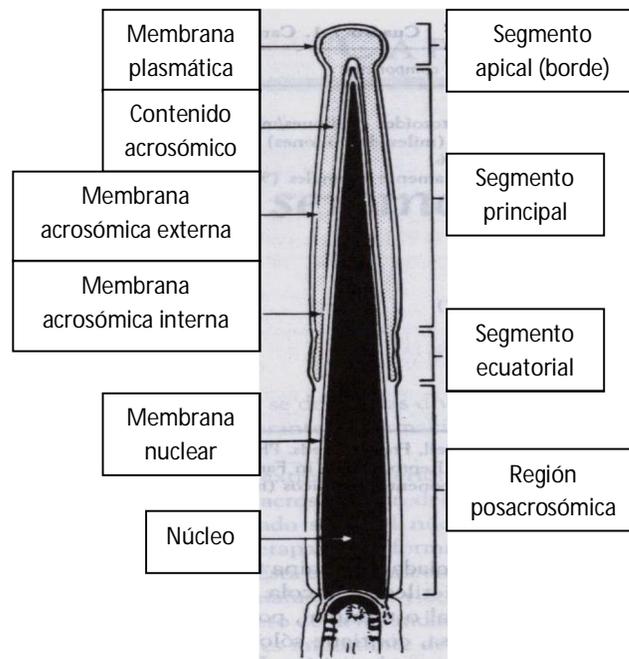


Figura 4. Corte sagital de cabeza de espermatozoide en donde se observan los dominios de la membrana. Adaptado de ²¹.

2.3.3 Motilidad espermática.

Los espermatozoides se mueven de manera distinta en diferentes puntos de su viaje desde el epidídimo hasta el ovocito, presentando dos tipos de movimiento: el movimiento progresivo y el movimiento de hiperactivación.

El movimiento progresivo es simétrico, de baja amplitud y moviliza al espermatozoide en línea recta, se presenta en el eyaculado fresco impulsa al espermatozoide a través del tracto femenino hasta el oviducto. El movimiento de hiperactivación es asimétrico y de una gran amplitud de la curvatura flagelar, lo que resulta en trayectorias en forma de ocho o circulares, teniendo como función ayudar al espermatozoide a despegarse del epitelio oviductal, alcanzar el sitio de fertilización y penetrar el *cumulus* de la zona pelúcida del ovocito. La hiperactivación utiliza mecanismos moleculares para generar el movimiento del flagelo cuyo eje funcional es el axonema y cuya proteína motora principal es la dineína (**Figura 5.**).

La motilidad del espermatozoide se desencadena por cambios en el medio iónico extracelular, por interacción con ligandos específicos y por glucosa, presentes en el líquido seminal y en el tracto reproductivo femenino; estos cambios inducen señales citosólicas flagelares, a través de la fosforilación de proteínas, de canales de Ca^{++} y de vías dependientes de nucleótidos cíclicos (GMPc y AMPc).

Los cationes y los aniones juegan un papel importante en la modulación de la motilidad espermática, el efecto mayor se atribuye a cationes tales como Ca^{++} , Na^{+} , K^{+} e H^{+} . El tránsito de estos cationes inducido por diferencias de concentración extra e intracelular, lleva a cambios en la composición iónica intracelular y subsecuentemente a cambios en el potencial funcional y de movilidad del espermatozoide.

La hiperactivación del flagelo se debe al Ca^{++} que se fija a sus proteínas fijadoras en el brazo externo de la dineína, lo que induce el movimiento asimétrico. Además del calcio, la hiperactivación requiere de AMPc, cuya producción parece estar modulada por las especies reactivas de oxígeno (ROS), entre las que se encuentran el superóxido (SO) y el óxido nítrico (ON). El superóxido se origina durante el transporte de electrones en la mitocondria y es transformado a peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (SOD).

La energía requerida para la motilidad proviene de azúcares del plasma seminal, principalmente fructosa que es metabolizada a través de la glicólisis y respiración aeróbica mediante enzimas localizadas a nivel de las subestructuras tales como; las

mitocondrias de la pieza media y las hexoquinasas de la pieza principal y cuyo objetivo principal es generar ATP o NADPH, por una de tres vías, dependiendo del dominio del flagelo: la glicolítica, la vía pentosa fosfato y la vía mitocondrial de la fosforilación oxidativa; ésta última fuente principal de ATP.

El ATP es necesario para la motilidad, y una de sus funciones es interactuar con ATPasas asociados con los brazos de dineína. La fosforilación de la dineína axonemal es un punto crítico en la regulación del inicio del movimiento flagelar ya que después de la fosforilación, la dineína ATPasa se activa, garantizando que el movimiento continúe como reacción en cadena de los nueve pares de microtúbulos externos generando el movimiento en forma de bateo.^{20, 24, 25, 26}

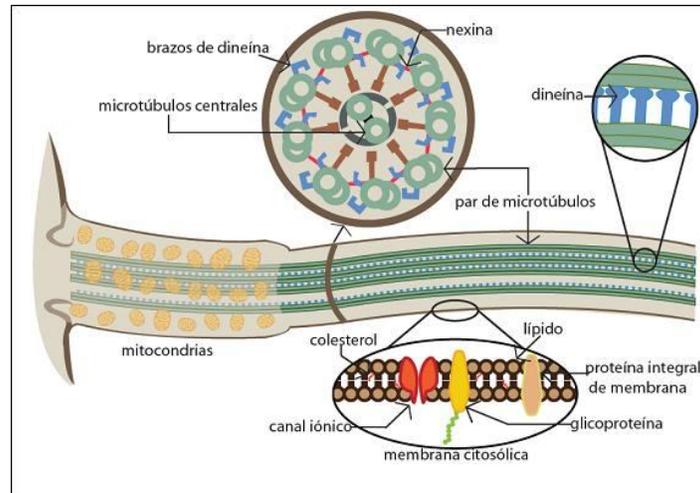


Figura 5. Partes de la membrana y axonema flagelar involucrado en la motilidad espermática. Adaptado de ²⁷.

2.4 Mitocondria: estructura y función oxidativa.

Las mitocondrias son los organelos responsables de la generación de ATP que será el combustible para que el espermatozoide obtenga y mantenga su motilidad. Por ser el organelo donde se realiza la fosforilación oxidativa es una estructura muy sensible a la generación de radicales libres y su alto contenido en citocromos permite algunas pruebas de laboratorio para identificar su estado funcional.

Las mitocondrias se envuelven helicoidalmente alrededor de las fibras densas exteriores en la pieza intermedia del flagelo de los espermatozoides. Por lo general, están dispuestos de extremo a extremo, pero el número de hélices paralelas, el número de giros, y la longitud de la pieza del medio varían entre las especies.²⁰

Estructura de la mitocondria.

Las dimensiones de la mitocondria guardan relación con su abundancia. Su anchura varía de 0.5 μm a 1 μm de anchura, y su longitud, de 1 μm a 7 μm . Las mitocondrias presentan dos membranas que se conocen como; membranas mitocondriales externa e interna, cada una de unos 7 nm de espesor. Entre ambas membranas hay un espacio de unos 8 nm conocido como espacio intermembrana o perimitocondrial. La membrana mitocondrial externa rodea a la mitocondria completa y sirve como límite exterior. La membrana interna presenta invaginaciones hacia el interior, que constituyen tabiques denominados crestas. Las crestas no llegan de un lado a otro de la mitocondria, por lo que la compartimentación que establecen es abierta. El compartimento interno de la mitocondria constituye la matriz mitocondrial la cual tiene una consistencia gelatinosa por la elevada concentración de proteínas hidrosolubles, además de tener varias enzimas, ribosomas, ADN (el cual es circular), gránulos osmiófilos e inclusiones lipídicas, junto con iones, pequeñas moléculas y macromoléculas no visibles (**Figura 6.**).

Existen notables diferencias entre la composición de la membrana interna y la membrana externa. La membrana externa tiene un 60% de proteínas y un 40% de lípidos. Contiene algo de colesterol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y escasa cardiolipina. Entre las proteínas se encuentran , una enzima

que oxida monoaminas a aldehídos (monoaminoxidasa), enzimas que intervienen en la degradación oxidativa de los lípidos (Acil-CoA sintetasa y fosfolipasa A), enzimas que fosforilan nucleósidos (nucleósido difosfatasa quinasa), el complejo para la inserción en la mitocondria de proteínas sintetizadas en el citosol, proteínas de la familia Bcl-2 que regulan la apoptosis y múltiples copias de una proteína llamada porina estas son proteínas integrales que poseen un canal interno relativamente grande (2 a 3 nm) rodeado por un barril de cadena beta, esta forma grandes canales acuosos que atraviesan la membrana y son permeables a moléculas menores de 10 kDa. Esto hace que la membrana externa sea permeable al agua, iones y sacarosa.

La membrana interna (incluidas las crestas) tiene un 80% de proteínas y un 20% de lípidos. Carece de colesterol y contiene fosfatidilglicerol y cardiolipina en mucha mayor proporción que la membrana externa. El alto contenido en cardiolipina la hace impermeable a los iones y sacarosa; las únicas especies que cruzan esta membrana lo hacen a través de transportadores específicos. Es más densa que la externa y posee muchas más proteínas, entre las que se encuentran el complejo para la inserción de proteínas sintetizadas en el citosol o en la matriz, enzimas de oxidación de ácidos grasos, transferasas, todos los componentes de la cadena transportadora de electrones y la enzima ATP sintetasa, que realiza la fosforilación oxidativa. ^{28, 29, 30}

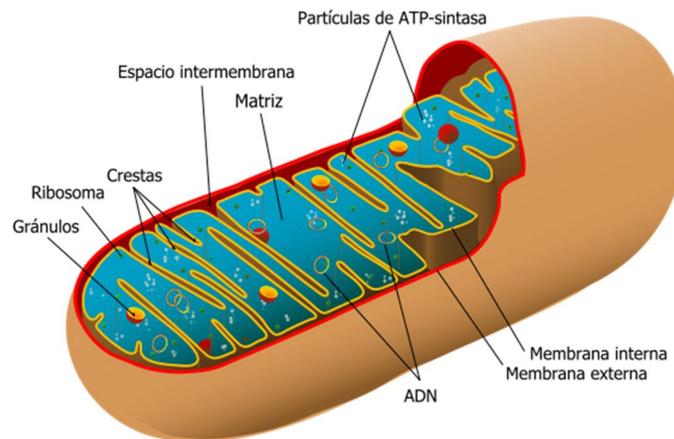


Figura 6. Estructura de la mitocondria. Adaptado de ³¹.

Función oxidativa.

Sin las mitocondrias, las células dependerían de la glucólisis anaerobia, que degrada la glucosa a piruvato, para obtener todo su ATP. Pero mientras que en la glucólisis anaerobia se obtienen sólo dos moléculas de ATP por cada molécula de glucosa degradada, en la mitocondria se forman 36 moléculas de ATP por cada una de glucosa. La oxidación de los glúcidos se realiza en el ciclo de Krebs. El piruvato, procedente de la glucólisis anaerobia de la glucosa y otros azúcares relacionados es transportado desde el citosol dentro de la mitocondria, donde el complejo enzimático piruvato deshidrogenasa lo transforma en acetil-CoA, el cual entra en el ciclo de Krebs de la matriz mitocondrial, oxidándose a CO_2 y generando $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ y FADH_2 .

El $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ y el FADH_2 ceden los electrones, que son conducidos por la cadena transportadora de electrones, separándose de los protones, hasta que se reúnen de nuevo con estos y el O_2 para formar agua. Esta cadena comprende los siguientes componentes:

1. La FADH deshidrogenasa (complejo I) con una flavoproteína Fe-S.
2. La NADH deshidrogenasa (complejo II) con el grupo prostético FMN y una flavoproteína Fe-S.
3. La ubiquinona o coenzima Q, a la que los dos complejos anteriores ceden los electrones.
4. Los citocromos b-c₁ (complejo III), de unos 500 kDa, en forma de dímero; cada monómero contiene dos grupos hemo (con Fe) y una proteína Fe-S. Reciben los electrones de la ubiquinona.
5. El citocromo c, que recibe los electrones del complejo III.
6. La citocromo-oxidasa (complejo IV), de unos 300 kDa, que forma un dímero que contiene los citocromos a y a₃ con dos grupos hemo y un grupo con Cu. En este complejo se unen los electrones recibidos del citocromo c con los protones y con el O_2 para formar H_2O , consumiéndose alrededor del 90% del O_2 utilizado por la célula.

La transferencia de electrones por la cadena respiratoria está acoplada a la síntesis de ATP a partir de $\text{ADP} + \text{P}$. Este proceso de fosforilación dependiente del transporte electrónico recibe el nombre de fosforilación oxidativa. Se han formulado varias teorías para explicar este acoplamiento, pero la que mejor lo explica es la hipótesis quimiosmótica de Mitchell. La transferencia de electrones bombearía protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranoso, produciendo un gradiente de concentración (una unidad de pH) y eléctrico (0.16 V), debido a la impermeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los protones. La energía obtenida en los procesos oxidativos se almacena así en forma de un gradiente electroquímico de protones, que será utilizado en la fosforilación y en otros procesos que requieren energía. La fosforilación la lleva a cabo la ATP sintetasa mitocondrial a través de esta fluyen protones hacia la matriz mitocondrial a favor del gradiente electroquímico y ese paso energiza la reacción $\text{ADP} + \text{P} = \text{ATP} + \text{H}_2\text{O}$, acumulándose el ATP en la matriz mitocondrial.

El rendimiento de la síntesis de ATP varía según la procedencia de los electrones utilizados por la cadena respiratoria. Se forman 2.5 moles de ATP por cada mol de $\text{NADH}^+ + \text{H}^+$ y 1.5 moles de ATP por cada mol de FADH_2 .^{28, 29, 30}

Evaluación de la función mitocondrial.

Para la tinción de la mitocondria tenemos a nuestra disposición diversos fluorocromos, tratándose de sustancias catiónicas y lipofílicas por lo que difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática y se acumulan en la matriz mitocondrial, la cual presenta carga negativa.³²

En el estudio de este organelo se ha empleado la Rodamina, sustancia que se acumula en el interior de la matriz mitocondrial produciendo una fluorescencia verde si la mitocondria desarrolla el proceso de respiración de forma activa, pero no nos indicará la intensidad del mismo. Este no es el caso del 5,5,6,6'-tetracloro- 1,1',3,3' ioduro tetraetilbezimidazolilcarbocianina (JC-1), sustancia que atraviesa de forma selectiva las membranas mitocondriales en su forma monomérica; si el potencial de

membrana es bajo la mantiene y emite fluorescencia verde, sin embargo si el potencial de membrana es alto se agrega y emite fluorescencia roja.^{33, 34}

También tenemos a nuestra disposición las tinciones comerciales específicas para mitocondrias MitoTracker[®] ; una de ellas, el MitoTracker[®] Green FM, es utilizado por Pinart et al., como parte de un protocolo de tinción que combina el estudio por citometría de flujo de la vitalidad espermática, la integridad acrosómica y la funcionalidad mitocondrial del espermatozoide de cerdo.^{32, 35}

2.5 Prueba de DAB.

Este método se basa en la oxidación de la 3,3' diaminobenzidina (DAB) por el complejo citocromo C mitocondrial (incluida la citocromo C oxidasa) presente en la cadena de transporte de electrones.

En la primera fase de la reacción, la peroxidasa (la citocromo C actúa como una) y el peróxido de hidrógeno (ROS) forman un complejo que interacciona con la DAB, quedando esta última en estado oxidado. Las moléculas de la DAB, una vez oxidadas, presentan unos radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón.

Clásicamente se asocia a la mitocondria como la gran productora de energía del organismo en forma de ATP durante el metabolismo aeróbico, pero también es una fuente muy importante de producción de ROS por la cadena de transporte de electrones.

La denominación de ROS es normalmente utilizada para describir una variedad de moléculas y de radicales libres derivados del oxígeno molecular. Químicamente un radical libre se define como cualquier átomo, grupo de átomos o moléculas en un estado particular con un electrón desapareado ocupando un orbital externo. El electrón desapareado tiene una fuerte tendencia a interaccionar con otros electrones, para así ganar una configuración electrónica más estable y formar un enlace químico. Mediante

esta acción, la molécula atacada se convierte a su vez en un radical con lo que empieza una reacción en cadena.

El estrés oxidativo en los sistemas biológicos se da cuando la producción de ROS supera la actividad de las defensas antioxidantes. Estas especies son capaces de modificar químicamente todas las biomoléculas de la célula, por ejemplo, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, cambiando su estructura y también su función. Estudios demuestran que la falta de motilidad espermática se asocia con el estrés oxidativo ya que elevadas concentraciones de ROS inhiben las enzimas relacionadas con la fosforilación oxidativa y/o la glicolisis limitando la producción de ATP.

La motilidad espermática es directamente proporcional al volumen de ATP producido por las mitocondrias localizadas en la pieza intermedia. El espermatozoide puede experimentar reducción en la motilidad debido a dos factores: decremento en la producción de ATP por la mitocondrias o por lesión de las proteínas constituyentes del axonema.^{36, 37, 38, 39, 40, 41}

2.6 Diluyentes.

La rentabilidad de la técnica de la IA en la especie porcina, ha sido posible en gran medida gracias al desarrollo y a la mejora de los diluyentes destinados al semen.

Por diluyente entendemos la solución acuosa que permite aumentar el volumen del eyaculado hasta conseguir las dosis necesarias, preservar las características funcionales de los espermatozoides y conservar su capacidad fecundante, para mantener un nivel de fertilidad adecuado durante el mayor tiempo posible.^{1, 3, 11, 42}

Funciones del diluyente.

Las principales funciones del diluyente son (**Cuadro 5.**): ^{1, 3, 11, 42}

- Crear espacio entre los espermatozoides disminuyendo la aglutinación.
- Proporcionar nutrientes a la célula espermática.
- Proteger al espermatozoide del shock térmico.
- Evitar la intoxicación celular asociada a la acumulación de desechos metabólicos; ello se logra gracias a sustancias adicionadas y a los quelantes encargados de captar iones de Ca^{++} Mg^{++} y Zn^{++} .
- Evitar las fluctuaciones de pH mediante buffers que garanticen un rango de pH entre 6.8 y 7.4
- Controlar la presión osmótica. Para ello el diluyente debe ser isotónico con el semen (290-300 mOsm/Kg).
- Inhibir el desarrollo microbiano gracias a los antibióticos que contienen.
- Controlar la precipitación de las proteínas.
- Controlar la acción enzimática sobre el semen.
- Controlar el metabolismo de la célula espermática y la preservación de su membrana.
- Estimular el transporte espermático.
- Permitir la adición de otras sustancias para mejorar el transporte espermático.

Cuadro 5. Composición química general de los diluyentes para semen porcino.

Componente	Función	Sustancias empleadas
Nutrientes	Fuente de energía	Glucosa, galactosa, ribosa o trehalosa.
Agentes taponadores (buffers)	Control de pH	-Bicarbonato, citrato (sódico) capacidad de tamponar limitada. -TES, HEPES, MOPS, TRIS regulan el pH en un rango más amplio.
Electrolitos	Control de presión osmótica	Cloruro de potasio, cloruro de sodio.
Estabilizadores de membrana	Previenen o retardan alteraciones no deseadas en la estructura y la función de las membranas.	Seroalbúmina bovina (BSA), etilén disódico diamino tetraacetato (EDTA), hidroxitolueno butilado (BHT), polivinil pirrolidona (PVP-40) y alcohol polivinílico.
Antibióticos	Frenan crecimiento bacteriano	Gentamicina, lincomicina, neomicina, espectinomina, penicilina y estreptomina.

Adaptado de ^{1, 3, 11, 42}

Tipos de diluyentes.

A nivel práctico en las condiciones actuales de producción los diluyentes se han clasificado en tres grupos, los que tienen como objetivo la conservación a corto plazo (menos de 1-3 días), a mediano plazo (por 4 días) o aquéllos que tienen por objetivo la conservación a largo plazo (más de 4 días).

Los primeros se utilizan principalmente en estructuras de distribución de las dosis seminales a corta distancia, si el semen va a ser utilizado rápidamente, dentro de las 24-48 horas siguientes a su obtención, lo más económico es emplear un diluyente de corta duración tipo BTS.

Las ventajas que aportan los diluyentes de larga duración son la posibilidad de transporte a largas distancias, permiten realizar pruebas diagnósticas sobre el semen antes de ser utilizadas, como pruebas mediante técnicas PCR (Polymerase Chain Reaction) para detectar la presencia de diversos virus o análisis completos de la calidad seminal, permite una mejor organización de las tareas en los centros de recogida seminal y facilita en gran medida la distribución de las muestras a las granjas de reproducción.

En cualquier caso, debe tenerse en cuenta que la elección de un diluyente debe estar acorde con las necesidades técnicas de la explotación. Finalmente hay que tener en cuenta que el gasto en diluyente constituye una mínima parte de los gastos de la explotación y su importancia para el proceso reproductivo justifica con creces dicho gasto. ^{1, 3, 11, 38, 39 (42, 43)}

Algunos ejemplos de diluyentes agrupados por su duración se muestran a continuación:

- Corta duración (1-3 días):

Beltsville Liquid (BL-1), Beltsville Thawing Solution (BTS), Illinois Variable Temperature (IVT), Kiev.

- Mediana duración (4 días):

V.S.P. Fórmula.

- Larga duración (más de 4 días):

Gedil[®], Acromax[®], Androhep[®], Modena, MULBERRY III[®], Reading, X-Cell[®], Zorlesco, ZORPVA, MR-A, GEPZ, SCK-7, Vital fórmula, Schonow, Verdunnungsmischung MIII.

Uno de los primeros diluyentes formulados para la especie porcina y que se conserva como el más utilizado en la explotación o centros de IA es el Beltsville Thawing Solution (BTS). Este diluyente se diseñó en la universidad de Beltsville y se desarrolló en un principio como una solución (solution) de descongelación (thawing). Al ver que la congelación no era una opción rentable para la producción comercial se pensó en utilizar al BTS como un diluyente de uso cotidiano ya que confería la propiedad al espermatozoide de mantener motilidades a temperatura de cuarto hasta por tres o cuatro días.

Con el mayor conocimiento obtenido en la funcionalidad espermática al pasar el tiempo, el BTS se fue modificando sirviendo como plataforma para el desarrollo de diluyentes con la capacidad de mantener la viabilidad y fertilidad espermática por periodos más largos de almacenamiento.

Así se crearon diluyentes de mediana duración que aportaban quelantes que secuestran iones favoreciendo el intercambio iónico intracelular y la respuesta espermática al medio de dilución. Posteriormente se diseñaron diluyentes más complejos que aportan estabilizadores de membrana parecidos a los que aporta el plasma seminal por lo que el tiempo de fertilidad de la célula espermática se ve prolongado durante su almacenamiento. La composición de algunos de estos diluyentes se muestra en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Composición (en g/l) de los diluyentes de inseminación artificial porcina más utilizados.

	IVT	Kiev	BTS	Zorlesco	ZORPVA	Reading	Modena	Androhep
Glucosa	3	60	37	11.5	11.5	11.5	25	26
Citrato sódico	24.3	3.7	6.0	11.7	11.65	11.65	6.90	8.0
EDTA		3.7	1.25	2.3	2.35	2.35	2.25	2.4
Bicarbonato sódico	2.4	1.2	1.25	1.25	1.75	1.75	1.00	1.2
Cloruro potásico	0.4		0.75					
Acetilcisteína	0.05							
HEPES								9.0
BSA				5.0			3.00	2.5
TRIS				6.5	5.5	5.5	5.65	
Ácido cítrico				4.1	4.1	4.1	2.00	
Cisteína				0.1	0.7	0.7	0.05	
Trehalosa						1		
PVA					1	1		
mOsm	290	380	330	240	275	300	282	309
pH		7.2	7.2				6.9	6.8

Adaptado de ³

Efecto diluyente.

Los espermatozoides se diluyen con los fluidos seminales de las glándulas accesorias en la eyaculación y su motilidad es retenida por unas horas. Para extender su supervivencia *in vitro*, es necesario reducir la actividad metabólica por inhibidores químicos o mediante la reducción de la temperatura, que también requiere dilución.

Además de una prolongada vida útil, los espermatozoides de mamíferos responden a la dilución por un aumento inicial de la actividad, seguido de una pérdida de la motilidad y un aumento al daño de la membrana. Con una dilución excesiva, especialmente cuando se utiliza un medio puro de electrolitos, hay una pérdida considerable de la viabilidad celular.

No hay explicaciones definitivas para este efecto llamado efecto de dilución, pero Watson (1995) considera este término para indicar la lesión de la célula, como una consecuencia de la pérdida de componentes intracelulares y / o dilución de un agente protector en el líquido seminal. Una reducción en la concentración de los componentes importantes del plasma seminal pueden contribuir al efecto, que puede ser eliminado por la adición de albúmina. Además, las adiciones mínimas de concentraciones milimolares de K^+ también pueden ayudar a mantener la motilidad de los espermatozoides, así como una alta concentración de K^+ en el fluido seminal es esencial para la viabilidad celular.

Harrison et al. (1982) propuso que el efecto de dilución es debido a la ausencia de los estimulantes de la motilidad proteicos de plasma seminal y mostró que la albúmina de suero podría estimular la motilidad de una manera reversible. Cuando los espermatozoides se lavaron en ausencia de albúmina, un aumento de la tendencia a pegarse a las superficies de vidrio indicó cambios de superficie de membrana.

Waberski et al. (1989) encontró que la albúmina de suero bovino (BSA) estimuló la motilidad de los espermatozoides durante una prueba de almacenamiento de seis días. Buhr (1990), por el contrario, utiliza BSA en un intento de superar la fluidez de la membrana, y por lo tanto el efecto nocivo de lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, producidos por enfriamiento. Se supuso que los cambios en la fluidez de la membrana de lípidos podrían afectar el movimiento trans-membrana de Ca^{2+} , que es esencial en el proceso de capacitación pero perjudicial durante el almacenamiento. Sin embargo, la BSA indujo sólo una disminución temporal en la fluidez de la membrana, que era difícil de interpretar. Sin embargo, la BSA mejoró la fertilidad cuando el semen se almacenó entre 3 y 5 días. ⁴⁴

3. JUSTIFICACIÓN.

La buena calidad seminal de una dosis es un factor indispensable para una IA exitosa, dentro de esta calidad es importante la integridad y funcionalidad del espermatozoide. A medida que el conocimiento sobre la estructura espermática avanza y la IA porcina cobra más relevancia es necesaria la elaboración de nuevas pruebas que nos permitan evaluar con mayor precisión al espermatozoide. Entre ellas podemos encontrar técnicas que analizan la funcionalidad de las mitocondrias, estructuras de gran importancia en el espermatozoide, pues son las responsables de generar su motilidad a través de la generación de energía en forma de ATP, con el fin de que se lleve a cabo una fecundación exitosa, por lo que es necesario tomarlas en cuenta al momento de realizar un espermiograma.

Un aspecto importante para mantener la calidad espermática sobre todo la integridad de las diferentes estructuras que forman un espermatozoide, son los diluyentes ya que en ellos radica mantenerlos completos y funcionales a través de sus componentes y en base a la calidad de estos variará el tiempo de vida espermática.

Por lo anterior el presente trabajo se enfocó en la estandarización de una prueba que evaluará la funcionalidad mitocondrial en semen porcino y que además evidenciará las diferencias e importancia de los componentes de los diluyentes de corta y larga duración a nivel de protección de sus mitocondrias.

4. HIPÓTESIS.

La preservación de semen hasta por 10 días en un diluyente de larga duración (Gedil®) no tendrá efecto detrimental en la función mitocondrial del mismo.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Evaluar la funcionalidad mitocondrial de los espermatozoides de verraco diluidos con el diluyente de larga duración por medio de la prueba de Diaminobenzidina (DAB).

5.2 Objetivos específicos:

- Estandarizar la prueba de Diaminobenzidina (DAB), para su aplicación en la evaluación de las mitocondrias de espermatozoides de cerdo.
- Evaluar la motilidad de las dosis seminales para comprobar su capacidad de conservación.
- Evaluar la integridad de la membrana del espermatozoide a través de la prueba de HOST, para comprobar capacidad de conservación de la dosis.
- Evaluar la integridad del acrosoma a través de la tinción azul brillante de Coomassie.

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

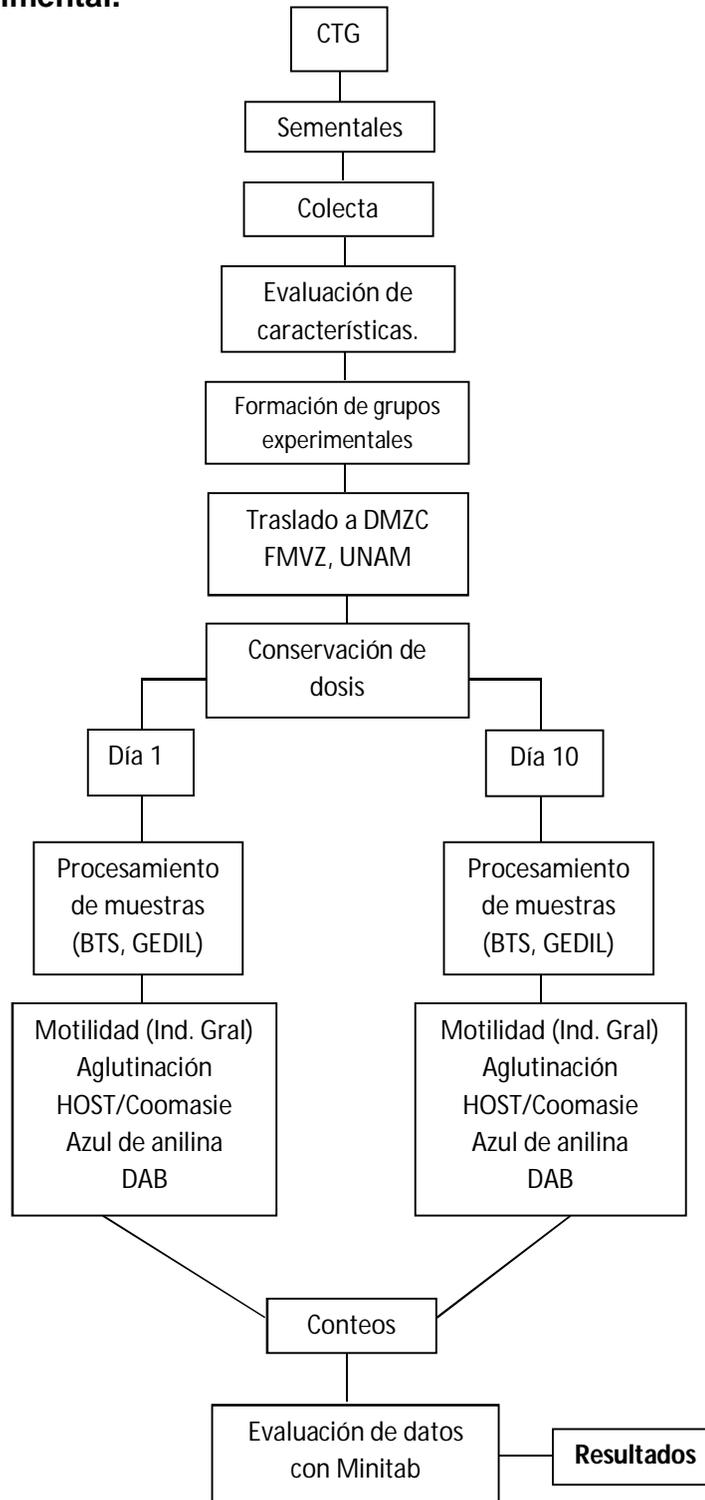
La realización del presente trabajo se llevó a cabo en un Centro de Transferencia Genética (CTG), ubicado en: Municipio de Apizaco, Estado de Tlaxcala. El clima es templado subhúmedo y su temperatura media anual es de 14°C.

El CTG tiene en su línea de producción 50 sementales provenientes de una empresa de genética internacional, alojados en corrales individuales, el espacio vital era el indicado para estos (6 m²), con comedero tipo canoa y bebedero tipo chupón. La alimentación de los sementales es a través del alimento que ellos mismos elaboran y se les proporciona dos veces al día.

Algunos de los métodos de bioseguridad que manejan son un baño a la entrada y a la salida de la granja y el acceso sólo a personal autorizado.

Los muestreos se realizaron los días lunes y se repitieron 3 veces, con un lapso de tiempo de 3 semanas entre cada uno, se obtuvieron las dosis seminales de cinco sementales en edad reproductiva, fertilidad comprobada y activos en granja. La toma de muestras se realizó entre los meses de Abril-Junio.

6.1 Diagrama experimental.



En las instalaciones del CTG, para cada uno de los muestreos, se realizó lo siguiente:

Al momento de recibir cada una de las dosis seminales que se obtuvieron a través de la técnica de la mano enguantada, se procedió a tomar la identificación del semental y la línea genética.

Evaluación de características macroscópicas:

Se evaluaron algunas características macroscópicas de los eyaculados procesados como: volumen con la ayuda de una balanza digital, color, olor y temperatura con la ayuda de un termómetro de vidrio. En cuanto a sus características microscópicas se evaluó la motilidad y la concentración espermática se obtuvo con la ayuda de un espectrofotómetro.

Formación de grupos experimentales:

Se utilizó un sobre de diluyente Gedil® y uno de BTS® (ambos de IMV technologies®), los cuales se disolvieron individualmente en un litro de agua bidestilada atemperada a 37°C (colocada en bolsa de plástico nueva y limpia), se homogenizó hasta disolver perfectamente el contenido del sobre y se dejó pasar un lapso de aproximadamente 20 minutos para cada diluyente.

En botellas especiales para inseminación (IMV technologies®) nuevas y limpias, se realizó una dilución de 1:10 en cada botella, agregando 5 ml de semen y 45 ml del diluyente correspondiente, según la identificación previa de cada botella.

En cada dosis de los cinco sementales se identificaron dos botellas con el diluyente Gedil® y como grupo control otras dos botellas con el diluyente de corta duración BTS®. Las cuales correspondían a los días de evaluación de la prueba (1 y 10 días).

Una vez diluida la dosis con su correspondiente diluyente (BTS o Gedil®) se procedió a evaluar la motilidad en masa/general y motilidad individual/progresiva de

ambos diluyentes para cada uno de los cinco sementales, la técnica se mencionará más adelante.

Traslado y conservación de dosis:

Las dosis se transportaron en una caja de unicel con refrigerantes y se aislaron con cartón para evitar el contacto directo con el refrigerante, así se mantuvieron hasta la llegada al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC), en la FMVZ-UNAM, en donde se colocaron en un conservador (Mobicool, Wine Chamber, Modelo D60, Geprüfte Sicherheit), el cual se conectaba y programaba a una temperatura de 15-17 °C para el almacenaje de las dosis y su procesamiento en los días 1 y 10, las botellas eran homogenizadas dos veces al día durante su permanencia en el conservador para evitar que los espermatozoides se sedimentaran y murieran.

El procedimiento consecutivo para cada una de las muestras fue el mismo tanto para las dosis diluidas con el diluyente Gedil[®] y para las dosis con el diluyente de corta duración BTS[®] usado como grupo control, como anteriormente se mencionó la diferencia radica en los días de evaluación de las dosis.

6.2 PROCEDIMIENTOS.

Motilidad.

Una motilidad progresiva es necesaria para alcanzar el lugar de la fecundación y para culminar exitosamente el proceso de penetración del espermatozoide en el ovocito, tradicionalmente, ha sido considerada como uno de los factores mejor correlacionados con la capacidad fecundante. El procedimiento que se llevó a cabo para su evaluación fue el siguiente:

1. Se colocaron 15 µl de la dosis por muestra sobre un portaobjetos previamente limpio y atemperado (37°C)

2. Se le colocó un cubreobjetos y se observó en un microscopio óptico de luz (Zeiss, Primo Star) a 10x para observar la motilidad general y después a 40x para su evaluación progresiva.

Prueba dual Coomassie/Host.

1. En un tubo de ensayo por muestra y previamente identificado, se colocaron 2 ml de agua destilada a 38°C, después se le adicionó 1 ml de semen, con su muestra correspondiente, quedando los tubos con un volumen final de 3 ml cada uno y teniendo una concentración de 75 mOsm. Se taparon los tubos, se colocaron en una gradilla y se incubaron a 38°C por 30 minutos en baño María (Grant Instruments-Cambridge LTD).
2. Pasado este tiempo se sacaron del baño María y se homogeneizaron suavemente con la mano.
3. Se realizó un frotis para cada muestra homogeneizada, para ello se colocó una gota de 15 µl sobre un portaobjetos previamente identificado por muestra, se puso otro portaobjetos atrás de la gota y se deslizó suavemente a lo largo de éste para realizar el frotis.
4. Se dejó secar a medio ambiente y después se procedió a poner el portaobjetos en un vaso Coplin, el cual ya tenía la tinción de Coomassie. Esta se hizo de la siguiente manera: 0.055 grs de azul brillante de Coomassie, 12.5 ml de Metanol al 50%, 2.5 ml de Ácido Acético al 10% y 25 ml de agua destilada. La laminilla se sumergió en ella por 5 minutos, se sacó del vaso, se enjuagó el frotis con agua destilada y se dejó secar al medio ambiente. Para conservar las estructuras celulares y realizar posteriormente la lectura, a cada portaobjetos se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

Conteos.

Una vez realizadas las laminillas correspondientes por muestra, se llevó a cabo el conteo, contando mínimo 200 células por laminilla, con la prueba dual Coomassie/HOST los espermatozoides se clasificaron de la siguiente manera: Reacción HOST (+) con acrosoma integro; Reacción HOST (+) con acrosoma dañado y reacción HOST (+) con reacción acrosomal/ausente.

Tinción de Azul de Anilina.

1. Se realizó un frotis con cada muestra (siguiendo la metodología descrita anteriormente para realizar el frotis).
2. Se dejó secar al medio ambiente y después se procedió a poner el portaobjetos en un vaso Coplin, el cual ya contenía la tinción de Azul de Anilina. La laminilla se sumergió por 5 minutos, se sacó del vaso, se enjuagó el frotis con agua destilada y se dejó secar al medio ambiente. Para conservar las estructuras celulares y realizar posteriormente la lectura, a cada portaobjetos se le aplicó una capa de resina y posteriormente se colocó un cubreobjetos.

Conteos.

La tinción con azul de Anilina no se utilizó para el conteo de anomalías en el espermatozoide, sino como una forma de control de la técnica de HOST, en esta técnica se contaron un mínimo de 200 espermatozoides, todos aquellos espermatozoides que se pudieran confundir con HOST (+), es decir todos aquellos que presentaran el flagelo enrollado o enroscado fueron contabilizados.

El resultado del conteo fue restado al conteo de la prueba dual Coomassie/HOST y después se obtuvo un porcentaje.

Prueba de la funcionalidad mitocondrial con Diaminobenzidina (DAB).

1. En un tubo eppendorf por muestra y previamente identificado se agregaron 300 μ l de PBS, después se procedió a agregar 200 μ l de semen en su tubo correspondiente con la ayuda de una micropipeta.
A partir de este punto se realizó todo con la ayuda de guantes debido a que esta sustancia es cancerígena y tóxica, por lo que se deben mantener medidas de precaución.
2. Se sacó la DAB (Dako, N° de catálogo K3468) del refrigerador (Torrey), es importante que se mantenga en refrigeración (2-8°C) para que no pierda su acción como cromógeno, luego se aplicó una gota (20 μ l) con la ayuda del gotero que contenía a la DAB a cada uno de los tubos eppendorf y se tapó cada uno.
3. Se homogeneizó cada tubo eppendorf agitándolo suavemente con la mano.
4. Se recortaron rectángulos de aluminio de aproximadamente 5x7 cm, estos se utilizaron para cubrir cada tubo eppendorf, cuidando que la luz no entrará a través del tubo e impidiera se llevara a cabo la reacción. Una vez cubiertos los tubos se colocaron en frascos de vidrio con agua previamente atemperada a la temperatura de incubación que fue de 37°C por una hora en baño María.
5. Una vez pasado este tiempo se sacaron del baño María y se les quitó el papel aluminio.
6. Se procedió a colocar los tubos eppendorf en una centrífuga procurando quedaran pares para que tuvieran el mismo peso, se utilizó una velocidad de 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos.
7. Transcurrido el tiempo de centrifugación, cuidadosamente se sacaron los tubos para mantener íntegra la pastilla de espermatozoides, se quitó el sobrenadante

con la ayuda de la micropipeta, tratando de que la pastilla quedara en el fondo del tubo.

8. Posteriormente se reconstituyó la pastilla con 400 µl de PBS, las muestras se homogenizaron con un Vortex (Apollo Continental Lab Products) durante 20 segundos para deshacer el botón.
9. Una vez homogéneas las muestras, se realizó un frotis, para ello se colocó una gota de 25 µl sobre la parte central de un portaobjetos previamente identificado por muestra y con la ayuda de un cubreobjetos se realizó una ligera presión sobre la gota para que por capilaridad se extendiera a lo largo del cubreobjetos. Es importante mencionar que como estos frotis fueron en fresco el conteo fue inmediato.

Conteos.

En cuanto a la técnica de la DAB, se contaron al igual que en las anteriores técnicas mínimo 200 espermatozoides por laminilla, el espermatozoide se clasificó de la siguiente forma, según su daño mitocondrial:

Grado 1: La pieza intermedia del espermatozoide teñida al 100%, color marrón uniforme.

Grado 2: La pieza intermedia teñida en un porcentaje mayor al 50%, el marrón uniforme.

Grado 3: La pieza intermedia teñida en un porcentaje menor al 50%, el color puede ser marrón uniforme o marrón pálido.

Grado 4: La pieza intermedia no teñida, no se presenta coloración de ningún tipo.

6.3 Toma de fotografías.

Las fotografías de las laminillas presentes en esta tesis fueron tomadas en el Instituto Nacional de Pediatría, a través de un microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51) equipado con una cámara (Olympus DP70) y el procesado de las imágenes se realizó a través de un programa de cómputo (Image proplus 5.1).

6.4 Análisis estadístico.

Una vez realizados los conteos de todas las laminillas se procedió a analizar la información obtenida en cada prueba con el paquete estadístico Minitab 15. Se realizaron las pruebas para obtener estadística básica por medio de la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y se aplicó una prueba de correlación lineal entre las variables obtenidas.

7. RESULTADOS.

Motilidad general.

Al comparar motilidad general entre los dos diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] evaluados al primero y al décimo día se observó que al día uno, que a pesar de haber una diferencia porcentual (0.66 puntos porcentuales de diferencia) no hubo diferencias significativas ($p=0.85$). En cuanto al décimo día se observó una diferencia significativa ($p=0.001$) y un mayor porcentaje de motilidad general (14.67 puntos porcentuales de diferencia) con el uso del diluyente Gedil[®].

Cuadro 7. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de motilidad general con el uso de los diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% Motilidad general
1	BTS	83.00 ± 0.81 ^a
	Gedil	83.66 ± 0.90 ^a
10	BTS	37.00 ± 2.53 ^a
	Gedil	51.67 ± 1.59 ^b

Se presentan medias ± error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$)

Porcentaje de acrosomas íntegros.

Al comparar la integridad acrosomal entre los dos diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] evaluados al primero y al décimo día, se vió que al día uno, el diluyente Gedil[®] presentó un mayor porcentaje de acrosomas íntegros (6.43 puntos porcentuales de diferencia) y esta diferencia fue significativa ($p=0.008$). En cuanto al décimo día también se observó una diferencia significativa ($p=0.0008$) y un mayor porcentaje de acrosomas íntegros (19.82 puntos porcentuales de diferencia) con el uso del diluyente Gedil[®].

Cuadro 8. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de acrosomas íntegros con el uso de los diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% Acrosomas íntegros
1	BTS	85.07 ± 1.52^a
	Gedil	91.50 ± 0.49^b
10	BTS	32.99 ± 3.21^a
	Gedil	52.81 ± 3.59^b

Se presentan medias \pm error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$)

Porcentaje de HOST +.

Al comparar la integridad de la membrana entre los dos diluyentes Gedil® vs BTS® evaluados al primero y al décimo día, se vio que al día uno, el diluyente Gedil presentó un mayor porcentaje de HOST + (10.28 puntos porcentuales de diferencia) y esta diferencia fue significativa ($p=0.0091$). En cuanto al décimo día también se observó una diferencia significativa ($p=0.005$) y un mayor porcentaje de acrosomas íntegros (9.72 puntos porcentuales de diferencia) con el uso del diluyente Gedil®.

Cuadro 9. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de HOST + con el uso de los diluyentes Gedil® vs BTS® al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% HOST +
1	BTS	40.00 ± 2.28^a
	Gedil	50.28 ± 2.24^b
10	BTS	19.50 ± 2.00^a
	Gedil	29.22 ± 1.75^b

Se presentan medias \pm error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$).

7.1 Fotografías: prueba dual Coomassie/HOST.

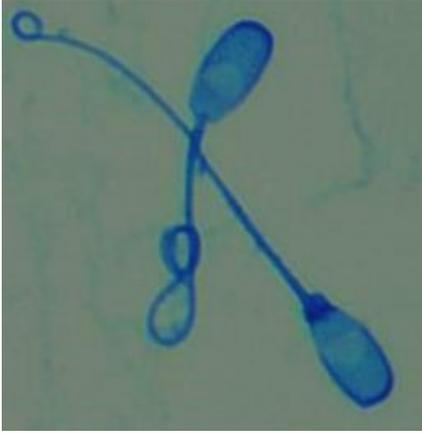


Figura 7. Host +, con acrosomas íntegros.

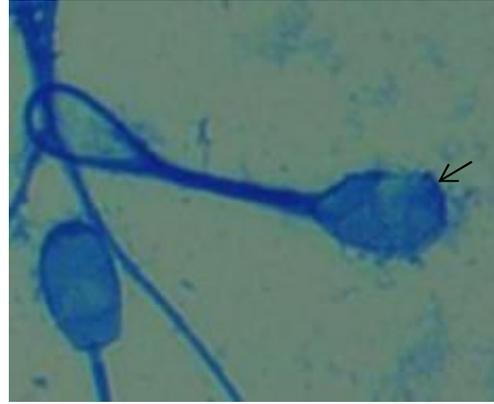


Figura 8. Host +, la flecha señala el acrosoma dañado.



Figura 9. Espermatozoide con reacción acrosomal.



Figura 10. Host +, la flecha señala el acrosoma ausente.

Porcentaje de mitocondrias Grado 1.

Al comparar la funcionalidad de la mitocondria otorgándole un Grado 1 (íntegras al 100%) entre los dos diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] evaluados al primero y al décimo día, se observó en el día uno que a pesar de haber una diferencia porcentual (3.04 puntos porcentuales) no hubo diferencias significativas ($p=0.198$). En cuanto al décimo día se observó una diferencia significativa ($p=0.001$) y un mayor porcentaje de mitocondrias funcionales (10.59 puntos porcentuales de diferencia) con el uso del diluyente Gedil[®].

Cuadro 10. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 1 con el uso de los diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% M. grado 1
1	BTS	80.88 ± 1.64^a
	Gedil	83.92 ± 1.35^a
10	BTS	12.93 ± 1.14^a
	Gedil	23.52 ± 1.97^b

Se presentan medias \pm error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$).

Porcentaje de mitocondrias Grado 2.

Al comparar la funcionalidad de la mitocondria otorgándole un Grado 2 (íntegras en más del 50%) entre los dos diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] evaluados al primero y al décimo día, se observó en el día uno que a pesar de haber una diferencia porcentual (2.66 puntos porcentuales) no hubo diferencias significativas ($p=0.213$). En cuanto al décimo día se observó una diferencia significativa ($p=0.0079$) y un menor porcentaje de mitocondrias en grado 2 (7.21 puntos porcentuales de diferencia) con el uso del diluyente Gedil[®].

Cuadro 11. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 2 con el uso de los diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% M. grado 2
1	BTS	14.98 ± 1.51 ^a
	Gedil	12.32 ± 1.17 ^a
10	BTS	69.91 ± 1.68 ^a
	Gedil	62.70 ± 1.91 ^b

Se presentan medias ± error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$).

Porcentaje de mitocondrias grado 3.

Al comparar la funcionalidad de la mitocondria otorgándole un Grado 3 (íntegras en menos del 50%) entre los dos diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] evaluados al primero y al décimo día, se observó en el día uno que a pesar de haber una diferencia porcentual (0.26 puntos porcentuales) no hubo diferencias significativas ($p=0.177$). En cuanto al décimo día se observó una diferencia significativa ($p=0.0128$) y un menor porcentaje de mitocondrias en grado 3 (3.01 puntos porcentuales de diferencia) con el uso del diluyente Gedil[®].

Cuadro 12. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 3 con el uso de los diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% M. grado 3
1	BTS	3.01 ± 0.133^a
	Gedil	2.75 ± 0.25^a
10	BTS	13.77 ± 0.79^a
	Gedil	10.76 ± 0.67^b

Se presentan medias \pm error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$).

Porcentaje de mitocondrias grado 4.

Al comparar la funcionalidad de la mitocondria otorgándole un Grado 4 (dañadas al 100%) entre los dos diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] evaluados al primero y al décimo día, se observó en el día uno que a pesar de haber una diferencia porcentual (0.12 puntos porcentuales) no hubo diferencias significativas ($p=0.561$). En cuanto al décimo día tampoco se observó una diferencia significativa ($p=0.467$) a pesar de existir una diferencia porcentual (0.37 puntos porcentuales).

Cuadro 13. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje de mitocondrias grado 4 con el uso de los diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% M. grado 4
1	BTS	1.11 ± 0.24^a
	Gedil	0.99 ± 0.28^a
10	BTS	3.38 ± 0.33^a
	Gedil	3.01 ± 0.22^a

Se presentan medias \pm error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$).

Porcentaje total de mitocondrias dañadas.

Al comparar la cantidad de daño a la mitocondria (grados 2, 3 y 4) entre los dos diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] evaluados al primero y al décimo día, se observó en el día uno que a pesar de haber una diferencia porcentual (3.04 puntos porcentuales) no hubo diferencias significativas ($p=0.198$). En cuanto al décimo día se observó una diferencia significativa ($p=0.0001$) y un menor porcentaje de mitocondrias dañadas (10.21 puntos porcentuales de diferencia) con el uso del diluyente Gedil[®].

Cuadro 14. Resultados obtenidos al comparar el porcentaje total de mitocondrias dañadas (grado 2, 3 y 4) con el uso de los diluyentes Gedil[®] vs BTS[®] al día 1 y 10 de almacenamiento.

Grupos Experimentales		Variable
Días de evaluación	Diluyente	% Total de M. dañadas
1	BTS	19.1 ± 1.88^a
	Gedil	16.06 ± 1.7^a
10	BTS	86.61 ± 2.8^a
	Gedil	76.4 ± 2.8^b

Se presentan medias \pm error estándar.

^{a,b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre grupos ($p<0.05$).

7.2 Fotografías: prueba de la DAB.



Figura 11. Diferentes grados de daño mitocondrial
Grado 1 (a) y Grado 3 (b).

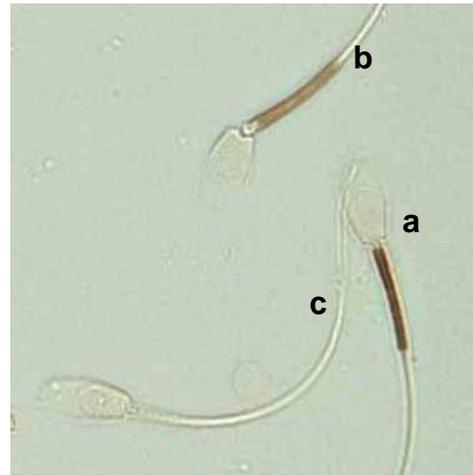


Figura 12. Diferentes grados de daño mitocondrial
Grado 1 (a), Grado 2 (b) y Grado 4 (c).

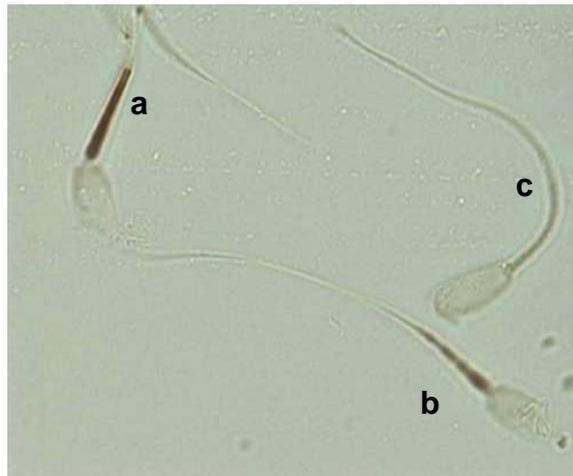


Figura 13. Diferentes grados de daño mitocondrial
Grado 1 (a), Grado 3 (b) y Grado 4 (c).

8. DISCUSIÓN.

Como se había mencionado con anterioridad las características macroscópicas y microscópicas evaluadas por un espermiograma general nos sirven de manera presuntiva para predecir la calidad de las dosis de inseminación, aunque no siempre nos aseguran el conocer la verdadera fertilidad de una dosis seminal, por lo que para fortalecer el análisis del potencial fecundante de una dosis de semen porcino se requiere de la adaptación de nuevas pruebas de tipo funcional, Estas han resultado ser una gran alternativa a este problema, de ahí que este trabajo se basara en la aplicación de pruebas complementarias.

En las granjas comerciales la evaluación de **la motilidad general** de los espermatozoides es una técnica utilizada de manera rutinaria para la evaluación del semen. Flowers et al., (1997) ⁴⁵ demostró que al usar dosis con una motilidad mayor al 60% no existió una relación significativa entre esta característica y las tasas de parto o el número de lechones nacidos vivos; sin embargo, en cerdas inseminadas con semen cuya motilidad era menor al 60% el comportamiento reproductivo se redujo, lo que sugiere que las evaluaciones subjetivas como el porcentaje de motilidad puede al menos ser usadas para identificar eyaculados de mala calidad.

En este estudio se observó que al valorar motilidad con el uso de un diluyente de corta duración (BTS[®]) y un diluyente de larga duración (Gedil[®]), la motilidad se redujo gradualmente en los 10 días de almacenamiento en ambos diluyentes, mostrando diferencias evidentes que dieron resultados significativos al final del periodo experimental, siendo superior el diluyente Gedil[®], esto concuerda con los resultados de Dubé et al., (2004) ⁴⁶ que evaluó los eyaculados de 5 sementales durante 12 días de almacenamiento utilizando el diluyente de larga duración Androhep plus y lo comparó de igual forma con BTS, la motilidad de los espermatozoides también se redujo con el almacenamiento y las diferencias entre BTS y Androhep Plus fueron evidentes. Más espermatozoides fueron móviles cuando se diluyó en Androhep Plus que en BTS a principios de almacenamiento, los días 2, 4, 5 y 6 (P <0,05), después de 6 días

motilidad no existieron resultados significativos entre los diluyentes, a diferencia de este trabajo en donde al día 10 todavía se observaron resultados significativos, esto puede ser debido a que no se usó el mismo diluyente de larga duración ya que a pesar de tener la misma duración el efecto de los componentes de cada diluyente tiene diferentes resultados, tal y como lo demuestra Ochoa et al., (2008) ⁴³ (47) el cual determinó los porcentajes promedio de motilidad espermática de 4 sementales jóvenes obtenidos hasta las 120 horas de conservación para Androhep, Bütschwiler, MR-A y Reading diluyentes de larga duración, los resultados por análisis de varianza para motilidad espermática indicaron que ésta se vio influenciada por el diluyente, eyaculado, tiempo de conservación y por la interacción diluyente por tiempo de conservación, todas con un alto nivel de significancia ($P < 0.01$).

En cuanto al **porcentaje de acrosomas íntegros**, los resultados del presente estudio muestran claramente que existe una disminución en la proporción de acrosomas íntegros, al avanzar el período de conservación. Estudios tales como el de Kommisrud et al., (2002) ⁴⁸ lo demostraron con el uso del diluyente BTS en 76 sementales, la integridad del acrosoma expresado como porcentaje de espermatozoides con morfología normal de acrosoma mostró una clara disminución durante todo el experimento. La media de 6, 30, 54, 78 y 102 h de almacenamiento fueron 93,9%, 90,6%, 88,0%, 84,8%, y 78,2%, respectivamente. La disminución de la integridad acrosomal de un tiempo de almacenamiento a la siguiente fue altamente significativa durante todo el ensayo ($p < 0.001$).

Así mismo Huo et al., (2002) ⁴⁹ evaluó la integridad del acrosoma, utilizando la tinción de Coomassie en eyaculados almacenados a 17°C hasta por 15 días con el uso de los diluyentes BTS, Androhep, KIEV y Zorlesco. No se encontraron cambios significativos hasta 12 horas de almacenamiento para los cuatro diluyentes. El porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto diluidos con Kiev fueron significativamente más bajos a partir del día 5 de almacenamiento que en los otros tres grupos. Sin embargo, todavía hay más de 80% de espermatozoides con acrosoma intacto el día 7, y el 70% en el día 11 de almacenamiento para los cuatro diluyentes. El porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto disminuyó notablemente desde

el día 11 y fue de $61,00 \pm 1,80\%$ para el BTS, $51,3 \pm 2,48\%$ para el diluyente KIEV, $63,5 \pm 1,06\%$ para el diluyente Zorlesco, y $62,65 \pm 3,73\%$ para el diluyente Androhep el día 13 de almacenamiento. El día 15 de almacenamiento, el porcentaje de espermatozoides con el acrosoma intacto fue de $46,05 \pm 4,51\%$ para el BTS, $27,93 \pm 3,46\%$ con KIEV, $46,33 \pm 3,78\%$ para Zorlesco y $47,73 \pm 5,23\%$ para Androhep. Con base en los datos de tinción con azul de Coomassie, los porcentajes de espermatozoides con acrosoma intacto diluidos con BTS, Zorlesco y Androhep estaban muy cerca el uno al otro y eran más altos que con Kiev.

En este estudio la proporción de acrosomas íntegros también disminuyó gradualmente al ser almacenados y evaluados posteriormente. Las diferencias en el trabajo citado ya eran evidentes y significativas en tres de los cuatro diluyentes (BTS, KIEV y Zorlesco) al día 1 y 11 de almacenamiento, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Hernández., (2011) ⁵⁰ determinó que el plasma seminal tiene un efecto importante en esta variabilidad debido a la presencia o ausencia de determinados componentes o la variación en la concentración de los mismos, siendo los componentes proteicos los más importantes, ya que desempeñan funciones importantes como la estabilización de la membrana plasmática de los espermatozoides por lo cual previene reacciones acrosómicas prematuras, se ha determinado que una elevada cantidad de proteínas en el eyaculado del verraco corresponden con una alta tasa de partos (superiores al 86%) y un elevado número de lechones vivos (más de 11 por camada).

Gadea., (2003) ³ menciona que se ha observado que el uso de estabilizadores de membrana mejora el porcentaje de acrosomas intactos, tales como; el EDTA cuya función es la de bloquear la acción del calcio como mediador de los procesos de capacitación y reacción acrosómica, o el alcohol de polivinilo. Los cuales se podrían inferir que están presentes en el diluyente Gedil®. Los daños provocados en el procesamiento, congelación/descongelación se pueden minimizar incluyendo en el diluyente "crioprotectores" como el glicerol cuyo uso presenta mejores valores de calidad espermática y yema de huevo.

En los experimentos que mostró Decuadro., (2009), ⁵¹ los antioxidantes eran benéficos para el espermatozoide cuando se agregaban a diluyentes con yema de huevo, pero no aportaban mejoras si se utilizaban sobre diluyentes que no la tuvieran. La porción crioprotectora de la yema de huevo es el colesterol, pero los fosfolípidos que contiene pueden ser perjudiciales para el espermatozoide. La fracción de lipoproteínas de baja densidad (LDF) que contiene la yema fue definida como un constituyente activo. Se observó que las LDF se unen fuertemente a la membrana espermática gracias a su componente proteico, ya que los fosfolípidos por sí solos no se unen a la membrana. Además se sugiere que la presencia de proteínas aumenta la acción de los fosfolípidos en la protección espermática, especialmente cuando hay altas concentraciones de fosfolípidos durante el almacenamiento en frío.

Por otra parte la importancia de una membrana íntegra es que permitirá la funcionalidad adecuada de la misma manteniendo su selectividad. Durante la fertilización el espermatozoide se encuentra con un medio hostil donde debe tener integridad para atravesar el tracto reproductor de la hembra y llegar al sitio de fertilización. La prueba de HOST es una prueba sencilla y que nos sirve para evaluar la **integridad de la membrana** a la vez que evidencia eyaculados con una capacidad fertilizante baja, esto lo demostró Pérez et al., (1999) ⁵² el cual utilizó un grupo de 24 verracos de entre 1 y 3 años de edad, de las razas Landrace, Large White y Pietrain, realizó la evaluación analizando motilidad, formas anormales, estado de los acrosomas, ORT corto y HOST, elaboradas con el diluyente Acromax. Para estudiar la relación de HOST con la fertilidad utilizó el número total de cerdas paridas del total de inseminadas con el mismo eyaculado. La prolificidad se estimó como el promedio de lechones nacidos totales del total de hembras paridas de las inseminadas con el mismo eyaculado. Sólo el test de endosmosis presentó correlación con la fertilidad ($r=0,40$, $p<0,05$). Demostrando que, dentro de este grupo de eyaculados previamente seleccionados, el HOST discrimina aún más en cuanto a la calidad del eyaculado. Los datos mostrados indican que la prueba de HOST distingue un subgrupo de eyaculados de menor fertilidad, dentro del conjunto de eyaculados seleccionados por su motilidad y formas anormales. En este estudio se observó que el porcentaje de HOST + fue significativo tanto para el día 1 y 10 y además el porcentaje de HOST + fue

disminuyendo a lo largo del almacenamiento pero al comparar el diluyente BTS contra el diluyente Gedil el segundo mostró ser superior, por lo que se ha de suponer una fertilidad mayor con el uso del diluyente Gedil.

Posteriormente Frydrychová et al., (2010) ⁵³ evaluaron la integridad de la membrana en los eyaculados de 21 verracos híbridos fértiles de 1 a 3 años que fueron recolectados a través de la técnica de la mano enguantada. El semen se diluyó en Androhep, Androstar, Androstar plus, M III (Minitüb, Alemania), LD (Magapor, España) y fue almacenado a una temperatura de 17°C, se evaluó a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h después de la dilución del semen. El porcentaje de HOST + disminuyó durante el almacenamiento en Androstar, Androstar plus ($P < 0,01$) después de las 48 h, mientras que en LD, M III ($P < 0,01$) y Androhep ($p < 0,001$) se observó una disminución después de 72 h de conservación. Hubo una diferencia significativa entre los extensores Androhep y LD después de 72 h y 96 h ($P < 0,05$). La mejor integridad de la membrana espermática en la evaluación total fue para Androhep (47%) en comparación con Androstar (42%), Androstar plus (40%), LD (38%) y M III (40%). Las diferencias estadísticas se observaron entre los diluyentes Androhep y Androstar ($P < 0,05$), Androstar plus, LD y M III ($P < 0,001$).

En este estudio el porcentaje de HOST + con la utilización del diluyente Gedil[®] y BTS[®] a las 24 hrs fue un poco inferior al del estudio anteriormente mencionado, pero las diferencias fueron significativas, esto puede deberse al uso de una prueba complementaria (Azul de Anilina) como forma de control, en la que aún sin incubar ni correr la prueba de HOST se encontraron espermatozoides con defectos morfológicos tales como colas dobladas, lo cual nos puede generar falsos positivos.

Como lo menciona Díaz et al., (2009) ⁵⁴ al evaluar 254 eyaculados de verracos jóvenes, maduros y viejos con gotas citoplasmáticas (GC) persistentes, a los cuales se les realizó una evaluación morfológica y una prueba de HOST (H+/H-), encontrando que la presencia de GC también puede alterar los componentes de la membrana, concluyendo que los defectos tanto morfológicos como de membrana se presentan conjuntamente en un eyaculado.

En su caso el estudio de la **funcionalidad mitocondrial** sirve como estimador de la capacidad mótil del espermatozoide, al ser éste el organelo responsable de la síntesis del ATP necesario para el desplazamiento celular.³⁵

En este estudio para la evaluación de la funcionalidad de la mitocondria se utilizó la oxidación de la 3,3' diaminobenzidina (DAB) por el complejo citocromo C mitocondrial. Como se mencionó anteriormente la fuente primaria de ROS en los espermatozoides es la cadena respiratoria de la mitocondria y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es de los principales ROS producidos en semen. Las ROS cumplen una importante función en la fisiología espermática normal, pero el desequilibrio entre su producción y degradación causa efectos adversos sobre el espermatozoide. El estrés oxidante causado por el H_2O_2 provoca un mal funcionamiento en la mitocondria y conduce a una muerte celular programada. La interrupción de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, o la inhibición de la misma, predispone a una formación de radicales libres. Los espermatozoides de mamíferos son particularmente vulnerables a los daños peroxidativos, porque están bien dotados de ácidos grasos poliinsaturados que son altamente vulnerables al libre ataque de los radicales. La peroxidación lipídica asociada a ROS provoca una disminución de la movilidad y viabilidad espermática, de la integridad acrosomal y del potencial de membrana mitocondrial (Membrillo et al., 2003⁵⁵).

Este estudio mostró diferentes resultados para los diferentes tipos de grado de daño a la mitocondria (1, 2, 3 y 4) por la producción de ROS. El grado 1 disminuyó gradualmente al pasar el tiempo de conservación mostrando mayores porcentajes de integridad de funcionalidad de la mitocondria con el uso del diluyente Gedil[®] y al contrario en los grados donde había algún tipo de daño (2, 3 y 4) aumentaron gradualmente con el paso del tiempo, mostrando que individualmente y en conjunto el daño era menor con el diluyente Gedil[®]. Esto contrasta un poco con el estudio de Blumer et al., (2008)³⁹, el cual evaluó la actividad mitocondrial de los espermatozoides humanos en 17 pacientes con diagnóstico de varicocele y 20 sin varicocele, a través de la técnica de la DAB y otorgándoles la misma clasificación al grado de daño de la función mitocondrial (1, 2, 3 y 4) encontrando que para el grado 1 el porcentaje fue de

4.9 %, para el grado 2 de 80.2%, para el grado 3 de 7.8% y para el grado 4 de 7.1% en hombres sin varicocele y 2.6% para grado 1, 68.7% para grado 2, 14.4% para grado 3 y 14.4% para grado 4. Si lo comparamos con nuestro estudio la diferencia de daño en los diferentes grados es bastante alta teniendo una diferencia notable en el grado 1, pero debemos de tomar en cuenta que según Gómez-Torres et al., (2005) ⁵⁶ y Espinoza-Navarro et al., (2011) ⁵⁷ hoy en día en el espermograma de hombre, según los criterios se acepta como normal una morfología con 4% según la OMS o hasta el 14 % según estos autores. Dicho en forma sencilla, el varón tiene el 80% o más de sus espermatozoides con alteraciones morfológicas, en cuanto a las anomalías de la pieza intermedia, la astenozoospermia (alteración de la motilidad espermática), se observa en un 30 % de varones estériles, en comparación al espermograma de cerdo que no debe de presentar más del 25% de anomalías, lo cual puede ser la causa de dicha diferencia ¹.

En el estudio de Nichi., (2009) ⁵⁸ se realizó un experimento con espermatozoides de toro procedentes de la cola del epidídimo, en los cuales se probó el efecto de la adición de Ácido docosohexaenoico (DHA), la adición de antioxidantes enzimáticos (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) y la adición de dos antioxidantes no enzimáticos (Vitamina C y E) solos o combinados entre sí y a diferentes concentraciones, en semen diluido, a través de la evaluación de varias características, entre ellas la funcionalidad mitocondrial, con ayuda de la prueba de la DAB. Los resultados de esta prueba con respecto al uso de la adición de antioxidantes enzimáticos fue la siguiente: para el grupo control; DAB I 52.27±5.17, DAB II 24.14±2.68, DAB III 15.73±2.98, DAB IV 7.86±1.20, superóxido dismutasa (60 UI/ml); DAB I 65.93±2.89, DAB II 21.00±3.86, DAB III 9.43±1.38, DAB IV 3.64±0.72, glutatión peroxidasa (5 UI/ml); DAB I 63.57±2.98, DAB II 22.36±3.02, DAB III 9.57±1.66, DAB IV 4.50± 0.92, catalasa (120 UI/ml); DAB I 22.79±2.65, DAB II 33.71± 2.38, DAB III 34.54±2.11, DAB IV 8.96±1.43. Para la combinación de glutatión peroxidasa (5 UI/ml) más superóxido dismutasa (20UI/ml); DAB I 62.71±3.39, DAB II 22.86±2.69, DAB III 9.28±1.47, DAB IV 5.71±1.43. Los resultados en el caso de antioxidantes no enzimáticos: para la vitamina C (1mM); DAB I 69.17±5.58, DAB II 17.50±4.60, DAB III 8.83±14.43, DAB IV 4.50±1.02, vitamina C (3 mM); DAB I 75.08±5.58, DAB II

14.00±3.19, DAB III 7.83±2.11, DAB IV 3.08±0.68, vitamina C (4.5 mM); DAB I 73.42±5.13, DAB II 16.17±3.67, DAB III 8.08±1.20, DAB IV 2.33±0.63. En el caso de la vitamina E (0.5 mM); DAB I 72.17±7.55, DAB II 15.58±3.18, DAB III 8.17±3.29, DAB IV 4.08±1.23, vitamina E (1.5 mM); DAB I 72.45±6.23, DAB II 16.08±3.81, DAB III 8.50±2.09, DAB IV 3.00±0.62, vitamina E (2.5mM); DAB I 73.00±7.15, DAB II 16.30±4.73. DAB III 8.10±1.91, DAB IV 2.60±0.89. En cuanto al uso de DHA (1 µM); DAB I 53.75±6.77, DAB II 27.08±3.56, DAB III 10.17±2.64, DAB IV 9.00±1.93, DHA (5 µM); DAB I 47.70±9.20, DAB II 31.30±7.93, DAB III 14.90±3.37, DAB IV 6.10±0.78, DHA (10 µM); DAB I 51.42±5.40, DAB II 28.83±2.02, DAB III 11.42±3.00, DAB IV 8.33±1.31.

Los resultados mostrados en este estudio fueron más parecidos a los que se obtuvieron en el nuestro y como nos lo muestra el artículo citado la adición de antioxidantes puede hacer que la funcionalidad mitocondrial mejore o empeore, tal como lo menciona Membrillo et al., (2003)⁵⁵ el objetivo de los antioxidantes es anular o minimizar los efectos de las ROS.

Aunque la composición del diluyente Gedil® no fue revelado por motivos comerciales y la empresa propietaria del diluyente (IMV technologies) promocionaba una mejor protección a las mitocondrias, resulta muy evidente el suponer que entre sus ingredientes se encontraban antioxidantes, por lo cual puede resultar benéfico el adicionar antioxidantes a los diluyentes para una mejor preservación de semen de los machos reproductores y principalmente para la protección de sus mitocondrias.

9. CONCLUSIÓN.

La técnica de la Diaminobenzidina (DAB) se logró estandarizar con éxito y se estableció una clasificación a los diferentes grados de daño en la mitocondria, esto permite establecer dicha técnica como una prueba complementaria a un espermiograma permitiendo tener más parámetros a evaluar para definir la calidad de las dosis seminales.

El diluyente Gedil[®] permitió en este estudio mantener la integridad mitocondrial.

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. TRUJILLO OME, MARTÍNEZ RG, HERRADORA LMA. La Piara Reproductora. Mundi-prensa. 1° Edición. México, 2002.
2. VÁZQUEZ CMD. Estudio comparativo de la prueba dual Coomassie/Host con una técnica modificada de corta duración para evaluar los espermatozoides de verraco (tesis de licenciatura). D.F. (México): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2012.
3. GADEA J. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Spanish Journal of Agricultural Research. 2003; 1: 17-27.
4. ROCHA CG. Desarrollo de técnicas para mejorar la calidad de dosis de semen para la inseminación artificial porcina (tesis de doctorado). Colima (México): Universidad de Colima, 2005.
5. ROCA J, PARRILLA I, RODRIGUEZ MH, GIL MA, CUELLO C, VAZQUEZ JM, et al. Approaches Towards Efficient Use of Boar Semen in the Pig Industry. *Reprod Dom Anim.* 2011; 46: 79–83.
6. HERRERA BJA. Reacción acrosomal en espermatozoides de verracos con problemas reproductivos (tesis de maestría). D.F. (México): Unidad Iztapalapa, UAM, 2000.
7. DECUADRO HG. Control sanitario de los verracos en un centro de producción de semen. Memorias del 5° Seminario Internacional de Suinocultura; 27 al 28 de Septiembre del 2000; Expo Center Norte, San Luís Potosí (SLP) México.

8. GADEA J. La evaluación de la capacidad fecundante de los espermatozoides porcinos mediante la fecundación in vitro (Revisión). Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim. 2001; 16: 63-78.
9. GADEA J. Predicción de la fertilidad "in vivo" de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración "in vitro" (tesis de doctorado). Murcia (España): Universidad de Murcia, Facultad de Veterinaria, 1997.
10. QUINTERO MA. Estudio sobre la dinámica de poblaciones espermáticas en semen de caballo, cerdo y conejo (tesis de doctorado). Barcelona (España): Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Veterinaria, 2003.
11. BUXADÉ CCI, SANCHÉZ SR. El verraco: claves de su optimización productiva. Ediciones Euroganadería, Madrid (España), 2008-2009.
12. Inseminación artificial. Boletín técnico KUBUS: Aglutinación espermática. Disponible en: URL:
<http://www.kubus sa.com/articulos/pdf/AGLUTINACIONESPERMATICA.pdf>
13. ¿Cómo contar los espermatozoides? Técnicas de análisis seminal. Razas porcinas, Universidad de Murcia. Disponible en: URL:
<http://razasporcinas.com/como-contar-los-espermatozoides-tecnicas-de-analisis-seminal/>
14. LE-COZ P. El recuento de espermatozoides. 2006. Disponible en: URL:
http://www.3tres3.com/inseminacion_artificial/el-recuento-de-espermatozoides_4031/

15. GADEA J. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 2005; 63: 431–444.
16. GONZÁLEZ GJ, MARTÍNEZ MY, SANCHÉZ PDI. Análisis seminal equino y bovino (tesis de maestría). Oviedo (España): Universidad de Oviedo, 2012-2013.
17. TEJERINA AF. Valoración mediante imágenes digitales del semen descongelado de verraco (tesis de licenciatura). León (España): Universidad de León, Facultad de Veterinaria, 2007.
18. JANG HY, CHEONG HT, HWANG HS, KIM JT, PARK CK, LEE HK et al. Adaptation of the Hypoosmotic Swelling Test to Evaluate Membrane Integrity of Boar Spermatozoa. *Reprod Dev Biol*. 2007; 31: 121-126.
19. JEYENDRA RS, VAN DER VEN HH, PÉREZ-PELAÉZ M, CRABO BG, ZAEVELD LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert*. 1984; 70: 219-228.
20. KNOBIL E, NEILL JD. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Volumen 1, 3ª Edición: Elsevier, 2006.
21. HAFEZ ESE, HAFEZ B. Reproducción e inseminación Artificial en animales. Séptima edición: McGraw-Hill Interamericana, 2000.
22. NONGAE. Semen and its components. Chapter 12. Disponible en: URL: <http://nongae.gsnu.ac.kr/~cspark/teaching/chap12.html>
23. WUNDER GIGLIO MT. Membrana plasmática del espermatozoide. BioteQ, 2010. Disponible en: URL:

http://www.bioteq.cl/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=3%3Amembrana-plasmati

24. MATÍAS VAN. Caracterización de la función sexual de carneros de la raza Highlander y Suffolk (tesis de licenciatura). Chillán (Chile): Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias, 2009.
25. OLIVERA M, RUÍZ T, TARAZONA A, GIRALDO C. El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. Rev Col Cienc Pec. 2006; 19.
26. PALOMO PMJ. Efecto del tratamiento de los espermatozoides sobre la fecundación In vitro en el caprino (tesis de doctorado). Barcelona (España): Universidad Autónoma de Barcelona, 1995.
27. MARTÍNEZ JG. Crioconservación de semen en peces: efectos sobre la movilidad espermática y la fertilidad. Acta Biol Colomb. 2010; 15: 3-24.
28. PANIAGUA R. Biología Celular. Tercera Edición. Editorial Mc Graw Hill – Interamericana de España, 2007.
29. KARP G. Biología celular y molecular. Conceptos y experimentos. Quinta edición. Editorial Mc Graw Hill, 2009.
30. LEHNINGER ND. Principios de Bioquímica. Quinta edición. Editorial Omega, 2007.
31. DESCALZO A. Diagrama de una mitocondria animal. 2009. Disponible en: URL: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Animal_mitochondrion_diagram_es.svg

32. PINART E, BUSSALLEU E, YESTE M, BRIZ M, SANCHO S, GARCÍA-GIL N, *et al.* Protocolo de triple marcaje con fluorocromos para el análisis funcional de los espermatozoides de porcino. En: *“Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino”*. Universidad de Gerona y Red temática nacional de reproducción porcina. Gerona, España. 2006: 81-92.
33. FRASER L, LECEWICZ, M, STRZEZEK J. Fluoreometric assessment of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol. J. Vet. Sci.* 2002; 5: 85-92.
34. GRAVANCE CG, GARNER DL, BAUMBER J, BALL BA. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. *Theriogenology.* 2000; 53: 1691-1703.
35. SILVA PFN, GADELLA BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology.* 2006; 65: 958-978.
36. TOLEDO G, PANIZO A. Glosario de inmunohistoquímica. *Rev Esp Patol.* 2000; 33:63-4
37. GIL A. Tratado de Nutrición. Tomo I Bases fisiológicas y Bioquímicas de la nutrición. 2da. Edición Editorial Médica Panamericana, 2010.
38. HRUDKA F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome C oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl.* 1987; 10: 809-28.
39. BLUMMER CG, FARIELLO RM, RESTELLI EA, SPAINE DM, BERTOLLA RP, PEREIRA CA. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertility and Sterility.* 2008; 90: 1716-1722.

40. MARTÍNEZ RR. Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica. Consejo superior de investigaciones científicas, 2008.
41. GÓNZALO SR. Papel de las mutaciones del ADNmt en la producción de daño oxidativo mediado por ROS en un modelo de cíbridos mitocondriales (tesis de doctorado). Barcelona (España): Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, 2005.
42. GONZÁLEZ SAN. Efecto del uso de leche entera fluida de bovino sometida al proceso UHT como extensor de semen porcino para inseminación artificial (tesis de licenciatura). Guatemala: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos de Guatemala, 2008.
43. OCHOA G, ACOSTA MJ, RUEDA M, ORTEGA R. Evaluación de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. Pruebas in vitro. Revista computarizada de producción porcina. 2008; 15: 1026-9053.
44. JOHNSON LA, WEITZE KF, FISER P, MAXWELL WMC. Storage of boar semen. Animal Reproduction Science. 2000; 62: 143-172.
45. FLOWERS WL. Management of boars for efficient semen production. Journal of Reproduction and Fertility Supplement. 1997; 52: 67-78.
46. DUBÉ C, BEAULIEU M, REYES-MORENO C, GUILLEMETTE C, BAILEY JL. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. Theriogenology. 2004; 62: 874-86.
47. OCHOA G, ACOSTA MJ, RUEDA M, ORTEGA R. Evaluación de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. Pruebas in vitro. Revista Computarizada de Producción Porcina. 2008; 15.

48. KOMMISRUUD E, PAULENZ H, SEHESTED E, GREVLE IS. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosoma integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta vet. Scand.* 2002; 43.
49. HUO LJ, MA XH, YANG ZM. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology.* 2002; 15: 1349-60.
50. HERNÁNDEZ DAK. Intercambio de plasma seminal porcino y valoración de la viabilidad espermática en semen refrigerado (tesis de licenciatura). Veracruz (México): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Universidad Veracruzana), 2011.
51. DECUADRO HG. Enfoques sobre semen, estrés oxidativo y antioxidantes. *Sitio argentino de producción animal.* 2009, 11:34-38.
52. PÉREZ LLB, GONZÁLEZ JL, CLEMENTE MJ, GARCÍA CP. El test de endosmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albeitar.* 1999; 30:16-17.
53. FRYDRYCHOVÁ S, CEROVSKY J, LUSTYKOVA A, ROZKOT M. Effects of long-term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. *Czech J. Anim. Sci.* 2010; 55: 160-166.
54. DÍAZ FO, MESA H, VALENCIA MJ, GÓMEZ LG, HENAO UFJ. Evaluación de la integridad acrosomal y la funcionalidad bioquímica de la membrana espermática en cerdos reproductores con gotas citoplasmáticas persistentes. *Revista científica.* 2009; 5: 500-505.
55. MEMBRILLO OA, CÓRDOVA IA, HICKS GJJ, OLIVARES-CORICHI IM, MARTÍNEZ TVM, VALENCIA MJDJ. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. *Una revisión. INCI.* 2003; 28: 699-704.

56. GÓMEZ-TORRES MJ, GIRELA J, FERNÁNDEZ-COLOM PJ, ROMEU A, DE JUAN J. Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopía electrónica de barrido (SEM). *Revista Iberoamericana de Fertilidad*. 2005; 22.
57. ESPINOZA-NAVARRO O, SARABIA L. Evaluación y estandarización de la calidad del espermiograma: nuevos límites inferiores de referencia. *Int. J. Morpho*. 2011; 29: 885-890.
58. NICHI M. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros (tesis de doctorado). Sao Paulo (Brasil): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Sao Paulo, 2009.

11. ANEXOS.

Figura 14. Evaluación de la motilidad general al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

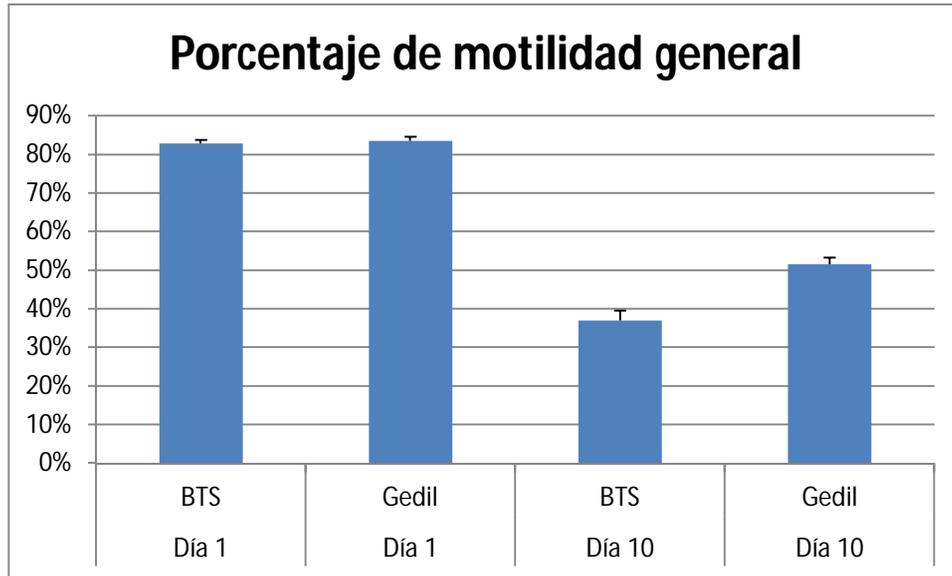


Figura 15. Evaluación de la integridad de los acrosomas al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

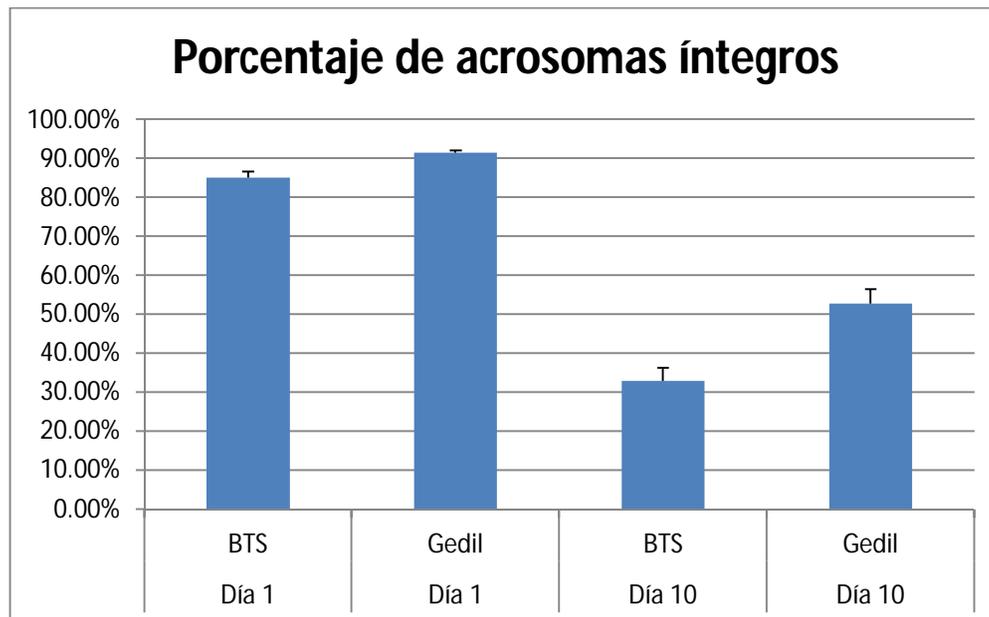


Figura 16. Evaluación de la integridad de la membrana (HOST +) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

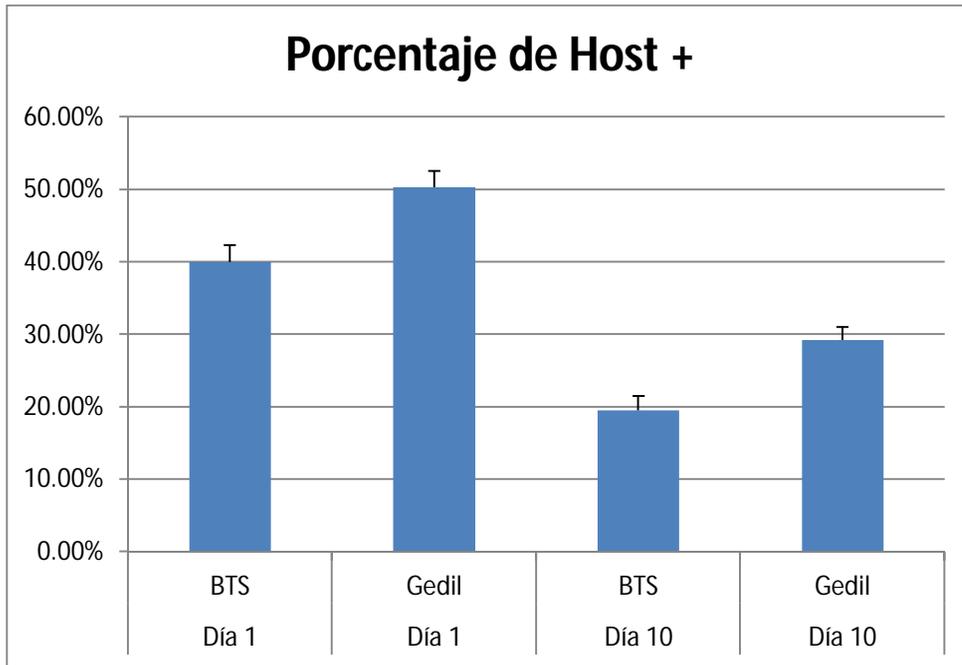


Figura 17. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 1) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

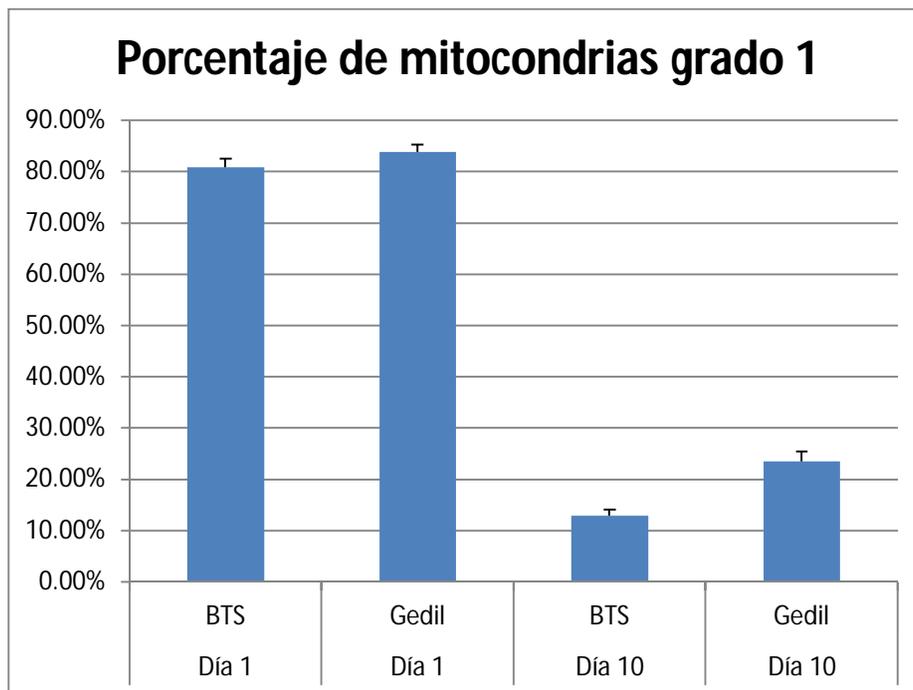


Figura 18. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 2) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

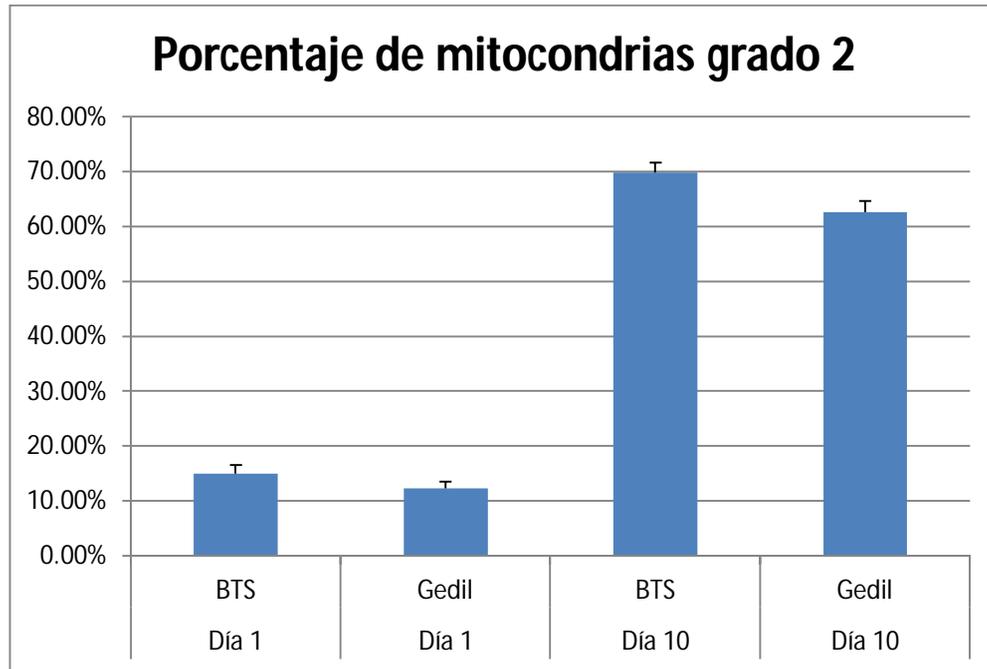


Figura 19. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 3) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

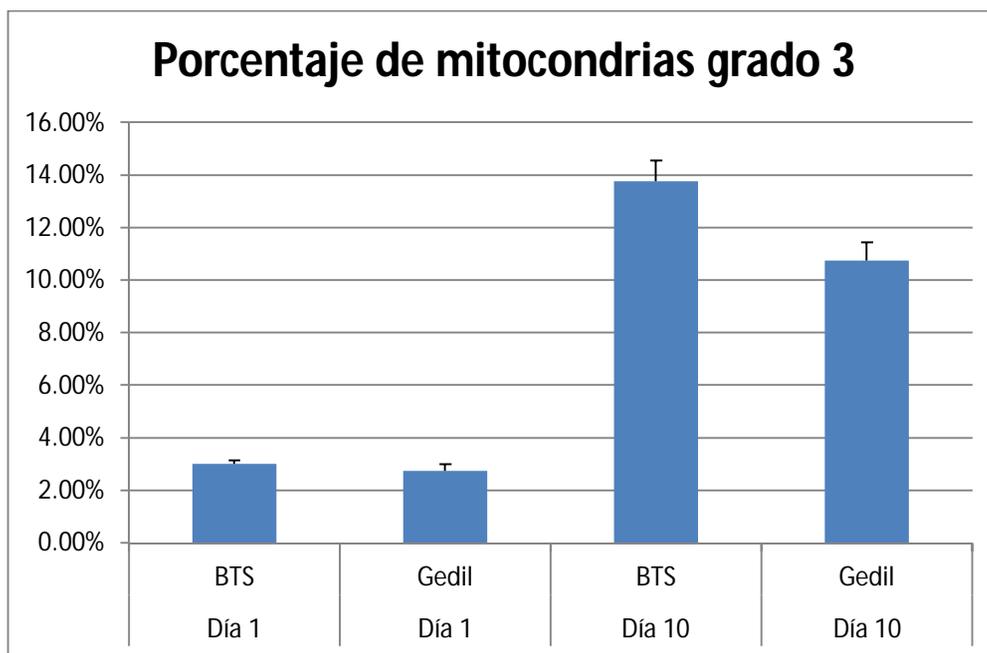


Figura 20. Evaluación de la funcionalidad de la mitocondria (Grado 4) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

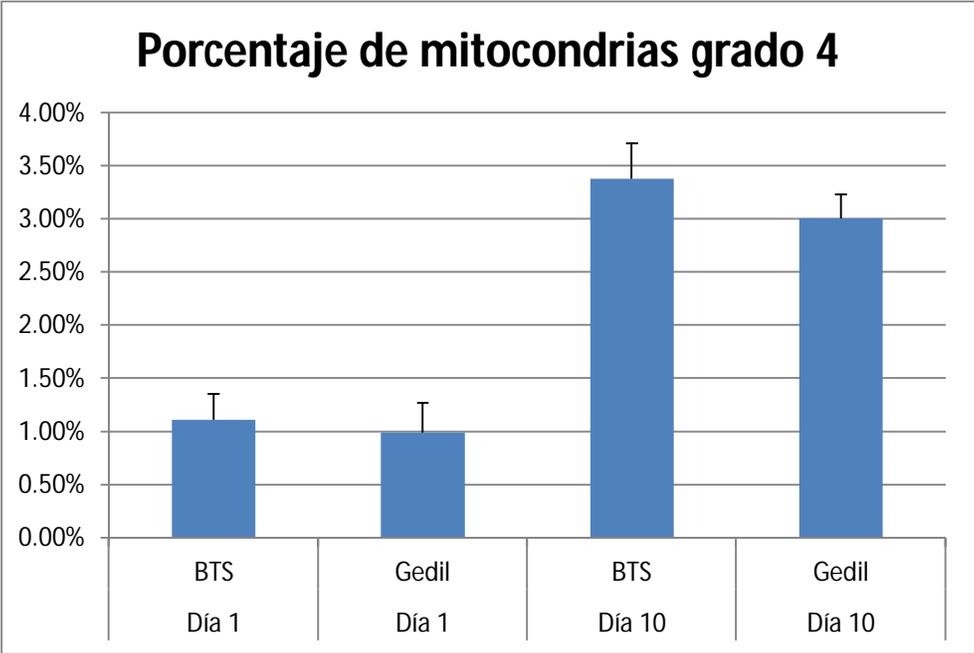


Figura 21. Evaluación de la suma total de mitocondrias dañadas (Grado 2, 3 y 4) al día 1 y 10 de almacenamiento con los diluyentes BTS y Gedil®.

