

**Efecto del antioxidante trolox sobre la integridad de membrana de  
espermatozoides porcinos congelados**

**Investigador principal:**

**Guillermo Henao Restrepo, MV MSc.  
Docente Universidad Nacional de Colombia**

**Co-investigadores:**

**Andrés Pareja López. Zootecnista. MSc. Biotecnología Animal.**

**Elizabeth Buriticá Henao. Zootecnista.**

**Juan Camilo Garcés. Zootecnista.**

**Julián Roldán Henao. Aspirante MVZ.**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**Grupo de investigación de biotecnología animal de la UNAL sede Medellín.**

**Línea de investigación de biotecnología animal**

**Medellín**

**2008**

**Efecto del antioxidante trolox sobre la integridad de membrana de  
espermatozoides porcinos congelados**

**Investigador principal:**

**Guillermo Henao Restrepo, MV MSc.  
Docente Universidad Nacional de Colombia**

**Co-investigadores:**

**Andrés Pareja López. Zootecnista. MSc. Biotecnología Animal.**

**Elizabeth Buriticá Henao. Zootecnista.**

**Juan Camilo Garcés. Zootecnista.**

**Julián Roldán Henao. Aspirante MVZ.**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Reproducción animal**

**Título Académico al que aspira  
Médico Veterinario y Zootecnista**

**Medellín**

**2008**

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	<b>4</b>
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	7
1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	7
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>8</b>
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>13</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
4.1 Objetivo general .....	14
4.2 Objetivo específico .....	14
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>15</b>
5.1 Enfoque metodológico y tipo de estudio .....	15
5.1.1 Protocolos de criopreservación del semen.....	15
5.1.2 Protocolo de descongelación .....	16
5.1.3 Evaluación de la movilidad.....	16
5.1.4 Test hipoosmotico .....	17
5.2 Población.....	17
5.3 Diseño muestral.....	18
5.4 Control de errores y sesgos .....	18
5.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	19
<b>6. CONSIDERACIONES ÉTICAS</b> .....	<b>20</b>
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
7.1 Análisis de la movilidad de los espermatozoides.....	21
7.2 Análisis de la integridad de membrana en los espermatozoides.....	23
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>32</b>

## RESUMEN

Este estudio fue diseñado para evaluar el efecto protector del antioxidante trolox, análogo hidrofílico del alfa tocoferol, a diferentes concentraciones (0  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ ) sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos congelados. La fracción rica en espermatozoides de cinco donadores de diferentes razas (Pietran, Landrace Aleman, y Hampshire) a los que se les probó su fertilidad fue congelada y descongelada utilizando el protocolo propuesto por *Peña et al* (2003). Las muestras de semen se empacaron en pajillas francesas de 0.5 ml después de diluidas en un diluyente comercial (BTS) y en un segundo diluyente a base de  $\beta$ -lactosa, yema de huevo y glicerol, el semen diluido se dividió en cuatro alícuotas y se suplemento con trolox a las diferentes concentraciones y posteriormente se congeló. El semen se evaluó en el momento de la recolección y después del proceso de descongelación al minuto 0 y 30 se realizaron las evaluaciones de movilidad individual y de calidad de movimiento en un microscopio de luz (40X), se calificaron de forma subjetiva por un mismo evaluador. La evaluación de la funcionalidad de la membrana espermática se realizó por medio del test hipoosmótico antes y después de la congelación, se adicionó la solución hipoosmótica a la dilución que contenía los espermatozoides para observar en el microscopio a 100X y evaluar los diferentes patrones de hinchamiento. Se encontró que el antioxidante utilizado no representa un efecto protector significativo para los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación y que los diferentes niveles de concentración del antioxidante tampoco influyeron en los resultados. Estudios previos han demostrado que algunos reproductores pueden tener mejores características en su plasma seminal que otros, incluso que existe variación entre razas. En la presente investigación se encontró que en los reproductores evaluados existe diferencia significativa en los valores de la movilidad espermática y en la integridad de membrana de los espermatozoides pos-descongelación. En conclusión, los resultados obtenidos indican que no se puede garantizar el éxito en la congelación del semen de cerdo empleando el antioxidante trolox y que este pueda ofrecer resultados de fecundación óptimos en inseminación artificial.

*Palabras claves:* Cerdo; Criopreservación; Eyaculado; Espermatozoide; Test hipoosmótico; Antioxidante.

## ABSTRACT

This study was designed to evaluate the protective effect of the trolox antioxidant, hydrophilic analogous of the alpha tocoferol, in different concentrations (0  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  and 500  $\mu\text{m}$ ) against plasma membrane integrity of criopreserved boar spermatozoa. Sperm rich fraction from five fertile donors of different breeds (Pietran, Landrace Aleman, and Hampshire) were frozen and thawed using the protocol proposed by *Peña et al* (2003). The samples of semen were loaded in 0.5ml french straws after extended in a commercial extender (BTS) and re-extended with a second extender consisting of  $\beta$ -lactose, egg yolk and glycerol, the extended semen were divided into four aliquots and supplemented with trolox at different concentrations and frozen. The ejaculates were evaluated in the fresh and frozen-thawed state at 0 and 30 minutes after thawed, the individual motility and quality motility were evaluated using light microscopy (40X) in a subjective way by the same assessor. To evaluate the functional integrity of the sperm membrane we used the hipoosmotic swelling test in the fresh and frozen-thawed state of the semen. Sperm samples were added with the hipoosmotic solution and examined in a light microscopy (100X) to visualize the different models of swelling. No significant protective effects were observed with the antioxidant in the spermatozoa during the process of frozen-thawed and the different levels of concentration did not have influence in the results. Previous studies have shown that some boar spermatozoa may have better characteristics in their seminal plasma, even that exists variation between breeds. The present study supports that there are significant differences in the rate of sperm motility and membrane integrity in the spermatozoa post-thawing. In conclusion, the results indicate that frozen boar spermatozoa with trolox do not guarantee success and either offers satisfactory results in artificial insemination.

*Keywords:* Boar; Criopreservation; Ejaculate; Spermatozoa; Hipoosmotic test; Antioxidant.

## **1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

### **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En Colombia, la producción porcícola ocupa una importante posición en la industria agropecuaria, sin embargo reportes hechos por la FAO a través del “Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia” informan que Colombia tuvo una balanza comercial de -32.000 dólares para el comercio de cerdos vivos y de -2.861.000 dólares para el comercio de carne de cerdo y derivados, ajustado a junio de 2005, lo cual indica que aunque han disminuido las importaciones desde el 2000 aun se siguen importando considerables cantidades de este producto, esto demuestra la incapacidad de las empresas colombianas para satisfacer la demanda interna de carne de cerdo.

En los últimos años se han desarrollado diferentes técnicas que contribuyen al desarrollo de la industria porcina dentro las que se destacan las biotecnologías reproductivas. Una de las actividades que ha hecho avanzar tecnológicamente la producción porcina ha sido la Inseminación Artificial (IA) que se aplica rutinariamente en explotaciones porcinas, desde granjas núcleo hasta granjas comerciales, obteniendo resultados de fertilidad y prolificidad similares a los alcanzados en la monta natural<sup>1</sup>. Su aplicación se ha extendido por su contribución al mejoramiento genético acelerado mediante la utilización intensiva de reproductores de alto valor genético, la reducción del número de verracos en las granjas, la reducción de las posibilidades de introducción de enfermedades a las explotaciones, la facilidad para el manejo reproductivo al reducir el tiempo y el trabajo necesarios, así como un mejor control de la calidad del semen<sup>2</sup>.

La IA con semen refrigerado se ha desarrollado gracias a la disponibilidad de diluyentes comerciales que permiten la conservación del semen durante periodos variables entre 2 y 7 días<sup>3</sup>. El uso de semen porcino congelado se limita actualmente a la introducción de nuevo material genético de alto valor para inseminar cerdas puras

en las granjas de selección, o bien asociados a labores de investigación. Sin embargo, el uso de semen congelado puede aportar ventajas sobre el semen refrigerado como son el transporte a largas distancias; la conservación durante un tiempo muy prolongado (años) con resultados productivos que mejoran progresivamente a medida que avanzan las investigaciones y se acercan a los obtenidos con semen refrigerado; el control sanitario, genético o productivo de los animales antes de su uso como reproductores (pruebas de progenie); el autoabastecimiento de dosis seminales en la propia granja sin necesidad de tener que disponer de verracos para recogida diaria de semen; la creación de bancos genéticos para razas en peligro de extinción o individuos de alto valor, o para propagación de líneas que se encuentren en circunstancias desfavorables, como por ejemplo, una posible prohibición en la movilidad de animales a causa de un brote infeccioso<sup>4</sup>.

En la actualidad los resultados de la crioconservación de espermatozoides porcinos presenta aún una baja eficacia, a diferencia de lo que sucede con otras especies<sup>5</sup>. Debido a las limitaciones que todavía tiene esta técnica, su uso aún no se ha generalizado. El empleo de semen congelado en IA en comparación con el semen fresco ofrece unos resultados inferiores en cuanto a fertilidad y prolificidad; de esta forma, los menores índices de concepción, el menor tamaño de camada y el bajo número de dosis que se obtienen de cada eyaculado limitan actualmente sus posibilidades<sup>5</sup>.

Esa baja capacidad fecundante puede estar relacionada con el gran daño que se produce en las membranas espermáticas durante el proceso de criopreservación. Las principales causas de estas alteraciones son los cambios estructurales y funcionales que sufren los espermatozoides durante el enfriamiento, congelación y descongelación. Estos cambios están relacionados con la elevada proporción de ácidos grasos insaturados que presentan las membranas espermáticas, lo que promueve procesos de peroxidación lipídica durante la congelación<sup>6</sup>. En este sentido, sería de interés el disponer de un eficiente sistema antioxidante para evitar las alteraciones asociadas a esta reacción. En el proceso de criopreservación de semen porcino se somete a los espermatozoides a un fuerte choque térmico, el cual está directamente relacionado con la formación de cristales durante el proceso de congelación y descongelación, afectando la mayoría de las organelas, de otro lado

también se genera estrés osmótico y estrés oxidativo, los cuales pueden causar daños a las membranas y al ADN sin afectar notablemente las características de movilidad ni de fertilización, pero sí el desarrollo embrionario<sup>7</sup>.

En numerosos estudios se ha mostrado que los glóbulos blancos y los espermatozoides presentes en el semen, generan especies reactivas de oxígeno (ERO) en su actividad metabólica normal, las cuales pueden ser incrementadas por los métodos utilizados en el procesamiento del semen, causando estrés oxidativo que altera la función espermática debido a la peroxidación de lípidos de membrana y fragmentación del ADN<sup>8</sup>.

Los espermatozoides de los mamíferos poseen una membrana plasmática rica en ácidos grasos poli-insaturados muy susceptibles a la peroxidación por efecto de las ERO<sup>9</sup>. De otro lado, la capacidad de reparación de ADN está disminuida en los espermatozoides maduros, haciéndolos más vulnerables al daño oxidativo en comparación con cualquier otro tipo de célula somática<sup>10</sup>.

En procesos biotecnológicos como la criopreservación de espermatozoides porcinos, se requiere la eliminación del plasma seminal dejando a los espermatozoides expuestos a estrés oxidativo causante de daño en la membrana y en el ADN. Con el fin de mejorar esta situación, se ha reportado el uso de una amplia variedad de antioxidantes como el ácido ascórbico, el urato y  $\alpha$ -tocoferol, los cuales disminuyen el estrés oxidativo, reduciendo el daño en membrana y ADN espermático después de la congelación y mejorando en gran medida la movilidad y viabilidad de los espermatozoides después del proceso de criopreservación. Se requiere estudiar el efecto de otras sustancias antioxidantes sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos criopreservados.

## **1.2 JUSTIFICACIÓN**

La importancia de esta investigación se justifica en:

- La utilización intensiva de reproductores de alto valor genético.
- La reducción del número de verracos en las granjas.
- La reducción de las posibilidades de introducción de enfermedades a las explotaciones.
- Mejor control de la calidad del semen.
- Transporte del semen a largas distancias.
- La conservación del semen durante un tiempo muy prolongado (años).
- El control sanitario, genético o productivo de los animales antes de su uso como reproductores (pruebas de progenie).
- El autoabastecimiento de dosis seminales en la propia granja.
- la creación de bancos genéticos para razas en peligro de extinción o individuos de alto valor.
- Para propagación de líneas que se encuentren en circunstancias desfavorables.

## **1.3 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿El antioxidante trolox posee efectos sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos criopreservados?

## 2. MARCO TEÓRICO

La criopreservación de semen es una técnica accesoria para la inseminación artificial y la fertilización *in Vitro* y ha jugado un papel bastante importante en los últimos 50 años en el mejoramiento reproductivo en diferentes especies de animales. Con estas técnicas, se ha logrado realizar mejoramiento genético de hatos, prevenir y controlar enfermedades, hacer un control reproductivo del hato, mejor aprovechamiento de los sementales y obtener un mejor rendimiento económico<sup>11</sup>.

No obstante la manipulación del semen en estos procesos altera el óptimo desempeño de los espermatozoides. Por ejemplo, se ha reportado que la criopreservación de semen reduce la fertilidad comparativamente con el semen fresco y algunas de las razones que causan la pérdida de fertilidad son, la susceptibilidad al choque térmico, la tasa de enfriamiento y la composición del diluyente. De otro lado, se ha reportado que las centrifugaciones seriadas y la remoción del plasma seminal, inducen una liberación significativa de ERO por los espermatozoides y leucocitos (ver tabla. 1) del semen resultando en una disfunción espermática<sup>11 12</sup>.

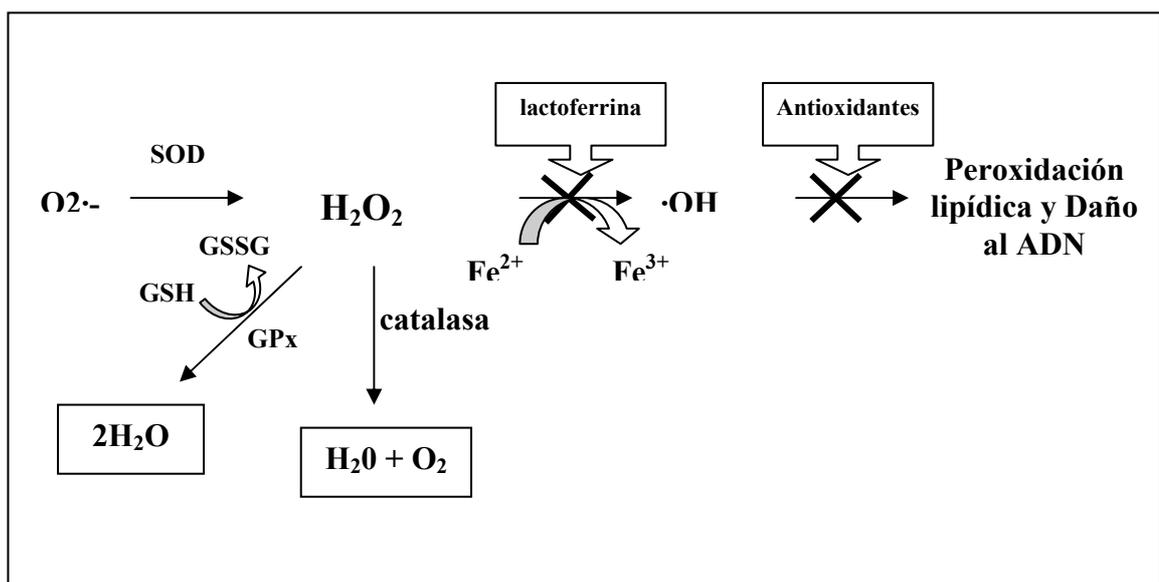
**Tabla. 1.** Especies reactivas de oxígeno

([www.uniesseldorf.de/WWW/MedFak/PhysiolChem/index.htm](http://www.uniesseldorf.de/WWW/MedFak/PhysiolChem/index.htm))

$O_2^{\cdot -}$	Radical Superóxido
$OH^{\cdot}$	Radical Hidroxilo
$ROO^{\cdot}$	Radical Peroxil
$H_2O_2$	Peroxido de Hidrógeno
$^1O_2$	Oxígeno Singlete
$NO^{\cdot}$	Oxido Nítrico

Los espermatozoides y los glóbulos blancos que se encuentran en el semen producen ERO en su actividad metabólica normal y se ha reportado que en los espermatozoides humanos se generan especies como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )<sup>11</sup>, el cual espontánea o enzimáticamente es transformado rápidamente a peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ); debido a su baja reactividad y corta vida media (1ms) el anión superóxido no es muy dañino, pero puede reaccionar con sus blancos y puede producir especies más tóxicas como los radicales Tiol ( $RS\cdot$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) que son altamente reactivos<sup>12</sup>. El peróxido de hidrógeno es relativamente estable y tiene un alto potencial oxidante, no está cargado y puede cruzar libremente las membranas celulares. Sumado a lo anterior, las concentraciones considerablemente bajas de hierro presentes en casi todas las soluciones en las cuales se diluyen los espermatozoides, son suficientes para catalizar la formación del radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) del radical superóxido y del peróxido de hidrógeno (Figura1), las cuales reaccionan virtualmente con cualquier componente celular y el efecto tóxico observado se ve limitado por su corta vida media (1ns)<sup>13</sup>.

**Figura 1.** Mecanismos de defensa del daño por las ERO. (SOD) más catalasa o glutatión peroxidasa (GPx) elimina muchos daños ocasionados por EROs. La Lactoferrina (unida al hierro) y antioxidantes como la vitamina E limitan el daño adicional.



La membrana plasmática de los espermatozoides de los mamíferos es rica en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son muy susceptibles al ataque de las ERO, además durante los últimos estados de la espermatogénesis los espermatozoides han descartado la mayoría de su citoplasma perdiendo gran parte del conjunto de defensas enzimáticas que los protegen del daño peroxidativo. Afortunadamente, el plasma seminal contiene una batería enzimática como, la superóxido dismutasa, la catalasa y el sistema de glutatión peroxidasa/reductasa que neutralizan las ERO, lo mismo que una gran cantidad de sustancias con actividad similar a la superóxido dismutasa o catalasa, como el  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, glutatión, piruvato, taurina, hipotaurina y albúmina, que regulan el balance entre la generación de las ERO y su neutralización. La exposición de los espermatozoides al plasma celular antes de su separación con fines de criopreservación favorece la prevención del daño por oxidación<sup>14</sup>.

En resumen, las ERO dañan las macromoléculas afectando el componente estructural y funcional de los espermatozoides sobrevivientes. Esto se ve reflejado en la inestabilidad de la membrana, daño de los receptores de membrana, alteraciones del citoesqueleto<sup>13</sup>, perturbaciones del axonema (el cual es asociado con la pérdida de movilidad)<sup>15</sup>, inhibición de la fusión espermato-ocito, y daño nuclear entre otros<sup>16 17 18</sup>. Por estas razones, es importante mejorar las técnicas de criopreservación de semen porcino con el fin de contribuir a recuperar una alta población de espermatozoides funcionales.

Se ha reportado que los antioxidantes naturales ejercen un efecto protector sobre la membrana plasmática de los espermatozoides bovinos, conservando tanto su actividad metabólica y viabilidad celular.

El Trolox un análogo hidrofílico del alfa tocoferol (Vitamina E), ha sido reportado como un mejor limpiador de los radicales peroxil que la vitamina E, sin embargo no se sabe si este protege las células contra el daño oxiradical o si actúa como un antioxidante<sup>19</sup>.

El Trolox reduce marcadamente la cantidad de fosfolípidos que se conjugan al daño oxiradical en células que se exponen a los ROS, lo que sugiere que se comporta como un antioxidante en las células<sup>19</sup>.

La adición del antioxidante Trolox en los diluyentes para la criopreservación puede reducir la peroxidación lipídica, el daño de membrana y de las demás organelas espermáticas, contribuyendo a preservar un óptimo comportamiento espermático postdescongelación.

Los análisis seminales de rutina para evaluar el comportamiento espermático generalmente incluyen la medida de pocos parámetros como movilidad, la vitalidad y la morfología, pero no siempre proveen una información exacta sobre la capacidad fertilizadora de los espermatozoides<sup>13</sup>. La medida de la integridad del acrosoma junto con la funcionalidad de la membrana son unos de los principales parámetros en la evaluación de la viabilidad espermática<sup>15</sup>.

La membrana espermática es una estructura dinámica que participa en el reconocimiento y transporte de moléculas. Estas funciones permiten que el espermatozoide adapte su metabolismo al medio circundante, proporcionando así un sistema molecular para el reconocimiento del oocito<sup>20</sup>. La evaluación de la integridad de membrana constituye una información importante en la evaluación de la fertilidad del macho<sup>21</sup>. Además, esta integridad no sólo es fundamental para el metabolismo espermático, sino que también lo es para una adecuada capacitación y reacción acrosómica, y por ende para la fertilidad del macho<sup>22</sup>.

El test hipoosmótico (HOST) fue desarrollado para evaluar la funcionalidad de la membrana espermática y se recomienda como indicador adicional de fertilidad por ser económico y de fácil manejo<sup>23</sup>. El test hipoosmótico (Hypoosmotic Swelling test, HOST) consiste en someter a los espermatozoides a un medio de presión osmótica más baja que la fisiológica, lo que causa una entrada de agua en la célula en un intento de equilibrar la presión osmótica interna con la del medio externo. Para que esta respuesta se produzca, la membrana plasmática del espermatozoide debe de estar íntegra y con los mecanismos de intercambio de fluidos funcionando correctamente. La entrada de agua provoca en estas células un hinchamiento y enrollamiento del flagelo. Las células con la membrana física o funcionalmente dañada no experimentarán cambios en la forma del flagelo<sup>24</sup>. Esta prueba se ha aplicado en el semen del hombre<sup>25</sup>, del toro<sup>26</sup>, del perro<sup>27</sup>, del caballo<sup>28</sup> y del cerdo<sup>23</sup>. En cerdos, si la

presión osmótica es demasiado baja, la membrana plasmática se rompe y el flagelo aparece de nuevo recto, por lo que se confundiría con un espermatozoide que aún no ha reaccionado<sup>23</sup>.

### **3. HIPÓTESIS**

HIPÓTESIS ALTERNA: El antioxidante trolox posee efectos sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos criopreservados.

HIPÓTESIS NULA: El antioxidante trolox no posee efectos sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos criopreservados.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

- Evaluar el efecto del antioxidante Trolox sobre las características espermáticas de espermatozoides porcinos congelados.

### **4.2 Objetivo específico**

- Evaluar, mediante la técnica del Test Hipoosmótico, el efecto de la suplementación del diluyente BTS adicionado del antioxidante Trolox sobre la integridad de la membrana plasmática de los espermatozoides porcinos congelados.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Enfoque metodológico y tipo de estudio

#### 5.1.1 Protocolos de criopreservación del semen

El protocolo utilizado fue el propuesto por Peña *et al.* (2003)<sup>29</sup>. El semen se diluyó a una proporción 1:1 con BTS (206 mM Glucosa, 20.4mM citrato Na<sub>3</sub>, 14.9mM NaHCO<sub>3</sub>, 3.4mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 10mM, KCl, penicilina G Na 0.6 g/l, dihydroestreptomicina 1.0 g/l) a 20°C y se incubó en una centrifuga refrigerada a 15°C por 3 horas, luego se centrifugó a 800 gravedades por 10 min <sup>30</sup>.

##### 5.1.1.1 Tratamientos con el antioxidante

El sobrenadante fué descartado y se midió su volumen y concentración espermática (Cámara de Neubauer) para descontar el número de espermatozoides, del número contenido en la fracción rica. El precipitado se rediluyó con un segundo diluyente a base de  $\beta$ -lactosa 310 mM + 20 ml yema de huevo y 2% de glicerol, refrigerado a 15°C, a una concentración final de  $4 \times 10^8$  espermatozoides/ml. El semen diluido se dividió en cuatro alícuotas y se suplementó con Trolox a 0 (como control), 100  $\mu$ m, 200  $\mu$ m y 500  $\mu$ m.

##### 5.1.1.2 Tazas de enfriamiento

Se realizó disminución de temperatura de 15 a 5°C a razón de 0.2 °C/minuto. Las muestras de semen con los diferentes tratamientos se envasaron en pajillas francesas de 0.5 ml y se sellaron con alcohol polivinilo antes de iniciar el proceso de congelación. La dosis en cada tratamiento fue sometida a enfriamiento entre 5 y -120°C a una tasa de disminución de temperatura de 30°C/minuto, en vapores de nitrógeno utilizando

una plataforma previamente calibrada que gradúa la altura de las pajillas sobre el nivel de nitrógeno líquido, de acuerdo con la tasa de disminución de temperatura deseada. Las pajillas congeladas se dejaron estabilizándose durante tres minutos a  $-120^{\circ}\text{C}$  antes de sumergirlas en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

### **5.1.2 Protocolo de descongelación**

La descongelación se hizo en un baño maría a  $50^{\circ}\text{C}$  por 13 segundos con el propósito de dar a la muestra una temperatura de  $20-25^{\circ}\text{C}$ . Después del proceso de descongelación, las muestras se prepararon para las evaluaciones de movilidad individual y de integridad de membrana como se describe a continuación.

### **5.1.3 Evaluación de la movilidad**

Las evaluaciones de movilidad individual pre y poscongelación se realizaron al microscopio de luz (40X) dotado de platina térmica a  $39^{\circ}\text{C}$ , en una gota de semen de aproximadamente 3mm de diámetro colocada en un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos, ambos precalentados a  $39^{\circ}\text{C}$ ; la calidad de movimiento se calificó en forma subjetiva por un mismo evaluador en un mínimo de cinco campos, como el porcentaje de espermatozoides que mostraron un patrón de movilidad vigorosa<sup>32</sup>. Para observar los cambios de movilidad a través del tiempo, la movilidad individual se midió de nuevo 30 minutos después de la descongelación del semen incubado a  $36^{\circ}\text{C}$ . La evaluación poscongelación se realizó después de una semana de permanencia del semen dentro del contenedor a  $-196^{\circ}\text{C}$ .

#### **5.1.4 Test hipoosmotico**

Esta variable se midió al momento de la evaluación de la concentración, la movilidad individual, viabilidad, morfología, después del proceso de criopreservación.

El experimento se realizó con 16 pajillas de 4 machos de la granja Porcícola La Linda, las cuales se evaluaron para los diferentes tratamientos con trolox en cada eyaculado. A cada muestra de semen después de ser descongelada por 13 segundos a 50°C se le evaluó la funcionalidad de la membrana espermática por medio del test hipoosmótico.

En un eppendorf, se adicionaron 100 µl de la solución hipoosmótica [100 mOsmol/L] compuesta por fructosa y citrato de sodio en agua grado reactivo y 20 µl de la solución que contiene los espermatozoides. La solución se llevó a incubar a 37°C por media hora<sup>23</sup>. Para medir hinchamiento espermático, se puso una gota de la muestra bien mezclada sobre un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos 22 x 40mm para observar en el microscopio a 100X. Se evaluaron 100 espermatozoides por placa. La proporción total y los diferentes patrones de hinchamiento se calcularon dividiendo el número de células reaccionadas por 100 sobre el total de espermatozoides contados en la misma área.

#### **5.2 Población**

Los eyaculados se obtuvieron de 5 cerdos de razas Pietran, Landrace Aleman, y Hampshire de la granja Porcícola La Linda con edades entre 2 y 4 años, a los cuales se les probó su fertilidad y comprobó un mínimo de espermatozoides con 70% de movilidad individual y 80% de espermatozoides normales.

### **5.3 Diseño muestral**

La fracción del semen rica en espermatozoides se obtuvo por el método manual en un recipiente termoaislado, la fracción rica fue filtrada durante su colección usando un filtro de celulosa. La concentración, estimada en un espermodensímetro de Karras<sup>32</sup> y la movilidad individual, estimada en porcentaje por un mismo observador utilizando un microscopio de luz dotado de platina térmica, se determinaron al momento de la recolección. La movilidad individual se estimó de nuevo a los 120 minutos de incubación en el plasma seminal a temperatura ambiente (20 - 22°C).

### **5.4 Control de errores y sesgos**

Con el fin de disminuir los errores relacionados con la toma y análisis de muestras se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- Todas las muestras fueron tomadas en las horas de la mañana.
- A los animales recolectados se les probó su fertilidad, un mínimo de espermatozoides con 70% de movilidad individual y 80% de espermatozoides normales.
- La recolección del semen fue realizada por un mismo individuo capacitado y experimentado en el manejo y manipulación de semen.
- La evaluación seminal fue realizada por un mismo observador experimentado en el área.
- Los equipos utilizados para la evaluación y análisis de las variables fueron los mismos y fueron usados bajo los mismos protocolos.
- El director participó en cada uno de los procesos metodológicos, en la interpretación, discusión y conclusiones de los resultados.

## **5.5 Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

Para determinar los efectos protectores del Trolox sobre la integridad de la membrana espermática, se aplicó un modelo de un solo factor con un diseño de bloques completos aleatorizados, en el cual el factor a evaluar fue el efecto del antioxidante Trolox sobre la integridad de membrana y la movilidad espermática, el cual se analizó en 4 niveles de concentración: 0  $\mu\text{m}$  (control), 100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$  y 500  $\mu\text{m}$ . Los bloques son cada uno de los animales utilizados en el experimento (5 machos). Los análisis de varianza y los respectivos análisis de las interacciones entre los tratamientos se realizaron con ayuda de los softwares Static Graphics y Microsoft Excel.

## **6. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El procedimiento que se realizó a los animales cumple con las condiciones del capítulo VI de la ley 84 de 1989, además con el título III, capítulo VI de la ley 576 del año 2000.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis de la movilidad de los espermatozoides.

La movilidad individual promedio de los espermatozoides porcinos frescos fue de 75%. Después de la descongelación del semen la movilidad individual en los diferentes tratamientos inmediatamente (cero minutos, Tabla 1) y 30 minutos (Tabla 2) después de su incubación a 36°C fue de  $21.42 \pm 12.40\%$  ( $p > 0.05$ ) y de  $19.02 \pm 15.12\%$  ( $p > 0.05$ ), respectivamente.

En la tabla 1 se presenta el promedio y la desviación estándar obtenida al evaluar la movilidad de los espermatozoides porcinos inmediatamente después de la descongelación en cada uno de los tratamientos.

**Tabla 1.** Porcentaje de movilidad individual de espermatozoides porcinos inmediatamente después del proceso de descongelación (cero minutos) para cada tratamiento ( $p < 0.05$ ).

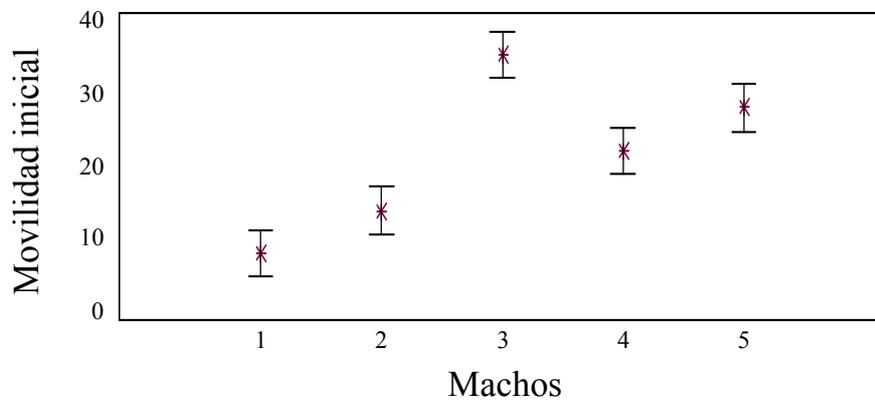
Tratamiento	Media $\pm$ DS
Control	$20.67 \pm 9.23$
Trolox 100 $\mu$ M	$24.00 \pm 12.85$
Trolox 200 $\mu$ M	$20.50 \pm 15.92$
Trolox 500 $\mu$ M	$20.47 \pm 11.93$

En la tabla 2 se presentan la media y la desviación estándar obtenidas para cada uno de los tratamientos 30 minutos después del proceso de descongelación.

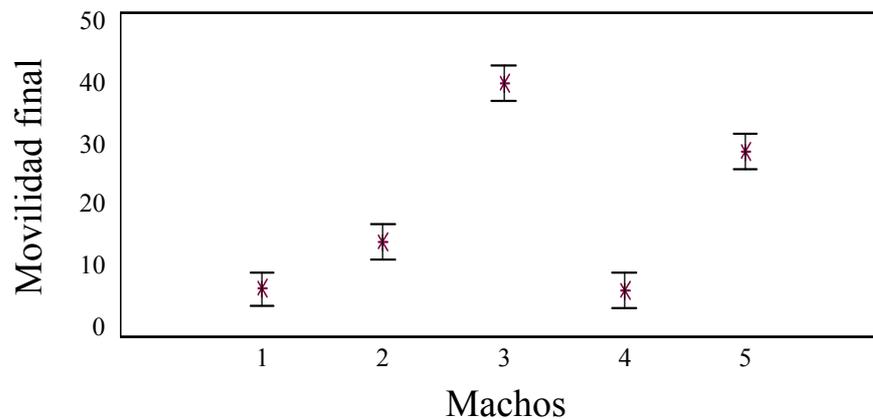
**Tabla 2.** Porcentaje de movilidad individual de espermatozoides porcinos incubados durante 30 minutos después del proceso de descongelación para cada tratamiento ( $p < 0.05$ ).

Tratamiento	Media $\pm$ DS
Control	22.33 $\pm$ 11.93
Trolox 100 $\mu$ M	17.73 $\pm$ 15.90
Trolox 200 $\mu$ M	20.73 $\pm$ 17.70
Trolox 500 $\mu$ M	15.27 $\pm$ 14.94

Entre los reproductores evaluados se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la movilidad individual de los espermatozoides pos-descongelación inmediatamente después de la congelación (Figura 1), fenómeno que persistió 30 minutos después de la incubación a 36°C (Figura 2).



**Figura 1.** Movilidad individual de espermatozoides porcinos inmediatamente después del proceso de descongelación para cada reproductor



**Figura 2.** Movilidad individual de espermatozoides porcinos 30 minutos después de la descongelación e incubación a 36 °C para cada macho

**Tabla 3.** Porcentaje de movilidad individual de espermatozoides porcinos después del proceso de descongelación para cada uno de los machos

Macho	* Media ± DS	** Media ± DS
1	8.08 ± 2.94 <sup>a</sup>	6.33 ± 5.03 <sup>c</sup>
2	13.92 ± 6.75 <sup>a</sup>	14.00 ± 6.25 <sup>c</sup>
3	35.42 ± 5.82 <sup>b</sup>	40.00 ± 7.07 <sup>d</sup>
4	22.08 ± 13.22 <sup>b</sup>	6.00 ± 8.19 <sup>c</sup>
5	28.18 ± 6.03 <sup>b</sup>	28.75 ± 8.56 <sup>d</sup>

\* Minuto cero después de la descongelación

\*\* Minuto 30 después de la descongelación

## 7.2 Análisis de la integridad de membrana en los espermatozoides

El promedio de los espermatozoides porcinos frescos que reaccionaron positivos al HOST fue de 57.74% (Tabla4). Este porcentaje se tuvo como referencia para comparar el daño de membrana sufrido por los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación. Después de la descongelación del semen el promedio y

la desviación estándar de los espermatozoides que reaccionaron positivos al test hipoosmótico en los diferentes tratamientos fue de  $53,73 \pm 12,30\%$  ( $p>005$ ) (Tabla 5).

**Tabla 4.** Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivos al HOST en los diferentes machos evaluados.

<b>Macho</b>	<b>HOST Inicial</b>
1	48.77 <sup>a</sup>
2	57.14
3	65.57 <sup>b</sup>
4	59.49 <sup>b</sup>

En la tabla 5 se muestra el promedio y la desviación estándar obtenida al evaluar la integridad de membrana de los espermatozoides porcinos al momento de descongelar el semen.

**Tabla 5.** Porcentaje de espermatozoides que reaccionaron positivos al test hiposmótico al momento de descongelación con los diferentes tratamientos.

<b>Tratamiento</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>
Control	53.24 $\pm$ 12.57
Trolox 100 $\mu$ M	52.79 $\pm$ 16.31
Trolox 200 $\mu$ M	51.38 $\pm$ 16.42
Trolox 500 $\mu$ M	57.49 $\pm$ 3.88

Entre los reproductores evaluados se encontró diferencia significativa ( $p<0,05$ ) en la integridad de membrana de los espermatozoides pos-descongelación (Tabla 6).

**Tabla 6.** Media y desviación estándar de la integridad de membrana en los diferentes machos.

<b>Macho</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>
1	50.39 $\pm$ 4.28
2	42.41 $\pm$ 7.79 <sup>a</sup>
3	71.21 $\pm$ 6.45 <sup>b</sup>
4	58.39 $\pm$ 2.88

La tabla 6 muestra la diferencia ( $p < 0.05$ ) en los valores promedio del porcentaje de la integridad de membrana entre los reproductores.

## 8. DISCUSIÓN

La movilidad espermática es uno de los principales criterios que se debe tener en cuenta a la hora de seleccionar los machos para los procesos de criopreservación, debido a que con una mayor movilidad en el semen fresco se puede obtener una mejor recuperación de ésta después del proceso de congelación-descongelación<sup>34</sup>. Según este autor (Roca et al. 2006) el porcentaje de movilidad espermática para una buena congelabilidad del semen de cerdo debe estar entre 70% y 90%, incluso en uno de sus experimentos trabajó con una media de 76% de movilidad espermática y logró buenos resultados<sup>33</sup>. Otros autores sin embargo prefieren seleccionar sólo aquellas muestras que estén por encima del 80% de motilidad espermática del semen fresco<sup>34</sup>.

En esta investigación, se evaluó la movilidad inicial del semen en fresco de los diferentes reproductores antes de realizar el proceso de criopreservación, con el fin de contar con un parámetro de comparación a la hora de evaluar los resultados de la movilidad del semen congelado-descongelado. El valor promedio que se obtuvo en la evaluación del semen en fresco fue del 75%, este parámetro se evaluó inmediatamente después de la recolección del semen. Si se compara este valor con el propuesto por Roca et al. (2006) se observa que el semen que se utilizó para el experimento cumplía con las características necesarias de movilidad para una buena congelabilidad.

Una semana después de congelado el semen, se inició el proceso de descongelación y se midió la movilidad a los 0 minutos y posteriormente se evaluó a los 30 minutos de incubación.

Luego de evaluar los promedios de los porcentajes de movilidad, se encontró que el antioxidante utilizado no representa una mejoría significativa en la movilidad de los espermatozoides congelados-descongelados con respecto al control, esto se expresa en la movilidad obtenida inmediatamente después de la descongelación (minuto 0) para los diferentes tratamientos que tuvo un promedio de 21.42%, lo que representa una reducción en este parámetro del 71.44% con respecto a la movilidad inicial. A los 30 minutos después de incubado el semen la movilidad promedio fue del 19.02%, lo

que representa una reducción del 74.6% con respecto a la movilidad inicial. Estos resultados posdescongelación se atribuyen principalmente al daño que sufren los espermatozoides en la membrana celular debido al choque térmico al que son expuestos durante el proceso de congelación y descongelación<sup>35</sup>.

Al analizar el comportamiento de esta variable con cada uno de los tratamientos inmediatamente después de la descongelación, se observó que no existen diferencias significativas entre las movilidades promedio de los tratamientos comparadas con la movilidad promedio del control, con lo que puede deducirse que el antioxidante no representa un efecto protector significativo para los espermatozoides durante el proceso de congelación – descongelación.

Debido a que el proceso de congelación neutraliza rápidamente los radicales libres (ERO), éstos no se encuentran presentes en el momento de la descongelación, por lo que la movilidad puede verse afectada por un período de tiempo debido a que éstos, en cierta medida, pueden ayudar a la movilidad del espermatozoide. Se ha demostrado que los espermatozoides humanos son capaces de generar cantidades bajas controladas de EROs endógeno que juegan un papel significativo en la inducción de la capacitación del acrosoma/reacción espermática y la adquisición de la habilidad para la fertilización<sup>36</sup>. Por esta razón se evaluó la movilidad de los espermatozoides después de incubar el semen durante 30 minutos, este fue el tiempo que se consideró pertinente para que los radicales libres volvieran a activarse.

Al realizar este análisis, se encontró que todos los tratamientos presentaron una movilidad promedio inferior con respecto al control, la cual fue de 22.33% y para los tratamientos con T100 µM, T200 µM y T500 µM fue de 17.73%, 20.73% y 15.27%, respectivamente, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas, por lo que se reafirma que el Trolox no representa un efecto protector para los espermatozoides durante el proceso de congelación - descongelación.

Los resultados obtenidos, en los que se observa que el antioxidante utilizado tiene poco efecto sobre las características evaluadas, posiblemente se deben a su baja solubilidad en el agua, debido a que esta característica puede hacer que no cumpla su efecto protector, lo que se hace más relevante debido a que los espermatozoides de

cerdo son especialmente sensibles al daño peroxidativo dado el relativo alto contenido de ácidos grasos insaturados en los fosfolípidos de la membrana de los espermatozoides porcinos y la relativa baja capacidad antioxidante del plasma seminal<sup>29</sup>.

Otro factor que pudo afectar los resultados son las variaciones existentes entre la movilidad de los espermatozoides de los diferentes machos involucrados en el experimento, por que éstos pueden representar una fuente de variación que puede distorsionar los resultados, debido a que presentaron diferencia significativa en los valores promedio de la movilidad espermática, que puede deberse a la variabilidad entre razas<sup>33</sup>. Otro factor que pudo influir en los resultados fue el tamaño de la muestra seleccionada, ya que cuando se tienen pocas observaciones, el porcentaje de error del diseño experimental se incrementa y por consiguiente se tiene mayor variabilidad en los resultados obtenidos<sup>37</sup>.

Los resultados de la investigación en el minuto cero después de la descongelación, mostraron que existe una movilidad superior en los espermatozoides del macho 3, que fue del 35.42% (47% de la movilidad promedio inicial), mientras que el macho 1 obtuvo una movilidad del 8% (10.7% de la movilidad promedio inicial), para los cerdos 2, 4 y 5 se obtuvo una movilidad promedio de 13.92%, 22.08% y 28.18%, respectivamente, lo que indica que la variabilidad entre la movilidad de los machos es una fuente de distorsión que afecta los resultados, esto se debe a que los bloques elegidos (machos) presentan interacción con el factor evaluado (niveles de concentración del Trolox) y por lo tanto pueden contrarrestarse los efectos de los tratamientos sobre cada uno de los machos<sup>37</sup>.

Al realizar el análisis de las diferencias entre los machos a los 30 minutos después de la descongelación, se pudo observar que también existen diferencias significativas entre la movilidad de los espermatozoides de los diferentes machos del experimento y nuevamente se observan mejores resultados en el macho 3 con una movilidad promedio de 40% y pobres resultados en los reproductores 1 y 4, que presentaron movilidades promedio de 6.33% y 6%, respectivamente, lo que indica que el semen de estos dos reproductores no es apto para ser utilizado en la inseminación artificial. Por otro lado, se hace factible que el semen del macho 3 pueda ser apto para la

inseminación artificial, ya que autores como Roca et al (2006) han realizado experimentos en los cuales han obtenido movilidades promedio de 47% a los 30 minutos de incubación a 37°C después del proceso de descongelación y el semen ha sido evaluado como apto para la inseminación.

Se evaluó el efecto protector del trolox sobre la funcionalidad de la membrana espermática, ya que este es un indicador adicional de la fertilidad potencial de los verracos<sup>23</sup>. Para esto, esta variable se midió antes y después del proceso de criopreservación, se realizó un análisis de la funcionalidad de membrana para todas las muestras obtenidas de semen de los diferentes machos y se obtuvo un valor promedio de 57.74% de membranas integra para espermatozoides frescos y de 53.73% para espermatozoides que sufrieron el proceso de congelación-descongelación.

En el estudio, se pudo concluir que no existe diferencia significativa en el porcentaje de daño de membrana entre los espermatozoides frescos y los sometidos a los diferentes tratamientos y la muestra control, lo que indica que el Trolox tampoco tuvo un buen efecto sobre la integridad de membrana, ya que no ejerció el efecto protector que se esperaba con la adición de este antioxidante, además se observó que el nivel de concentración del antioxidante tampoco influyó en los resultados. Estos resultados son muy relevantes dentro del estudio, ya que la funcionalidad de la membrana está correlacionada con la capacidad fertilizante del espermatozoide al momento de darse la reacción acrosómica, fenómeno de gran importancia biológica, con consecuencias importantes en el cumplimiento de la desnudación del oocito y la penetración de la zona pelúcida<sup>38</sup>.

En los reproductores evaluados se encontró diferencia significativa en la integridad de membrana de los espermatozoides pos-descongelación, en donde el reproductor 3 presentó mayor porcentaje de espermatozoides con membranas integra (71.21%) y el reproductor 2 fue el de menor porcentaje (42.41%). Estos resultados se ven reafirmados por los planteamientos realizados por Boe-Hansen (2004) quien afirma que algunos reproductores pueden tener mejores características en su plasma seminal que otros, incluso que existe variación entre razas<sup>39</sup>.

Estos resultados deben ser tenidos en cuenta como una fuente de variación a la hora de realizar los análisis, debido a que se observó una diferencia significativa en los valores promedio del porcentaje de daño de membrana entre los machos, ya que el efecto del antioxidante no explica completamente la variabilidad obtenida en los datos.

Los datos anteriores contradicen el planteamiento de Peña et al. (2003), que concluyen que el Trolox tiene un efecto protector en el esperma y que éste influye sobre la fracción del semen eyaculada; reportan que ese efecto puede estar relacionado con las diferentes composiciones del plasma seminal entre las fracciones, el cual puede determinar una sensibilidad menor al daño oxidativo en el contenido del esperma en la primera fracción del eyaculado. Sin embargo, en el presente experimento se infiere que el antioxidante por sí mismo no ejerce los efectos de protección necesarios, sino que se debe tener en cuenta la variación entre los machos y la calidad seminal de estos.

Un estudio realizado por Love et al (2002), muestra que existe una relación entre la temperatura de almacenamiento y el estado de fertilidad del reproductor, debido a que reducciones en la temperatura alteran la viabilidad celular y la capacidad de fecundación por el estrés oxidativo que está inducido por la generación de agentes oxidantes (ERO). La consecuencia final es la peroxidación de los lípidos y una alteración grave de la funcionalidad espermática<sup>40</sup>. Este planteamiento, sugiere que en el estudio realizado es posible que la temperatura haya tenido un efecto negativo sobre la calidad semen, ya que el choque térmico afecta las estructuras de la célula espermática causando graves daños en ésta.

## 9. CONCLUSIONES

En el procesamiento de semen porcino con el antioxidante Trolox a diferentes concentraciones se evidencia una variabilidad de la movilidad individual posdescongelación de los espermatozoides de los diferentes individuos, y es por esto que representan una fuente de variación significativa para los parámetros analizados. Sin embargo, dado que en todos los casos se obtuvo una movilidad promedio inferior al 50%, en ninguno de los casos se puede garantizar el éxito en la congelación del semen y su posterior utilización para inseminación artificial empleando el antioxidante Trolox bajo las condiciones de esta investigación.

Se identificó que el antioxidante Trolox no beneficia significativamente la movilidad y la integridad de membrana de los espermatozoides, esto representa un hallazgo importante si se tiene en cuenta que estas dos variables están relacionadas directamente con la fertilidad, y es por esto que difícilmente el semen de porcino sometido a procesos de congelación-descongelación con este antioxidante pueda ofrecer resultados de fecundación óptimos al utilizarse en inseminación artificial.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- 
- <sup>1</sup>Flowers, W.L., and H.D. Alhusen. 1992. Reproductive performance and estimates of labor requirements associated with combinations of artificial insemination and natural service in swine. *J. Anim. Sci.* 70:615.
- <sup>2</sup>Safranski, T.J. 1997. Artificial insemination in swine: A tool whose time has come. University of Missouri - Columbia, Animal Sciences Departmental Report. p. 10.
- <sup>3</sup> Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 2000 Aug 18;62(1-3):143-72. Review.
- <sup>4</sup>Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., Cormier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21, 1–7.
- <sup>5</sup> Saravia, F. 2004. Deep Freezing of Concentrated Boar Semen for Intra-Uterine Insemination. Master's thesis. ISSN 1403-2201. Report No. 40.
- <sup>6</sup>Parks, J.E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes. 229–261. In: Crister, J.K. (Ed.). *Reproductive tissue banking*. San Diego, CA: , Academic Press. 472 pp.
- <sup>7</sup>Pegg, D.E., 2002. The history and principles of cryopreservation. *Semin. Reprod. Med.* 20 (1), 5–13.
- <sup>8</sup>Bailey, J.L., Bilodeau, J.F., Cormier, N., 2000. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21, 1–7.
- <sup>9</sup>Halliwell B, Gutteridge J. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet.* 1984;1:1396–1398.
- <sup>10</sup> Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod.* 1998;59: 1037-1046.
- <sup>11</sup>Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989 Jul;41(1):183-97.
- <sup>12</sup> Zini A, Finelli A, Phang D, Jarvi K. Influence of semen processing technique on human sperm DNA integrity. *Urology.* 2000 Dec 20;56(6):1081-4.
- <sup>13</sup>Halliwell B and Gutteridge JMC. (1989). *Free radical in biology and medicine* (2nd edn) Clarendon Press, Oxford.

- 
- <sup>14</sup>Kumi-Diaka J; Badtram G. 1994. Effect of storage on sperm membrane integrity and other functional characteristics of canine spermatozoa: in vitro bioassay for canine semen. *Theriogenology*; 41: 1355-1366.
- <sup>15</sup> Hinshaw DB, Sklar LA, Bohl B, Schraufstatter IU, Hyslop PA, Rossi MW, Spragg RG, Cochrane CG. Cytoskeletal and morphologic impact of cellular oxidant injury. *Am J Pathol*. 1986 Jun;123(3):454-64
- <sup>16</sup> de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and sperm axonemes. *J Androl* 1992;13:368–78
- <sup>17</sup> Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci*. 2000 Jul 2;60-61:481-92. Review.
- <sup>18</sup> Baumber J, Vo A, Sabeur K, Ball BA. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology*. 2002 Feb;57(3):1025-33.
- <sup>19</sup>Wu TW, Hashimoto N, Wu J, Carey D, Li RK, Mickle DA, Weisel RD. The cytoprotective effect of Trolox demonstrated with three types of human cells. *Biochem Cell Biol*. 1990 Oct;68(10):1189-94.
- <sup>20</sup>Hammerstedt RH; Graham JK; Nolan JP. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl*; 11: 73-88.
- <sup>21</sup>Jeyendran RS; Van der Ven HH; Pérez-Peláez M; Crabo BJ; Zaneveld LJD. 1984. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*; 70:219-228.
- <sup>22</sup>Yanagimachi R. 1993. Mammalian Fertilization. In: Knobil E (Eds) *Physiology of Reproduction*. Raven Press, NY; pp. 189-317.
- <sup>23</sup> Correa, J.R. & Zavos, P.M. 1994. The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen –thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42: 361-370.
- <sup>24</sup>Pérez-Llano B, González JL, Clemente MJ, García-Casado P. 1999. El test de endósmosis (HOST) en semen de ganado porcino. *Albóitar*; 30:16-17
- <sup>25</sup> Zaneveld LJD; Jeyendran RS; 1990. Hypoosmotic swelling test. In: *Handbook of the laboratory Diagnosis and treatment of infertility*. Keel, BA; Webster BW (eds.). CRC Press, Boca Ratón, pp. 91-110.

- 
- <sup>26</sup> Correa JR; Heersche G; Zavos PM. 1997. Sperm membrane functional integrity and response of frozen-thawed bovine spermatozoa during the hypoosmotic swelling test incubation at varying temperatures. *Theriogenology*; 47: 715-721.
- <sup>27</sup> Caiza de la Cueva FI; Rigau T.; Bonet S; Miro J; Briz M.; Rodríguez J. 1997. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*, 47: 765-784.
- <sup>28</sup> Pérez-Llano B; García-Casado P; Lorenzo JL; Sánchez-Sánchez R. 1998. Response to the boar sperm to the Host test and relationship between HOST and ORT results. 15th IPVS Congress, Birmingham, England, 5-9/Julio, Abstr. 69.
- <sup>29</sup> Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez Martínez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci.* 2003 Sep 15;78(1-2):85-98.
- <sup>30</sup> Erikson, B.M. ; Rodríguez-Martínez, H. Effect of freezing and thawing rates on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in flatPacks and maxi-straws *An. Rep. Sci.* 2000;63: 205-220.
- <sup>31</sup> Rodríguez-Martínez, H.; Eriksson, B. Evaluación del semen de verraco y su relación con fertilidad. *Inseminação artificial em suínos. EN: III Simpósio Internacional MINITUB. Flores da Cunha – RS – Brasil (2000); p. 11 – 33.*
- <sup>32</sup> Köning, I. *Inseminación de la cerda. 1ª edición. Acribia Zaragoza (1979); 181 p.*
- <sup>33</sup> Roca, J. et al. Factors influencing boar sperm cryosurvival. Department of Medicine and animal Surgery, Faculty of Veterinary Medicine. University of Murcia. Spain, 2006.
- <sup>34</sup> Cordova Izquierdo, A; Pérez Gutiérrez, JF y Martín Rillo S. Previous phases and after freezing of boar semen in 5 ml straws and fertilizing capacity of the spermatozoa. Departamento de Producción Agrícola y Animal. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. México, 2004.
- <sup>35</sup> Gadea, Joaquín et al. Alteración del sistema antioxidante durante el proceso de congelación de espermatozoides porcinos: Papel del glutatión. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia. 2005.
- <sup>36</sup> Suresh C. Sikka. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of Andrology*, Vol. 25, No. 1, January/February 2004.

---

<sup>37</sup> Walpole, Ronald; Myers, Raymond y Myer, Sharon. Probabilidad y estadística para ingenieros, Sexta edición. Prentice-Hall Hispanoamérica. México, 1993.

<sup>38</sup> Esteves, S. Sharma, R.K. Thomas, A.J. & Agarwal, A. 2000. Effect of swim-up sperm washing and subsequent capacitation on acrosome status and functional membrane integrity of normal sperm. *Int fertile*, 45(5): 335-341.

<sup>39</sup> Boe-Hansen, Gry et al. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*. 2004.

<sup>40</sup> Love, CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*. 2002