

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS Y FORESTALES



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS

TESIS

Complejo Ciclodextrina-Colesterol y su efecto sobre la calidad de espermatozoides porcinos conservados a 5°C.

Que para obtener el grado profesional de

Maestro en Ciencias Biológicas

Área: Producción y Salud Animal

Presenta

M.V.Z. Rangel García Jiménez

Director de Tesis

Dr. José Herrera Camacho

Comité Tutorial

Dra. Liliana Márquez Benavidez

Dr. Karlos Edmundo Orozco Duran

Dr. José Arce Menocal

M.C Juan Carlos Tinoco Magaña

Morelia Michoacán, marzo, 2020

Agradecimientos

A Dios, Por permitirme culminar este bello proceso de formación profesional a lado de estupendos seres humanos. Por mantenerme vivo, sano y con ganas de seguir mí camino todos los días, gozando del cariño y apoyo de mis seres queridos.

A mi director de tesis, Dr. José Herrera Camacho por ser un excelente mentor, un grandioso ser humano y un gran amigo. Profesionalmente le agradezco por estar pendiente de los avances, por presionar mi desarrollo, por su paciencia en sus instrucciones y su preocupación por mi futuro. Por otra parte gracias por contagiar su emoción y actitud positiva todos los días que hicieron el trabajo más ameno.

A mi comité Tutorial, Dra. Liliana Marquez Benavides, Dr Karlos Edmundo Orozco Duran, Dr Jose Arce Menocal y M.C Juan Carlos Tinoco Magaña. Gracias por darse tiempo de estar en periodos importantes y por sus precisas aportaciones para la mejora del trabajo de tesis.

A mis compañeros y amigos, que son muchos pero principalmente, Marco Tulio Monroy Martínez, Mayra Sujey Ayala López, Odalis Vargas Vargas, Karla Wendoline Rodríguez Ramírez, Guillermo Paz Peláez, Santiago Tinoco Figueroa, Con quienes compartí experiencias inolvidables llenos de sonrisas y momentos que hicieron del proceso algo más llevadero.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por brindarme el apoyo económico durante la realización de la maestría.

Al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) por permitirme realizar la estancia experimental y permitirme el uso de sus instalaciones y equipo en el laboratorio Acuático-Pecuario.

Al M.C David Urban Duarte por ser amigo y mentor en el CNRG, gracias por sus enseñanzas en el manejo de equipos, por su paciencia, ganas de enseñar y por involucrase en mi trabajo.

Al equipo de amigos y profesionales que hice durante mi estadía en el CNRG. Ing. Sandra Pérez, por brindarme apoyo e instruirme en momentos de duda. Emmanuel Rubén, Mónica y Nadia, a todos ustedes gracias por brindarme su amistad y hacerme sentir en casa.

A la M.P.A Keyla Madahi Sánchez Jaimes, por su amistad, ayuda e instrucción en temas del área porcina.

A todos ellos ¡**Gracias!**

Dedicatoria

A mis padres:

Josefina Jiménez Velasco

Rufino García Vásquez †

Por darme la vida, por sus puntuales consejos que hicieron de mí un hombre de bien y por los enormes sacrificios que en su momento hicieron para lograr verme cumplir cada una de mis metas

A mis hermanos:

David, Rubén, Nery, Abel, Edith, Domy y Angélica, gracias por su apoyo incondicional, por sus ánimos constantes y por demostrar que juntos podemos superar cualquier obstáculo.

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	II
Dedicatoria	III
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VII
Resumen	VIII
Abstract	IX
1 INTRODUCCION	9
1.1 JUSTIFICACIÓN	10
1.2 HIPÓTESIS	11
1.3 OBJETIVOS	11
1.3.1 Objetivo General	11
1.3.2 Objetivos específicos	11
2. REVISION DE LITERATURA	12
2.1 Anatomía del Aparato Reproductor del Cerdo	12
2.1.1 Testículos	13
2.1.2 Epidídimo y conducto deferente.....	14
2.1.3 Glándulas Accesorias	15
2.1.3.1 Próstata	15
2.1.3.2 Vesículas seminales	15
2.1.3.3 Glándulas bulbo-uretrales.....	15
2.1.4 Genitales externos	16
2.1.4.1 Pene	16
2.1.4.2 Prepucio.....	16
2.1.4.3 Uretra.....	17
2.2 El espermatozoide	17
2.2.1 Espermatogénesis	17
2.2.2 Morfología espermática	20
2.2.2.1 Anormalidades morfológicas.....	22
2.2.3 Fisiología espermática	25
2.2.3.1 Capacitación	25
2.2.3.2 Reacción acrosomal	26
2.3 Colección de Semen Porcino	26

2.3.1 Material para coleccionar	27
2.3.2 Obtención del semen	27
2.3.3 Evaluación seminal	28
2.3.4 Características macroscópicas	29
2.3.4.1 Color del eyaculado	29
2.3.4.2 Volumen.....	29
2.3.4.3 Densidad macroscópica	29
2.3.4.4 pH	30
2.3.5 Características microscópicas	30
2.3.5.1 Concentración espermática	30
2.3.5.2 Evaluación de la motilidad Masal.....	31
2.3.5.3 Motilidad Progresiva	32
2.3.5.4 Determinación de la vitalidad espermática	33
2.3.5.5 Tinción vital.....	34
2.3.5.6 Fluorocromos.....	34
2.3.5.7 Lectinas	35
2.3.5.8 Evaluación de la morfología espermática	36
2.4 Evaluación de semen por computadora (CASA).....	37
2.4.1 Componentes principales y medidas de salida	38
2.4.1.1. Módulo de movilidad y concentración	38
2.4.1.2 Módulo de morfología	39
2.4.1.3 Módulo de Vitalidad (Viabilidad)	40
2.4.1.4 Módulo de Fragmentación ADN.....	41
2.5 Conservación de semen porcino.....	42
2.5.1 Refrigeración	43
2.5.2 Congelación	45
2.5.3 Lesiones estructurales	47
2.5.4 Mecanismos de acción del Complejo Ciclodextrina-Colesterol.....	49
3. METODOLOGIA	51
3.1 Área de estudio	51
3.2 Diseño experimental	52
3.3 Condiciones climáticas de la zona	52

3.4 Colecta de semen	52
3.5 Dilución del semen.....	53
3.6 Evaluación del semen y adición del complejo CDC-c	54
3.7 Preparación del complejo Ciclodextrina-Colesterol.....	55
3.8 Evaluación de la motilidad pos-dilución	55
3.9 Análisis de viabilidad espermática	55
3.10 Funcionalidad de Membrana (HOST)	56
3.11 Análisis estadístico.....	56
4. RESULTADOS Y DISCUSION	57
4.1 Motilidad.....	57
4.2 Viabilidad	59
4.3 Funcionalidad de membrana (HOST)	61
5. CONCLUSION	64
6. ANEXOS.....	65
6.1 Abreviaturas.....	65
6.2 Glosario.....	65
7. REFERENCIAS	66

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de la motilidad espermática	33
Tabla 2 Diseño experimental	52
Tabla 3 Distribución de las muestras	53
Tabla 4 Motilidad total (MT) de semen porcino tratado con CDC-c	57
Tabla 5 Motilidad Progresiva (MP) de semen porcino tratado con CDC-c	59
Tabla 6 Viabilidad de espermatozoides porcinos tratados con CDC-c	60
Tabla 7 Funcionalidad de membrana de espermatozoides porcinos tratados con CDC-c	62

Índice de figuras

Fig. 1 Órganos genitales del cerdo	12
Fig. 2 Testículo y sus partes anatómicas	13
Fig. 3 Epidídimo y segmentos anatómicos	14
Fig. 4 Espermatogénesis y sus etapas	20
Fig. 5 El espermatozoide y sus principales estructuras	22
Fig. 6 Anormalidades espermáticas de cabeza	24
Fig. 7 Anormalidades espermáticas de pieza media y cola	24
Fig. 8 Cámara de Neubauer	31
Fig. 9 Espermatozoides teñidos con Fluorocromos	35
Fig. 10 Espermatozoides teñidos con Lectinas	36
Fig. 11 Patrones de motilidad medidos por el sistema CASA	39
Fig. 12 Morfología y tinciones usados por el sistema CASA	40
Fig. 13 Espermatozoides teñidos con el kit comercia FluoVit.....	41
Fig. 14 Fragmentación de ADN visualizado por el sistema CASA	42
Fig. 15 Viabilidad de espermatozoides tratados con Vitasem+CDC-c	60
Fig. 16 Test de resistencia osmótica en espermatozoides tratados con Vitasem+CDC-c	62

Resumen

Las ciclodextrinas pueden formar complejos de inclusión con moléculas hidrofóbicas como el colesterol, los CDC-c se usan comúnmente para manipular los niveles de colesterol de las membranas celulares. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la adición del complejo Ciclodextrina - Colesterol (CDC-c) sobre la calidad de espermatozoides porcinos refrigerados a 5° C, tomando como variables dependientes la motilidad (MT y MP), viabilidad y funcionalidad de membrana durante 12, 36 y 60 h post-dilución. La colecta de semen se realizó semanalmente en unidades porcinas comerciales en Tepatitlan, Jalisco, México. Cada eyaculado fue evaluado microscópicamente, de los cuales solo se utilizaron eyaculados con una motilidad >70%. El semen fue dividido en dos partes iguales para ser diluidas en uno de dos extensores comerciales MRA® (Kubus S.A España) o Vitasem® (Magapor S.A España), posteriormente el semen con el diluyente se subdividió en dos muestras, y a cada una se le agregó el complejo CDC-c (1 mg / 120×10^6 espermatozoides) y otro se mantuvo sin la adición del complejo. Los resultados obtenidos en los parámetros de calidad seminal durante las primeras 12 h post-dilución fueron superiores cuando se adiciono el complejo CDC-c. La motilidad total observada fue superior ($P < 0.05$) en el tratamiento VITASEM+CDC-c (77 ± 10) que en los tratamientos MRA+CDC-c (63 ± 16), VITASEM (56 ± 16) y MRA (50 ± 16). La viabilidad espermática fue mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento VITASEM+CDC-c (82 ± 11) respecto al MRA+CDC-c (74 ± 11), VITASEM (59 ± 15) y MRA (53 ± 14). El porcentaje de espermatozoides con membrana funcional fue mayor ($P < 0.05$) en el tratamiento VITASEM+CDC-c (70 ± 14) que en MRA+CDC-c (58 ± 11), VITASEM (43 ± 14) y MRA (39 ± 12). La adición del complejo CDC-c al diluyente de semen porcino disminuye considerablemente los daños inducidos por el descenso de temperatura, mostrando mayores porcentajes de motilidad, vitalidad y funcionalidad de membrana en las primeras 12 y 36 h post-dilución.

Palabras clave: colesterol, membrana plasmática, motilidad, viabilidad, funcionalidad de membrana

Abstract

Cyclodextrins can form inclusion complexes with hydrophobic molecules such as cholesterol, CDC-c is used to manipulate cholesterol levels in cell membranes. The objective of the study was to evaluate the effect of the addition of the Cyclodextrin - Cholesterol (CDC-c) complex on the quality of porcine sperm chilled at 5 ° C, taking motility-dependent variables (MT & MP), viability and functionality of membrane for 12, 36 and 60 h post-dilution. Semen collection was done automatically in commercial pig units in Tepatitlán, Jalisco, Mexico. Each ejaculate was evaluated microscopically, of which only ejaculates with motility > 70% will be used. The semen was divided into two equal parts to be diluted in one of two commercial extenders MRA® (Kubus SA Spain) or Vitasem® (Magapor SA Spain), subsequently the semen with the diluent was subdivided into two samples, and each was I add the CDC-c complex (1 mg / 120x10⁶ sperm) and another one adapts without the addition of the complex. The previous results in the seminal quality parameters during the first 12 hours after dilution were superior when the CDC-c complex was added. The total motility observed was higher ($P < 0.05$) in the VITASEM + CDC-c (77 ± 10) treatment than in the MRA + CDC-c (63 ± 16), VITASEM (56 ± 16) and MRA ($50 \pm$ sixteen). The sperm viability was greater ($P < 0.05$) in the VITASEM + CDC-c (82 ± 11) treatment compared to the MRA + CDC-c (74 ± 11), VITASEM (59 ± 15) and MRA (53 ± 14). The percentage of sperm with functional membrane was higher ($P < 0.05$) in the VITASEM + CDC-c (70 ± 14) treatment than in MRA + CDC-c (58 ± 11), VITASEM (43 ± 14) and MRA (39 ± 12) The addition of the CDC-c complex to the pig semen diluent significantly affected by the damage induced by the temperature drop, showing higher percentages of membrane motility, vitality and functionality in the first 12 and 36 h post-dilution.

1 INTRODUCCION

La colección de semen es una de las actividades comunes en las explotaciones porcinas, debido a que es una vía para la valoración de la aptitud reproductiva del semental mediante la valoración manual o automatizada de la calidad espermática, además del posible empleo de las dosis para dilución y posterior inseminación artificial (IA) (Restrepo, 2008; Hasler, 2014; Moore y Hasler, 2017). La IA fue la primera gran biotecnología aplicada para mejorar la reproducción y la genética de los animales de granja (Foote, 2002) consiste en la deposición asistida del espermatozoides en la zona más idónea de las vías genitales de la hembra en el momento efectivo para la fecundación (Giraldo y Jairo, 2007).

En la actualidad, la inseminación artificial es una técnica reproductiva de aplicación en todo el mundo (Coraza et al., 1990; Thibier y Guérin, 2000; Boe-Hansen et al., 2008; Serhat et al., 2014) aunque el grado de utilización en los diversos países es muy variable, en general, la IA se realiza con semen fresco diluido o refrigerado a 16 y 18° C, y por lo regular en el mismo día de extracción o almacenado por uno a cinco días del material seminal. Sin embargo, se ha demostrado que a partir de las primeras 24h se produce una pérdida en los parámetros de calidad seminal (Kumaresan et al., 2009) por otra parte la tasa de parición es del 80-85 % cuando el semen se usa dentro de las 48 horas después de la recolección, reduciéndose más cuando se usa semen almacenado por más de 3 días. El principal objetivo de investigaciones en tema sobre conservación de semen refrigerado y criopreservado ha sido la estabilización de las membranas durante los cambios de fase perjudicial que ocurren durante el enfriamiento (Gibb y Aitken, 2016). Al someter a las células a estrés por el cambio de temperatura da como resultado un daño celular que compromete la funcionalidad de las células espermáticas (Harald et al., 2016).

Cuando la suspensión espermática se encuentra fuera del epidídimo, es necesario adicionar medios adecuados los cuales no solo tendrían que servir para aumentar el volumen del eyaculado, sino que también deberían proteger a los espermatozoides durante el enfriamiento, siendo la dilución un paso fundamental para aumentar el tiempo de vida de los espermatozoides (Aboul et al., 2017; Schulze

et al., 2017) a 15-17°C en el caso del semen refrigerado y a -190 °C en si se emplea la congelación. Sin importar cuál sea el método de conservación elegido, es necesario el uso y elección del diluyente correcto, el cual debe aportar los nutrientes necesarios para el mantenimiento metabólico (glucosa), protección frente al shock térmico (BSA), controlar el pH del medio (bicarbonato, TRIS, HEPES), presión osmótica (NaCl, KCl) y la inhibición del desarrollo microbiano (Rueda et al., 2009) .

1.1 JUSTIFICACIÓN

La IA con semen líquido extendido se usa ampliamente en la producción de muchas especies de interés zootécnico siendo la porcina la de mayor aplicación (Boe-Hansen et al, 2008) El semen líquido extendido a menudo se usa el mismo día de la producción, pero puede almacenarse a una temperatura de 15-20 °C hasta 5 días antes de la IA (McLaren y Bovey, 1992); sin embargo, se puede detectar un efecto sobre la tasa de parto y el tamaño de camada cuando el almacenamiento excede 48 o 72 h (Christensen et al., 2004) Mantener espermatozoides viables a bajas temperaturas y utilizarlo para inseminación artificial es un reto debido a la pérdida de características físicas y químicas que disminuyen los índices fertilidad con respecto al semen fresco diluido, aunado también a su gran sensibilidad al frío que poseen los espermatozoides porcinos, se complica la posibilidad de ser almacenados a temperaturas por debajo de los 15 °C (Ochoa y Ortega, 2008) a menos que su estructura bioquímica sea ligeramente modificada, adaptada para resistir bajas temperaturas (5 °C) lo suficiente para postergar el tiempo de conservación en una cámara de frío convencional pero sin provocar la formación de cristales de hielo, suprimiendo el efecto negativo criogénico, los diluyentes convencionales por si solos no resultarían efectivos, es por ello que la adición de ciclodextrinas saturadas de colesterol (CLC) con el fin de aumentar la cantidad de colesterol en la membrana espermática, favorecería las posibilidades del éxito reproductivo tras su conservación y en su utilización en la I.A (Lone et al., 2016; Lone, 2018) manteniéndolos viables por un periodo de tiempo prolongado lo que facilitaría su transporte a distancias más largas, logrando con ello una mayor

distribución del material genético, por otra parte conservar semen porcino a temperaturas inferiores a los 15 °C actuales, reduce los efectos nocivos de la contaminación microbiana.

1.2 HIPÓTESIS

El uso del complejo Ciclodextrina-Colesterol en la dilución seminal, mejora la resistencia al descenso térmico en las variables de calidad de espermatozoides porcinos durante su almacenamiento a 5°C

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo General

Evaluar los efectos del complejo Ciclodextrina-Colesterol en variables de calidad de espermatozoides porcinos conservados con dos diluyentes comerciales

1.3.2 Objetivos específicos

1. Conocer el efecto de la adición del complejo Ciclodextrina-Colesterol en la viabilidad e integridad de membrana del espermatozoide porcino refrigerado a 5°C
2. Determinar mediante la integridad y viabilidad de las membranas espermáticas cuál de los dos diluyentes comerciales muestra mejores resultados con el complejo Ciclodextrina-Colesterol.
3. Evaluar la viabilidad e integridad de membrana plasmática a las 12, 36, y 60 h pos-dilución.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Anatomía del Aparato Reproductor del Cerdo

El sistema reproductor del macho está formado por cierto número de órganos que actúan con el fin de producir espermatozoides además de estar fisiológicamente adaptados para llevar a cabo el proceso de reproducción (Cunningha, 1999) En todas las especies de reproducción sexual, las unidades básicas son las células germinales, es decir., el ovulo en el caso de las hembras y el espermatozoide para los machos. A grandes rasgos el aparato reproductor agrupa todos aquellos órganos en donde maduran y se almacenan las células germinales, los órganos a través de los cuales son transportadas en el proceso de la concepción de un nuevo ser y los órganos glandulares accesorios, al igual que todos los sistemas, están compuestos de varios órganos que a su vez estos están compuestos de células. En el verraco el AR está integrado por testículos, conductos excretores, glándulas accesorias y pene (Fig. 1). (Pond y Houpt, 1981; Banks, 2002)

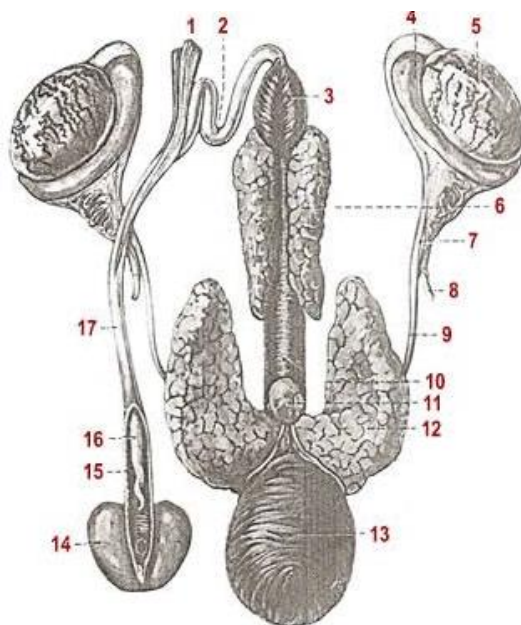


Fig. 1 Órganos genitales del cerdo. 1. Musculo retractor, 2. Flexura sigmoidea, 3. Musculo bulboesponjoso, 4. Epidídimo, 5. Testículo, 6. Glándula bulbouretral, 7. Cordón espermático, 8. Arteria testicular, 9. Conducto deferente, 10. Musculo uretral, 11. Cuerpo de la próstata, 12. Vesícula seminal, 13. Vejiga urinaria, 14. Divertículo prepucial, 15. Prepucio, 16. Glándula, 17. Cuerpo del pene. (Sisson y Grossman, 2001)

2.1.1 Testículos

Los testículos son las gónadas del macho, órganos sexuales primarios que tienen como función principal la producción de espermatozoides (función exocrina) y producción de hormonas esteroideas (función endocrina), funciones reguladas por el eje Hipotálamo-hipófisis-gónada (Dyce et al., 2012; Galina y Valencia, 2014). Se hallan en la región perineal tras la base del pene, en el interior de la bolsa de piel especializada, el escroto (Banks, 2002). El escroto los mantiene a 3-4 °C por debajo de la temperatura corporal, para la correcta producción, conservación y maduración de los espermatozoides (Fig. 2) es por ello que cuando en el exterior es frío, los músculos dartos y cremaster los acercan al abdomen y cuando la temperatura es alta se relajan (descienden). En los cerdos los testículos son de gran tamaño de contorno elíptico con una longitud aproximada de 13 cm, un diámetro de 7 cm y un peso de 360 g (Sisson y Grossman, 2001; Galina y Valencia, 2014)

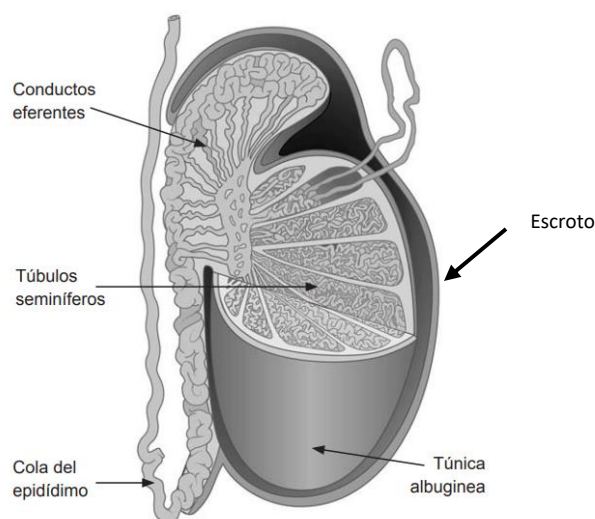


Fig. 2. Testículo y sus partes anatómicas

Las células de Leydig son sitio productor de la feromona del verraco, 5 α -androst-16-en-3-ona (androsteno), la cual cumple funciones biológicas importantes, como posibilitar la monta de la cerda durante tiempo suficiente para terminar el eyaculado, ocasionar liberación de oxitocina y sus contracciones para promover el transporte de los espermatozoides a través del tracto reproductivo, así como la inducción de la

pubertad en cerdas jóvenes (Claus et al., 1994; Aldal et al., 2005). La función reproductora del testículo consiste en la producción de espermatozoides a través del proceso de la espermatogénesis.

2.1.2 Epidídimo y conducto deferente

El epidídimo es una estructura íntimamente ligada a los testículos, se encarga de funciones como transporte, maduración y almacenamiento de espermatozoides (Galina y Valencia, 2014) sus dimensiones son de aproximadamente 18 cm de longitud y 85 g de peso. De esta se reconocen tres regiones anatómicas, la cabeza, que forma una estructura aplanada en uno de los polos testiculares, el estrecho cuerpo termina en el polo opuesto en la amplia cola la cual es muy grande y forma una proyección cónica aguda en el extremo caudal del testículo que continua con el conducto deferente (25-30 cm) porción anatómica que transporta el semen hacia la uretra durante el proceso de eyaculación (Pond y Houpt, 1981; Hafez y Hafez, 2002; Dyce et al., 2012)

Los dos primeros segmentos epididimarios se encargan de la maduración espermática mientras que la terminal se destina a almacenamiento (75% del total de células espermáticas) lugar en la cual el espermatozoide conserva capacidad fecundante durante varias semanas (Fig. 3)

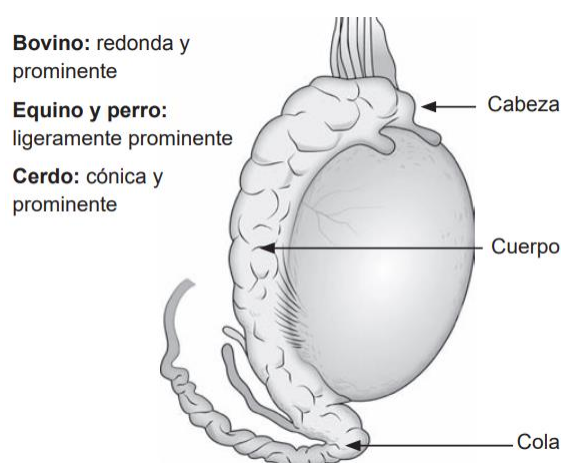


Fig. 3 Epidídimo y segmentos anatómicos.

2.1.3 Glándulas Accesorias

Son aquellas porciones anatómicas del aparato reproductor encargadas de aportar el medio líquido para el transporte de los espermatozoides, proporcionan agentes químicos específicos que brindan un ambiente adecuado para la supervivencia espermática, dentro de los componentes conocidos que brindan en sus secreciones se encuentran la fructosa y el ácido cítrico (Hafez y Hafez, 2002)

2.1.3.1 Próstata

Es una glándula multilobular que consta de un cuerpo (bulbo) y porción diseminada. El cuerpo es una parte externa claramente distinta del resto de la estructura, la porción diseminada se encuentra distribuida en toda la longitud de la uretra bajo una capa muscular por lo que no es detectable por medio de palpación (Pond y Houpt, 1981; Hafez y Hafez, 2002; Galina y Valencia, 2014) La secreción de la próstata contribuye a la formación del 60% del eyaculado en el verraco. El cuerpo pesa aproximadamente 5-25 g, mide 2.5 cm de ancho.

2.1.3.2 Vesículas seminales

Son órganos pares localizados en la cavidad pélvica, porción lateral respecto a las porciones terminales de cada conducto deferente, tienen forma alargada lobulada y están formados por grandes lobulillos. La secreción de estas glándulas representa de 10 a 30% en el verraco, comparte junto con el conducto deferente un conducto eyaculatorio común que se abre en la uretra (Galina y Valencia, 2014; Hafez y Hafez, 2002; Banks, 2002) Posee dimensiones de 13 cm de largo, 7 cm anchura, 4 cm de grosor y un peso de 210 g.

2.1.3.3 Glándulas bulbo-uretrales

También llamadas glándulas de Cowper, son estructuras pares compactas en forma de nuez localizada en posición dorsolateral a la uretra pélvica. Debido a que están cubiertas por tejido fibroso y por parte del musculo bulboesponjoso (Galina y Valencia, 2014) La secreción de estas glándulas en otras especies no forma parte

del eyaculado debido a que su función básicamente consiste en limpiar y lubricar la uretra para el paso del eyaculado, en otras palabras la secreción de estas glándulas forma parte del pre-eyaculado, sin embargo en el caso del verraco se considera que forma parte del eyaculado, aportando el componente gelatinoso en un 15-30% y que además participa en la coagulación del mismo (Hafez y Hafez, 2002; Banks, 2002) en el verraco tiene un peso de 85 g y 16 cm de longitud.

2.1.4 Genitales externos

2.1.4.1 Pene

Es el órgano copulador del macho, en todas las especies es más o menos cilíndrico, y se extiende desde el arco isquiático, hasta cerca del ombligo sobre la pared abdominal ventral, se divide en raíz, cuerpo y glande. El cuerpo del pene está rodeado por una capsula fibrosa gruesa (la túnica albugínea), contiene numerosos espacios cavernosos (cuerpo cavernoso peneano) y el cuerpo esponjoso capaz de retener sangre incrementar su volumen y rigidez, esta porción rodea de manera inmediata a la uretra (De-Alba, 1985; Cunningham, 1999; Hafez y Hafez, 2002) En el caso de los carnívoros, equinos y humanos (pene vascular) se observan grandes espacios en el cuerpo cavernoso, mientras que en el verraco y rumiantes (pene fibroelástico) los espacios son pequeños debido a que el cuerpo cavernoso es menos desarrollado (Galina y Valencia, 2014) por otra parte en estas últimas especies, se encuentra una flexura característica que las demás no poseen (flexura sigmoidea o “S” peneana) la cual se distiende por relajación de los músculos retractores durante la erección. La parte anterior del pene (glande) posee diferente forma de acuerdo a la especie, en el cerdo no existe una estructura que se diferencie como tal del cuerpo, por ello el glande en esta especie es una continuación que termina en forma de tirabuzón (Banks, 2002; Galina y Valencia, 2014)

2.1.4.2 Prepucio

Pliegue de doble capa que envuelve al pene con el objetivo de proteger, lubricar y cubrir el glande posee una capa externa y una interna recubierto por una mucosa,

es móvil y elástica, en el cerdo tiene un orificio estrecho en el cual existe pelos (Sisson y Grossman, 2001) la membrana de recubrimiento de la parte caudal es papilada, contiene numerosos ganglios linfáticos, en la pared dorsal existe una abertura llamada *diverticulum preputial* el cual varía de tamaño en diferentes sujetos.

2.1.4.3 Uretra

Conducto tubular que forma parte del sistema renal y reproductivo en los machos, debido a que es el conducto excretor de la orina y el semen. En los cerdos tiene una parte pelviana muy larga (15-20 cm) cubierta por un grueso músculo uretral excepto dorsalmente donde existe una capa fibrosa densa (Sisson y Grossman, 2001)

2.2 El espermatozoide

El espermatozoide (del griego *sperma*, semilla, y *zoo*, animal) es la célula sexual de los machos en todas las especies, es considerada la célula más especializada de todas, ha evolucionado hasta llegar a ser diferente de los demás tipos celulares (Roldan, 2002). Su estructura general está constituido por una cabeza, una pieza intermedia y una cola. Debido a que existe una gran diversidad de especies, no todos los espermatozoides son iguales, es por ello que el gameto sexual del macho posee diversidad morfológica en base a su cabeza, en la cual contiene el paquete genético, una pieza media con mitocondrias que da movilidad al flagelo. No todos los espermatozoides son iguales y no todos llevan los procesos de capacitación y RA (reacción acrosomal) al mismo tiempo dentro del aparato reproductor de la hembra. Por ello es importante conocer los procesos que sufren los espermatozoides desde su producción hasta los cambios bioquímicos que desencadenan la interacción con el ovocito para dar lugar a la fertilización

2.2.1 Espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso de división meiótica de los gametos masculinos a partir de una población de células madre diploides llamadas

espermatogonias (Creasy y Chapin, 2013), dicho proceso se lleva a cabo en los testículos, específicamente en las paredes de los túbulos seminíferos donde también se encuentran las células somáticas de sertoli (Zirkin et al., 2011) el proceso está regulado por señales hormonales regulado por el eje Hipotalamo-Hipofisis-Gonadas bajo la liberación de la hormona luteinizante y la folículo estimulante (LH y FSH). En el interior de los túbulos seminíferos el proceso de diferenciación pasa por diversas etapas, las cuales inician con una espermatogonia, esta da paso a un espermatocito, esta a su vez a un espermátide y finalmente espermatozoide. Las células germinales se producen en los testículos, mediante un proceso permanente de divisiones mitóticas dando origen a las espermatogonias. En la especie porcina dura alrededor de 25-26 días y la maduración y transporte desde el testículo al epidídimo alrededor de 16 días, tomando la totalidad del proceso alrededor de 50-55 días (Pinart et al, 2000; Larson et al, 2018) El ciclo posee tres fases diferenciadas (Fig. 4)

1. Fase de espermatocitogénesis, también denominada fase de proliferación, consiste en divisiones mitóticas sucesivas de las espermatogonias para dar lugar a los espermatocitos primarios. En el cerdo existen 4 clases de espermatogonias que se irán sucediendo tras el ciclo (espermatogonia indiferenciada tipo A, espermatogonia diferenciada tipo A, espermatogonia Intermedia y espermatogonia tipo B en la fase final de la espermatocitogenesis).
2. Fase espermatocitaria o meiótica, que consiste en la división meiótica de los espermatocitos primarios (derivados de las espermatogonias tipo B) que generan a los espermatocitos secundarios y posteriormente a las espermátides. En esta fase se asegura la diversidad genética al producirse la replicación del material genético (ADN).
3. Fase espermiogenica (diferenciación) consiste en una serie de cambios morfológicos y fisiológicos de las espermátides que dará lugar a un espermatozoide diferenciado (Hafez y Hafez, 2002; De-Vos et al., 2003; Gómez et al., 2005). El epitelio del túbulo seminífero contiene células de

Sertoli y células germinales en diferentes etapas: espermatogonias, espermatocitos, espermatidas y espermatozoides. Los cambios que ocurren en la espermiogénesis consisten en:

- a) formación del acrosoma, que se extiende sobre la mitad de la superficie nuclear y contiene enzimas que ayudarán a la penetración del ovocito
- b) condensación del núcleo
- c) formación del cuello, pieza media y flagelo y d) eliminación de la mayor parte del citoplasma (Hafez y Hafez, 2002; Gómez et al., 2005).

Durante la espermiogénesis el centriolo produce el flagelo del espermatozoide, aquí las mitocondrias se reúnen y se acomodan en la base del núcleo formando parte de la pieza media, el aparato de Golgi dará origen a la vesícula acrosómica, el resto del citoplasma se elimina y el núcleo se condensará (Gilbert, 2005). Una vez finalizado el proceso de espermiogénesis, los espermatozoides son liberados hacia el lumen de los túbulos seminíferos en un proceso llamado: espermiación y son transportados hacia el epidídimo, donde alcanzan la maduración necesaria para adquirir la capacidad de fertilizar al ovocito (Gadella y Van Gestel, 2004)

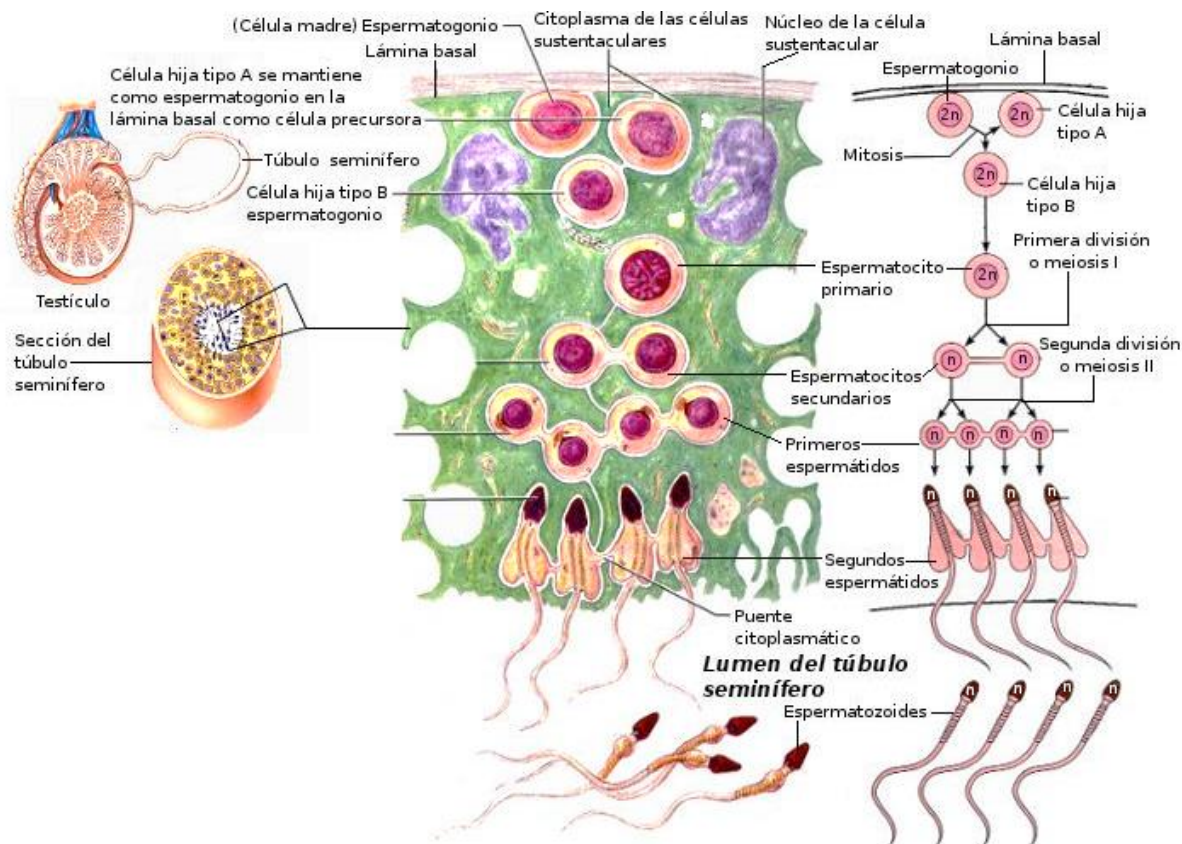


Fig. 4. Espermatogénesis y sus diferentes etapas. De Izquierda a derecha se observa el testículo, el tubo seminífero, tejido dentro de los tubulos seminíferos y diferenciación de las células hasta llegar a espermatozoides maduros. Cummings (2001)

2.2.2 Morfología espermática

El espermatozoide en las diferentes especies domesticas como conejo, cerdo y borrego tienen una apariencia microscópica simétrica con una cabeza oval de contorno regular y que al teñirlo se observan zonas bien definidas como: membrana acrosómica que cubre más de la tercera parte de la cabeza y la sub-acrosómica que cubre el resto de la cabeza. En el cerdo el espermatozoide tiene una longitud aproximada de 45 μm y se diferencia en las siguientes regiones (Fig. 5)

- **Cabeza:** Posee forma ovalada y plana, tiene una longitud aproximada de 7 μm de longitud y 4 μm de grosor, en esta región también se puede diferenciar
 - a) Acrosoma: Una vesícula en forma de capuchón ubicada sobre el núcleo, alcanzando un 80% de su longitud.

- b) Lamina densa: También denominado como región postacrosomica, representa la parte de la cabeza que no está rodeado por el acrosoma.
- c) Espacio subacrosomico: Es el espacio existente entre el nucleo y la membrana acrosomica interna.
- d) Núcleo: Espacio interior la cual contiene la cromatina en elevada condensación.
- e) Material fibroso perinuclear: Se dispone formando una lámina alrededor del nucleo.
- **Cuello o pieza de conexión:** Mide aproximadamente 0.7 μm de longitud. Posee forma ligeramente conica, tiene una base ancha en contacto con la cabeza y una más estrecha en contacto con la pieza intermedia.
- **Cola:** Región anatómica responsable del movimiento del espermatozoide. Anatómicamente se diferencian 3 regiones.
 - a) *Pieza intermedia*, en la cual se diferencian 3 regiones mas.
 - i. Axonema: ocupa el eje, presenta forma microtubular y otros componentes como brazo de deneina, fibras de nexina, radios, puentes y vaina central.
 - ii. Vaina mitocondrial: Localizada debajo de la membrana plasmática y formada por varias mitocondrias alargadas dispuestas helicoidalmente
 - iii. Fibras densas: Estructuras citoesqueleticas y filamentosas que se disponen entre la vaina mitocondrial y cada uno de los microtubulos periféricos.
 - b) *Pieza principal*
 - i. Vaina fibrosa, que constituye a la vaina mitocondrial
 - ii. Annulus o anillo de Jensen: es una estructura dispuesta entre los límites de la pieza intermedia y la pieza principal. Tiene forma anular y separa la vaina mitocondrial de la vaina fibrosa.
 - c) *Pieza terminal*: formada únicamente por la membrana plasmática y el axonema.

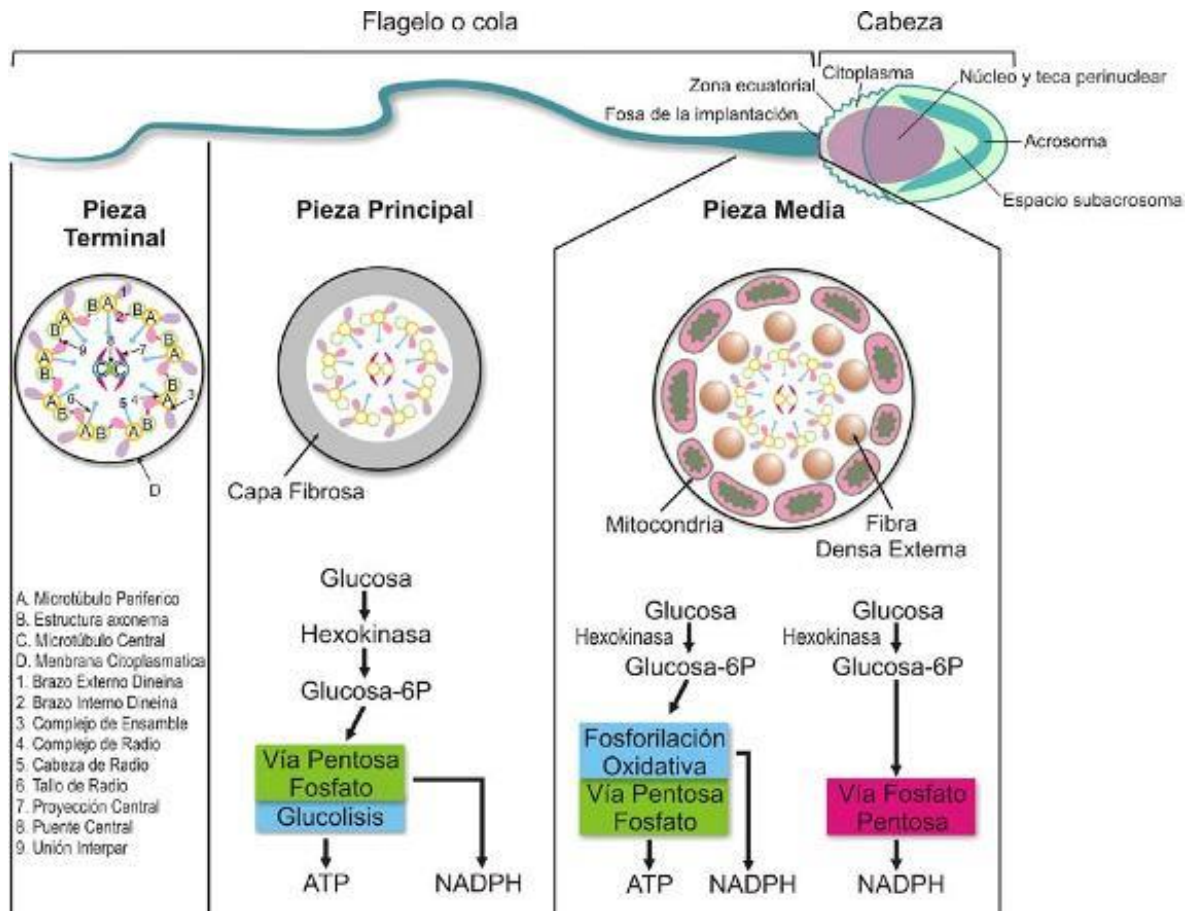


Fig. 5 El espermatozoide y sus principales estructuras. Caracterizándose la cabeza, pieza media et ala así como tipo de fibra y estructuras en cada segmento. Tomado de Olivera et al (2006).

2.2.2.1 Anormalidades morfológicas

En el eyaculado, no todos los espermatozoides son aptos y con las características adecuadas para lograr la fertilización del ovocito, es por ello que el estudio de la morfología de los mismos tiene gran importancia al momento de la evaluación al proporcionar parámetros que nos permitan conocer la calidad del eyaculado (De Vos et al., 2003; Rodríguez et al., 2013) teniendo en cuenta que la teratozoospermia puede afectar drásticamente la fertilización, desarrollo embrionario e implantación, se han desarrollado métodos para realizar la evaluación de la morfología espermática tomando en cuenta diversos criterios en la anatomía espermática. Las anomalías se pueden clasificar en primarias y secundarias.

Se dice que una anomalía es primaria cuando reflejan anomalías producidas en el testículo (fallas durante la espermatogénesis) , y secundarias cuando toman lugar durante el tránsito a través del sistema ductal o cuando se producen como consecuencia de errores de manejo del semen a partir del momento de la obtención del mismo (Hafez y Hafez , 2002; Jurado et al., 2008). Cierta porcentajes de anomalías es común en los eyaculados, cuando el porcentaje es mayor a lo tolerado la dosis no es considerada apta para congelación o inseminación, para la mayoría de los mamíferos se considera un semen de buena calidad cuando el 70% de espermatozoides se encuentran con una morfología normal, representando las anomalías primarias menos del 10% y las anomalías secundarias menos del 20%, en otras palabras el nivel de anomalías totales no debe ser mayor a 30% (Gómez et al., 2005).

A continuación se propone la siguiente clasificación basada en las anomalías descritas con mayor frecuencia.

Anomalías Primarias

Forma de cabeza: piriforme, lanceolada, angosta o estrecha.

Acrosoma: desprendido, rugoso, pequeño.

Tamaño de cabeza: microcefalia, macrocefalia.

Cabeza desprendida.

Doble cabeza.

Cuello paraxial.

Anomalías Secundarias

Espermatozoides con gota citoplasmática proximal.

Espermatozoides con gota citoplasmática distal.

Espermatozoide con cola enrollada.

Espermatozoide con acrosoma desprendido.

Espermatozoide con cola quebrada.

En las siguientes figuras (6 y 7) se pueden observar ejemplos de anomalías espermáticas de cabeza, pieza media y cola (Barth y Oko 1989; Hafez y Hafez, 2002)

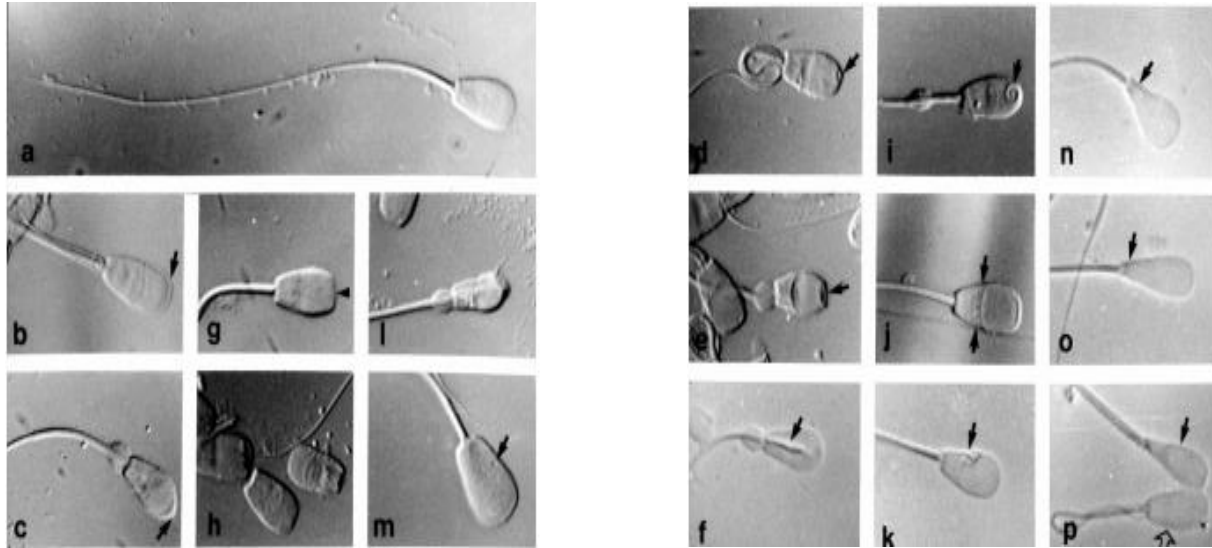


Fig. 6 Ejemplo de anomalías espermáticas de cabeza, donde: a: espermatozoide normal, b: acrosoma levantado c, d, e y g: diferentes formas de defecto específico de acrosoma, f: defecto de cresta, h: cabezas sueltas normales, i: cráter nuclear, j: defecto de diadema, k: defecto de cráter lateral, l: pequeña m: gigante n: forma de pera o y p: cabezas estrechas.

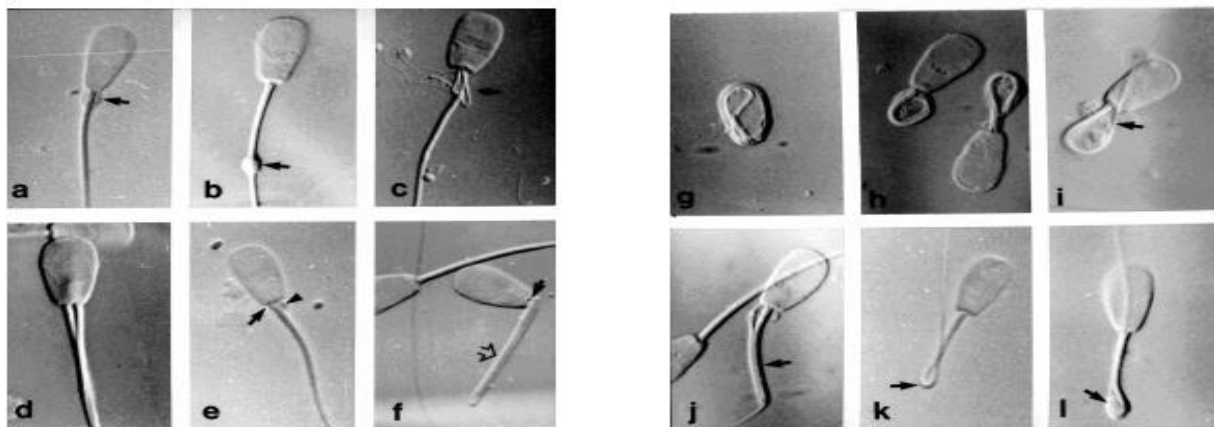


Fig. 7 Anomalías espermáticas de pieza media (Izquierda, a-f) anomalías de cola (Derecha, g-l). Donde a: gota citoplasmática proximal, b: gota citoplasmática distal, c: pieza media desorganizada, d: pieza media doble, e: implantación abaxial de cola, f: nuca rota, g: cola enrollada alrededor de la cabeza, h-i: cola enrollada debajo de la cabeza, j: cola doblemente enrollada, k: cola doblada simple (en látigo), l: cola en látigo con una cola citoplasmática distal retenida.

2.2.3 Fisiología espermática

Durante el desarrollo espermático, es necesario que estas células sexuales pasen por una serie de procesos fisiológicos para obtener la capacidad de fertilizar, estos son: maduración epididimaria, capacitación y reacción acrosomal. Como ya se describió anteriormente la maduración se adquiere durante el tránsito por el epidídimo, es decir una vez que son transportados por la cabeza, cuerpo y cola de dicha estructura estos se consideran maduros y fértiles (aun cuando no exista contacto con el plasma seminal) (Hernandez et al., 2016; Robaire y hinton, 2015) Este proceso de maduración ocurre aun cuando estas células sexuales se encuentran en el macho, caso contrario ocurre con la capacitación y reacción acrosomal debido a que son procesos que se llevan a cabo después de la eyaculación dentro del aparato reproductor de la hembra durante el transporte hacia el oviducto (Olivera et al., 2006)

2.2.3.1 Capacitación

La capacitación espermática es un proceso que le acontece al gameto cuando este es depositado en la vagina o en el cérvix dependiendo de la especie de mamífero que se trate y es transportado a través del útero y oviducto. Durante este proceso, los espermatozoides entran en contacto con las secreciones uterinas, pasan de un ambiente inmerso en plasma seminal, compuesto por diferentes sustancias como glucosa, colesterol, triglicéridos, albumina, calcio y otros compuestos más, para ahora dar paso al contacto con el moco uterino, el cual entre sus diversos compuestos se encuentra, el calcio y albúmina (factores capacitantes). Una vez que se da la sustitución de plasma seminal a moco uterino, la membrana espermática sufre cambios bioquímicos, modificación del pH intracelular, incremento de la permeabilidad para iones como el Ca^{2+} , aumento en la fluidez de la membrana plasmática y su metabolismo, y a la modificación de los patrones de fosforilación de proteínas y composición lipídica (salida de colesterol facilitada por las concentraciones de albumina en el moco) haciendo más flexible la membrana plasmática (Gadella et al., 1999, Risopatron et al., 2005; Olivera et al., 2006). Todos

estos factores y cambios bioquímicos favorecen la fusión de la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa (Avalos et al., 2004) Otro cambio muy marcado en los espermatozoides que han adquirido la capacitación es el aumento de la movilidad flagelar conocido como hipermovilidad. Existen diversas sustancias involucradas en la inducción de la capacitación espermática, entre las que se encuentran iones, como calcio, sodio, cloro, potasio, así como bicarbonato y hormonas como progesterona y estradiol.

2.2.3.2 Reacción acrosomal

La reacción acrosomal es la última fase que consiste en la fusión de membranas plasmática y acrosomal externa seguida de la formación de vesículas que facilitan la salida del contenido acrosomal (enzimas hidrolíticas). Estas enzimas permiten la degradación de la zona pelúcida y la posterior penetración del espermatozoide hacia el citosol del ovocito fertilizándolo (Anderson y Navara, 2011; Lemoine et al., 2011) En los mamíferos, se reconoce que la fusión y la posterior vesiculación del acrosoma externo y la membrana plasmática suprayacente ocurren en múltiples puntos en la región apical del acrosoma, lo que resulta en la formación de varias perforaciones a través de las cuales se libera el contenido acrosómico seguido de la pérdida de la tapa acrosómica de la cabeza del esperma. La reacción acrosomal puede inducirse *in vitro* con zona pelúcida, progesterona, estradiol, así como con ionóforos como el A-23187 (Avalos et al., 2004).

2.3 Colección de Semen Porcino

Área de colección

El área de colección debe ser un lugar que cumpla ciertas características sanitarias para evitar la contaminación de las muestras. Debe estar limpio y debe ser fácil de desinfectar. Es importante realizar la limpieza del área del suelo todos los días, eliminando heces, semen y otros desechos, la desinfección semanal es conveniente. En cuanto a dimensiones debe contar con medidas aceptables para brindar seguridad al operador y confort al semental (Gadea, 2005)

Conociendo el tiempo de monta de los sementales y el peso de estos, es importante que el potro de colección se encuentre fijo en el suelo, debe tener la facilidad de ajustar la altura e inclinación facilitando la colección por el operador y la monta por parte del verraco. La utilización de una alfombra en la parte trasera del potro puede evitar resbalones, permitiéndole al verraco un buen salto en el primer intento

2.3.1 Material para coleccionar

Preferentemente, el eyaculado debe ser colectado en vasos de cartón tapados con gasa médica o filtro de papel. Los mejores resultados se obtienen con gasa doblada en varios grosores (para separar la fracción rica en espermatozoides) y ajustada al vaso con una banda elástica. De igual manera se puede usar bolsas de plástico desechables o vasos de precipitado (de vidrio), aunque estos últimos requieren ser previamente esterilizados. Sin importar cuál sea el recipiente de elección, antes de realizar la colecta estos se deben atemperar para evitar el choque térmico del semen, debe limpiarse tras cada colecta y antes de utilizarlo debe precalentarse a 38 °C. Todas las manipulaciones deberán ser efectuadas empleando guantes de polivinilo no empolvados. Evitar el uso de guantes de látex para cirugía (empolvados), ya que el polvo utilizado puede tener propiedades espermicidas. Una vez colocado los guantes y para evitar la contaminación, no se debe tocar al verraco, instrumental, instalaciones o cualquier otra cosa excepto el pene del cerdo

2.3.2 Obtención del semen

La colección de semen porcino al igual que en otras especies domésticas, puede realizarse de diversos métodos. Puede llevarse a cabo mediante el uso de vagina artificial, electroeyaculación (solo recomendado para verracos lesionados incapaces de montar) o manualmente, ya sea con la mano enguantada (método japonés) descrito por Hancock y Howell (1959) o introduciendo el pene en un cilindro de goma desechable (francés) sin embargo a nivel de campo el método de la mano enguantada resulta ser la más cómoda, rápida y fácil de realizar, solo se necesita un potro en el cual los sementales entrenados montan sin ningún problema.

La técnica de la mano enguantada permite obtener un normal y completo eyaculado. Una vez que el semental ha realizado la monta en el potro, deja el pene al descubierto, se procede a sujetarlo suavemente y ejerciendo una ligera tracción hacia adelante para forzar su amplexación, se debe aplicar una ligera presión para estimular la eyaculación la cual puede durar de cuatro a 10 minutos.

De acuerdo a Hacker et al (1994) y Geisert (1999) el eyaculado del verraco está formado por tres fracciones:

- *Fracción pre-espermática* constituida fundamentalmente por plasma seminal de aspecto transparente, provenientes de la próstata, glándulas vesículas y de Cowper, su función fisiológica consiste en la preparación de la uretra para el paso de los espermatozoides, representa entre el 5 y 20% del total del eyaculado.
- *Fracción rica o espermática* de aspecto lechoso, con una elevada concentración de espermatozoides y secreciones de las glándulas vesiculares y próstata, representa aproximadamente entre el 30 y 40% (40-100 ml) del eyaculado total.
- *Fracción post-espermática* también de color blanquecino, pero casi transparente debido a la gran cantidad de plasma seminal que contiene, con pocos espermatozoides pero abundantes corpúsculos gelatinosos denominados comúnmente como “tapioca” procedentes de las glándulas de Cowper. Estos corpúsculos se liberan durante todo el eyaculado pero es en esta parte final donde existe mayor liberación y su función es sellar el cérvix de la hembra evitando el reflujo del eyaculado del verraco

2.3.3 Evaluación seminal

El método estándar para evaluar la fertilidad de machos reproductores, aparte de la evaluación directa de hembras gestantes en la piara, es el examen del semen (seminograma) mediante el cual es posible predecir el potencial reproductivo de los sementales, la evaluación se realiza por medio de la observación de características

macroscópicas y microscópicas (Donoghue y Wishart, 2000; Asprón, 2004; Fu-Jun y Xiao-Fang, 2012)

2.3.4 Características macroscópicas

2.3.4.1 Color del eyaculado

Esta característica se evalúa por medio de la visualización en el laboratorio. El color del eyaculado depende del contenido de riboflavina, siendo normalmente desde blanquecino marfil hasta amarillento. Una coloración rojiza, indica la mezcla con sangre fresca; si el color es pardo, indica la presencia de sangre más vieja (hemolizada), denominándose ambos tipos como hemospermia. Una coloración gris indica contaminación. Los eyaculados sin espermatozoides tienen una coloración amarillo-verdosa y son de apariencia acuosa. El pus en el eyaculado se reconoce frecuentemente por la presencia de flóculos, denominándose piospermia.

2.3.4.2 Volumen

La medición de éste parámetro permite registrar la producción de semen del verraco. Su valor se utiliza para calcular la concentración espermática en el eyaculado y para determinar el número de dosis a preparar para I.A. El volumen del eyaculado se expresa en mililitros (ml), y su lectura se hace por medio de un tubo recolector graduado. Normalmente dicho valor, para el eyaculado de cerdos, es de aproximadamente 50 – 500 ml (Colenbrander y Kemp, 1990)

2.3.4.3 Densidad macroscópica

Para la evaluación de la densidad macroscópica se han establecido criterios basados en intervalos de concentración espermática, dependiendo de la opacidad de las muestras, lo que indica mayor o menor concentración espermática. Esta evaluación debe ser verificada en la evaluación microscópica, en la cual se calcula con gran precisión la concentración espermática, mediante el uso de la cámara de Neubauer o cualquier método de cuantificación de concentración, como el espectrofotómetro.

2.3.4.4 pH

Es una medida del grado de acidez o alcalinidad y es un indicador de la actividad metabólica de los espermatozoides. Conforme envejece el eyaculado aumenta la producción de ácido láctico y desciende el pH. Los valores normales se encuentran entre 6,8 y 7,8 con un valor óptimo entre 6,9 y 7,2 (IIP, 2008).

2.3.5 Características microscópicas

2.3.5.1 Concentración espermática

La concentración de los espermatozoides se define como el número de espermatozoides/ml de semen. La cantidad resultante es de utilidad al momento de calcular la tasa de dilución si se requiere congelar las muestras. Se determina mediante métodos semejantes al recuento de glóbulos rojos en hematología, haciendo conteo directo de células, a través del hemocitómetro o cámara de Neubauer. La cámara de Neubauer consiste de una laminilla especial que tiene dos cámaras de conteo. Las cámaras de conteo poseen 0.1 mm de profundidad y un área graduada en el fondo de la cámara de 1 mm². Este cuadro se divide en 25 cuadros de menor tamaño. Los datos anteriores de profundidad y área sirven para determinar el número de espermatozoides en un volumen dado (Fig. 8)

Al utilizar la cámara, los espermatozoides deben permanecer inmóviles para poder realizar cómodamente el conteo, para ello se utiliza NaCl al 3% debido a que es una solución hipertónica causa muerte de los espermatozoides, facilitando así el conteo. La dilución de la muestra de semen, para determinar la concentración espermática en el caso del cerdo es de 1:200 (Bearden et al., 1982). Esto quiere decir que se diluye 1 volumen de semen en 199 volúmenes iguales de NaCl al 3% o cualquier otra solución de elección. Una vez diluido el semen e inmovilizados los espermatozoides, se coloca el semen diluido en la cámara de Neubauer. Para calcular la concentración de espermatozoides se utiliza la siguiente ecuación: (Espermatozoides/ml)= Número de espermatozoides contados en 5 cuadrados (4 esquinas + el centro) x 5 x dilución (1:200) x 10 x 1000.

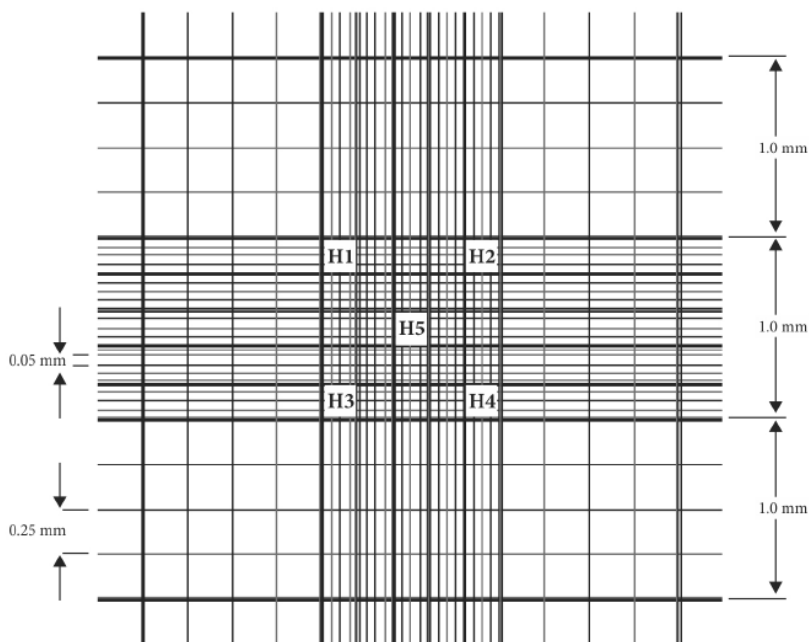


Fig. 8. Regiones de la cámara de Neubauer (H1, H2, H3, H4, H5) que se consideran para el conteo de la concentración espermática

Además de estas técnicas antes descritas, también se encuentra la evaluación de semen *in vitro*, mediante la cual se puede evaluar la capacidad fecundante tanto de semen fresco como de semen descongelado, aunque son pruebas de alta complejidad, ya que existen diferentes atributos necesarios para que un espermatozoide pueda fecundar un óvulo (Graham y Mocé, 2005; Romar et al, 2019).

2.3.5.2 Evaluación de la motilidad Masal

Por movimiento de masa se entiende, el movimiento en onda de todos los espermatozoides, observado en los eyaculados densos. De acuerdo a Muiño et al (2009) la motilidad espermática normalmente se valora de forma subjetiva, mediante la observación de una muestra de semen a través de un microscopio de contraste de fase, coadyuvado de una platina calentadora a 37°C. Este es el método más simple, rápido y barato de evaluar la motilidad, pero tiene el inconveniente de ser altamente subjetivo.

Para su evaluación se toma una gota del semen a examinar (gota de semen íntegro) con una pipeta, se coloca la gota sobre un portaobjeto previamente atemperado a

37°C y se observa en campo claro (aumento 10X), es necesario recordar que esta evaluación se realiza sin colocar el cubreobjeto. De acuerdo a Rosenberger (1981), el grado del movimiento en masa o motilidad masal (MM) se describe según la siguiente escala:

1. Ligero temblor de los espermatozoides.
2. Trayectos sinuosos con desplazamiento muy lento.
3. Trayectos sinuosos con desplazamiento bien visible.
4. 50% de trayectos rectilíneos con un desplazamiento muy rápido.
5. 100% de los trayectos rectilíneos con un desplazamiento muy rápido

2.3.5.3 Motilidad Progresiva

La motilidad progresiva de una muestra de semen se expresa como el porcentaje de células móviles bajo un campo microscópico. Esta prueba de la motilidad debe hacerse con la ayuda de un microscopio óptico (aumento 60X) a una temperatura de 37°C. En la evaluación de la motilidad individual de los espermatozoides se estima el porcentaje de células espermáticas con movimiento progresivo lineal (MPL), movimiento *in situ* y espermatozoides inmóviles (Vassan, 2011). Para ello, se toma con una pipeta 10 µL del semen, se coloca sobre un portaobjeto a temperatura de 37°C y se cubre con un cubreobjeto.

La motilidad progresiva puede clasificarse de acuerdo a la siguiente escala.

- Muy buena: cuando el 80 – 100 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Buena: cuando el 60 - 79 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Regular: cuando el 40 - 59 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.
- Pobre: cuando menos del 40 % de espermatozoides presentan movilidad progresiva.

Por otra parte la Sociedad de Teriogenología de Estados Unidos de Norteamérica (1992) menciona la alta relación entre la motilidad espermática masal y la individual tomando como valores mínimos aceptables para monta natural, una motilidad individual de 30% y una motilidad masal regular., caso contrario sucede si la muestra es destinada a la congelación en la cual los parámetros de motilidad deben ser de una motilidad masal regular (+) con 50% de motilidad individual, debido al estrés térmico al que se someten los espermatozoides durante el proceso de congelacion-descongelacion.

Tabla 1. Clasificación de la motilidad espermática de acuerdo a la Sociedad de Teriogenología de los Estados Unidos de Norteamérica

<i>Motilidad</i>	Excelente	Buena	Regular	Mala
Masal	+++	++	+	-
Individual	≥ 70%	50-70%	30-50%	≤ 30%

2.3.5.4 Determinación de la vitalidad espermática

Esta característica mide el número de espermatozoides vivos y se expresa como el porcentaje de células muertas. Para medir la vitalidad de una muestra de semen, se utilizan diversas tinciones vitales, tales como el colorante eosina-nigrosina (Cabrera y Pantoja, 2012; Gómez et al., 2012). Los flourocromos son métodos más precisos en la cual los espermatozoides vivos muestran colores característicos dependiendo de la tinción fluorescente utilizada, estos por lo regular poseen rangos de excitación en nanómetros (Hae-Lee et al., 2009; Hernández, et al, 2015). Las lectinas por su parte son proteínas capaces de aglutinar células y enlazarse de forma específica a carbohidratos. Se utilizan como marcadores para emplearlos en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática. Generalmente se utilizan lectinas conjugadas con marcadores fluorescentes, como la biotina (Hernández et al., 1999; Kawakami, et al., 2002; Rodríguez et al., 2004)

2.3.5.5 Tinción vital

El procedimiento habitualmente utilizado para la valoración de la vitalidad son las técnicas de tinción vital que permiten diferenciar los espermatozoides vivos de los muertos debido a la permeabilidad de la membrana plasmática a los colorantes vitales; por lo tanto, aquellas células que presentan una membrana plasmática funcional no permiten el paso del colorante, mientras que si está alterada el colorante penetra en el interior de la célula.

El método tradicional es la tinción con eosina-nigrosina. El procedimiento muestra una extensión donde aparecen células vivas de color blanco sobre un fondo púrpura, o teñidas de rosa si están muertas. Para la valoración de la viabilidad se realiza la observación en aumento de 40X en diferentes campos para observar espermatozoides con una coloración rojiza aquellos que hayan perdido la permeabilidad celular y se consideran muertos y por otra parte aquellos sin coloración indicando que conservan la permeabilidad y se consideran como vivos. Se cuentan al menos 100 espermatozoides en total, haciendo la diferencia entre vivos y muertos y de esta manera se determina el porcentaje de vitalidad. El mayor inconveniente que presenta el uso de la eosina-nigrosina es que, al ser un colorante hipotónico que se añade a una muestra que no ha sido fijada químicamente, puede producir morfologías anormales en los espermatozoides, especialmente defectos en la cola (Pérez y Pérez, 1985; Peña y Linde 2000).

2.3.5.6 Fluorocromos

Las pruebas basadas en fluorescencia utilizan fluorocromos impermeables solos o combinados con tinciones fluorescentes permeables (Fig. 9) (Harrison y Vickers, 1990; Pintado et al., 2000; Martínez et al., 2004; Silva y Gadella, 2006; Fraser et al., 2007). Los espermatozoides con membrana plasmática íntegra excluyen a aquellas tinciones impermeables, las cuales penetran y tiñen específicamente las células muertas. Ofrecen un método sensible para obtener información acerca de la estructura, función y viabilidad de la célula. Algunos de los fluorocromos utilizados se unen covalentemente a las lectinas. Las cuales a su vez tienen afinidad

específica por unirse a carbohidratos, proteínas, lípidos u otras moléculas biológicas. Deben ser selectivos y reactivos, algunos de los más utilizados son: isotiocianato de fluoresceína, rodamina y ficoeritrina (De-Andrade et al., 2007)

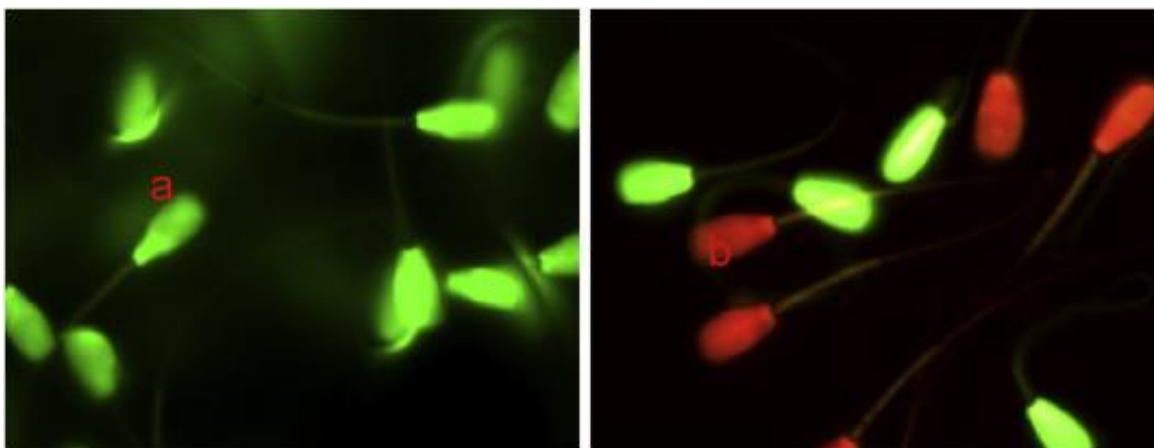


Fig. 9. Espermatozoides bovinos teñidos con Ioduro de Propidio (a-rojo-muertoss) y SYBR 14(b-verde-vivos) tomado de Mokgadi et al., 2016.

2.3.5.7 Lectinas

Las células pueden ser identificadas por las estructuras presentes en su superficie, en particular por los carbohidratos presentes en la MP, localizados generalmente en la periferia de estructuras de origen proteico y lipídico. Por lo mismo, se han utilizado como marcadores específicos de glicoconjugados localizados, tanto en el acrosoma intacto como en la matriz acrosomal (Fig. 10) (Nolan et al., 1992; Way et al., 1995; Hernandez et al., 2005)

Para evaluar la integridad acrosomal las lectinas más utilizadas son rca (Ricinus communis), Con-A (*Concanavalina ensiformis*), pna (*Arachis hypogea*), psa (*Psium sativum*) y MPa (*Maclura pomifera*), lo que indica la presencia de glucosa, manosa, galactosa y D-galactosamina, así como de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico

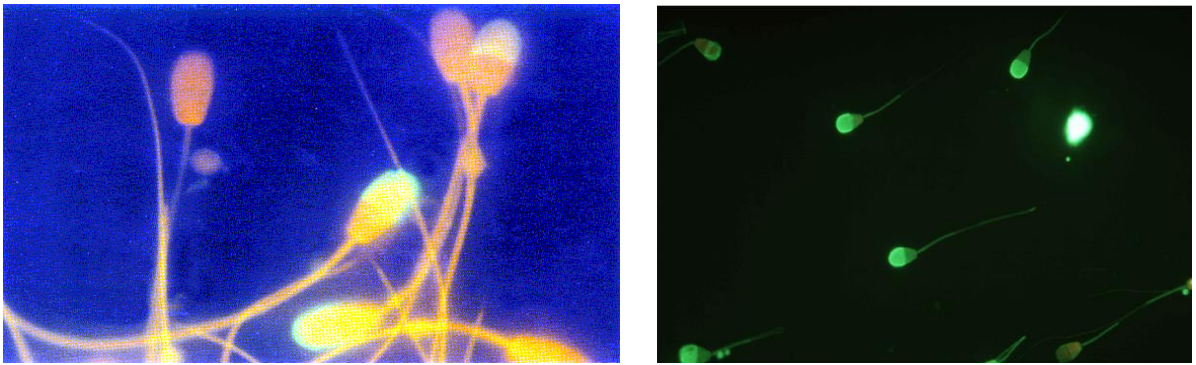


Fig. 10. Izquierda - Espermatozoides caprinos teñidos con una combinación de PI y PSA. El color rojo anaranjado corresponde a la fluorescencia emitida por PI, mientras que el color verde amarillento corresponde al isotiocianato de fluoresceína conjugado a la lectina PSA. Tomado de Cox et al., 1998 Derecha- Espermatozoides vivos con acrosoma intacto después de la tinción con el test EthD/FITC-PSA. Tomado de Samardzija et al., 2006.

2.3.5.8 Evaluación de la morfología espermática

La morfología está estrechamente relacionada con la motilidad espermática en forma directa ya que existe una correlación entre defectos espermáticos e infertilidad (Cortés et al., 2007; Quintero, 2015) En general, el número máximo aceptable de anomalías de cabeza se encuentra entre 15 y 20%. Sin importar el sistema de clasificación se debe esperar un mínimo de 70% de espermatozoides normales en el eyaculado para poder aceptar un semental como apto reproductivamente, en lo que respecta al semen. (Barth y Oko, 1989) Los espermatozoides son traslucidos y tenuemente invisibles al microscopio de luz directa, por ello se requiere el uso de tinciones para facilitar su visualización y correcta apreciación de la estructura. La coloración vital, con eosina, azul de anilina, o eosina-nigrosina, es la más comúnmente usada para la evaluación morfológica.,

Para la evaluación se coloca una gota de aproximadamente 10 µl de semen diluido sobre un portaobjetos limpio y se coloca una gota de colorante, se realiza el frotis en forma firme y pareja. Luego de esperar, por lo menos 5 minutos aproximadamente para dar tiempo al secado, posteriormente se coloca en el microscopio para proceder al conteo de los espermatozoides. Se cuentan 200 espermatozoides por muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides normales, el porcentaje de espermatozoides con anomalías

2.4 Evaluación de semen por computadora (CASA)

El CASA por sus siglas en inglés (Computerized Assisted Sperm Analysis) hace referencia a un sistema automatizado que procesa, analiza y proporciona datos precisos y significativos sobre la cinemática de células individuales y estadística de un conjunto de ellas, es decir promedios. (Amann y Waberski, 2014) Los pioneros de CASA tenían un objetivo claro: la medición automatizada y precisa del movimiento de los espermatozoides individuales en una población, para permitir el cálculo de sus velocidades y la proporción de espermatozoides que exhiben una motilidad progresiva, y así eliminar el sesgo de las "estimaciones" subjetivas por parte de los técnicos (Broekhuijse et al., 2011; Ehlers et al., 2011; Aulesa et al., 2009; Amann y Waberski, 2014) La idea de estos sistemas automatizados tiene origen hacia los años 40's, cuando científicos universitarios reconocen la necesidad de obtener datos libre de sesgos, ya en los 50's se podían tener estimaciones de velocidad de una suspensión, durante los años posteriores se añadieron nuevas tecnologías, luz así como una cámara digital, el primer sistema CASA comercial desarrollado específicamente para la evaluación del movimiento de los espermatozoides fue el sistema CellSoft™ (CRYO Resources Ltd) en la época de los 80's el cual se utilizó para evaluar la calidad de semen en toros, humanos, rata y ratón. El éxito de estos sistemas ha sido en gran medida debido a que permite una evaluación objetiva de diferentes características celulares tales como movimiento, velocidad y morfología (Verstegen et al., 2002) . Por otra parte proporcionan información específicas de la anatomía espermática: pieza intermedia (área y anchura) así como datos referentes a la inserción de la pieza intermedia en la cabeza, como son la distancia y el ángulo de la inserción (Gil et al., 2009)

Existen en el mercado diferentes versiones del sistema SCA dependiendo de la finalidad de la institución que la adquiera: *Humano*: La aplicación más completa para los laboratorios de andrología humana y FIV, bancos de esperma, clínicas de fertilidad, hospitales, etc. *Veterinaria*: Destinado a usuarios que necesitan analizar el esperma de varias especies animales. *Toxicología*: Adaptado exclusivamente al análisis de semen de rata y ratón e *Investigación*: Es el analizador de esperma más

completo y flexible, de hecho es la unión de todas las Ediciones anteriores. Para uso en investigación.

2.4.1 Componentes principales y medidas de salida

A grandes rasgos, los sistemas de evaluación computarizados se componen de un conjunto de hardware (equipo de entrada) y el software (SCA). Inicialmente se requiere de un sistema de captura, por ello, estos equipos están adaptados de un microscopio conectado a una cámara de video (la calidad de la imagen y velocidad de captura dependerá de esta) la cual transmite las imágenes procedentes de la suspensión puesta en la platina del microscopio hacia la tarjeta capturadora en el ordenador (Castellini et al., 2011). El software procesa y analiza la imagen microscópica digitalizada, arrojando información individual de las características de los espermatozoides capturados (Hidalgo et al., 2002). Esta tecnología ha permitido cuantificar de forma precisa y repetible las características morfométricas de los espermatozoides (Davis et al., 1992). Un factor importante a considerar a la hora de la evaluación está relacionado con la microscopía a utilizar, ya que para la mayoría de las especies ganaderas se requiere de una iluminación por contraste de fase negativo. Este detalle es fundamental en aquellas especies con espermatozoides de estructura lateral plana (conejo, cerdo, entre otros), que no resultan adecuadamente visibles con el contraste de fase positivo.

2.4.1.1. Módulo de movilidad y concentración

La motilidad es un parámetro que mide el porcentaje de espermatozoides móviles en la muestra, en este módulo nos permite realizar el análisis en diferentes condiciones de iluminación, aumento y tiempos de captura, con una platina termica que se incorpora y sustituye a la del microscopio convencional. Regularmente las imágenes representan una exposición de ≤ 0.02 segundos a una frecuencia de ≥ 50 cuadros por segundo (Amann y Waberski, 2014). Los parámetros que se obtienen del sistema son los comunes, pero se pueden incorporar otros según el interés del usuario tales como: [VCL], [VAP], [VSL], [ALH], [LIN], [STR] y [BCF] (Fig. 11) (Peña et al., 2005, Love, 2018) La velocidad promediada en el tiempo a lo largo de esta

trayectoria se denomina velocidad curvilínea (VCL; $\mu\text{m/s}$). La ruta promedio se calcula y la velocidad promediada en el tiempo a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad promedio de ruta (VAP; $\mu\text{m/s}$). Se traza un camino en línea recta desde la primera hasta la última posición de una cabeza de espermatozoide, y la velocidad a lo largo de esta trayectoria se denomina velocidad en línea recta (VSL; $\mu\text{m/s}$). Para cada ubicación de centroide hay una desviación de la ruta promedio, y esto se denomina amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH; μm). Del mismo modo, hay puntos donde la ruta curvilínea se cruza con la ruta promedio, y el número de tales intersecciones se denomina frecuencia de latido cruzado (BCF; número por segundo) (Love, 2018, Amann y Waberski, 2014, Amann y katz, 2004)

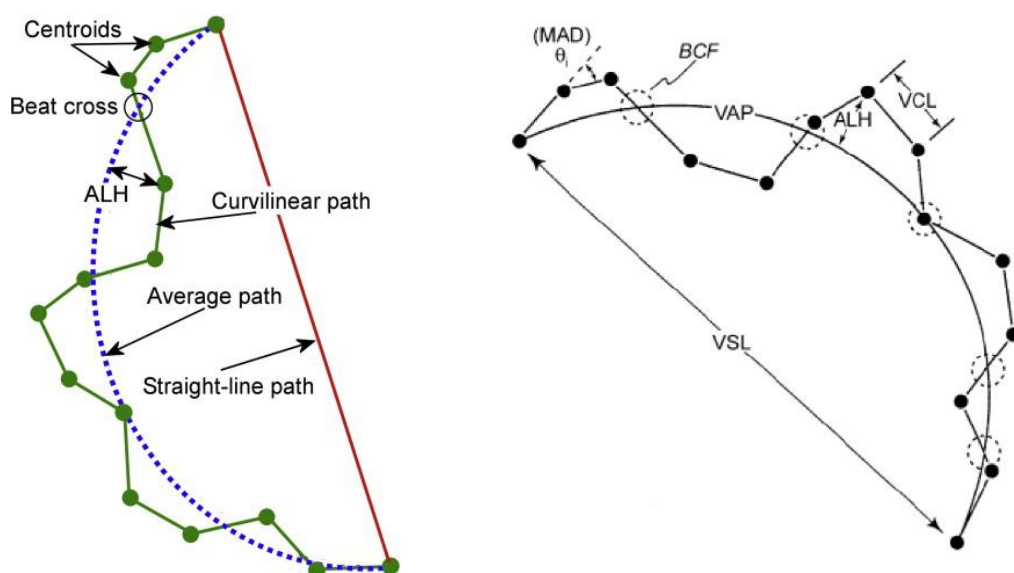


Fig. 11. Representación esquemática de algunos de los patrones de motilidad medidos por el sistema CASA. Amann y Waberski, 2014: Rurangwa et al, (2004)

2.4.1.2 Módulo de morfología

Otro de los módulos de importancia en el análisis espermático es el de morfometría, también disponible en el sistema CASA, siendo esta otra prueba determinante de la calidad del eyaculado (Hidalgo et al., 2006); nos permite detectar alteraciones que pueden ocurrir durante la espermiogénesis y en la maduración epididimaria, resultando útil a la hora de eliminar seminales con reducida calidad seminal. Esto último es particularmente importante, por cuanto el porcentaje de morfo anomalías

presentes en un eyaculado ha demostrado ser un importante indicador del descenso de la fertilidad en diversas especies animales (Chandler et al., 1988).

Al igual que en la valoración subjetiva de la motilidad, la correlación (r) de los resultados obtenidos en la valoración morfológica del semen con la fertilidad, varía ampliamente en función del estudio considerado, reportándose valores de r entre 0,06 a 0,86 (Rodríguez, 2004). Al igual que en la valoración convencional (subjetiva) la morfología en el sistema computarizado requiere de la fijación y tinción de las células, pues de esto depende la correcta valoración así como diferenciación de las partes anatómicas del espermatozoide (acrosoma, cabeza y pieza intermedia). Una de las tinciones más utilizadas para la evaluación de la morfología es “sperm-Blue” de Microptic. España (Fig. 12)

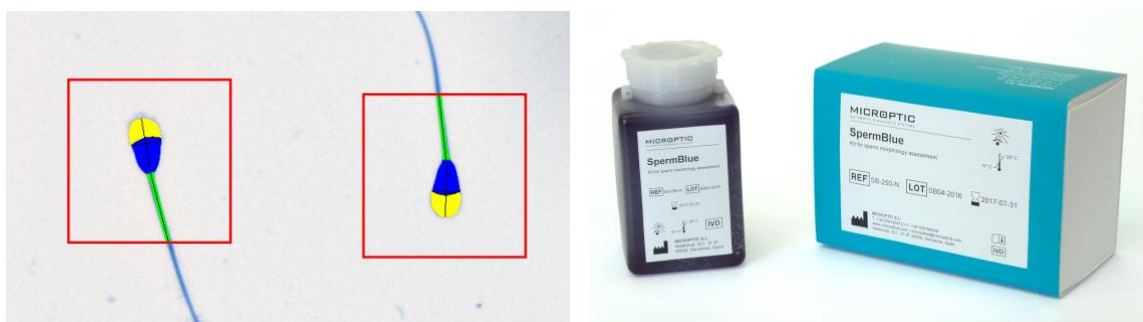


Fig. 12. Izquierda- Espermatozoides teñidos en la cual se muestran las estructuras cabeza (acrosoma) y cola. Derecha- Tincion sperm.Blue utilizada para la morfometria espermatica.SCA- Microptic. España

Con el análisis de la cola, es posible reconocer las gotas citoplasmáticas como ensanchamientos de la pieza intermedia, lo que podría introducir un factor de variación importante y sobreestimar el resultado. Al igual que en la motilidad, la morfología en los programas objetivos miden la longitud de la cabeza [L], el ancho [W], el área (número total de píxeles) [A] y el perímetro [P] (Amann y Katz, 2004; Martí et al., 2012), lo que permite calcular parámetros de forma como la elipticidad $[[L] / [W]]$, la elongación $[(L - W) / (L + W)]$, la rugosidad () y la regularidad ($[W/4]$) para cada cabeza de espermatozoide (Maree et al., 2010)

2.4.1.3 Módulo de Vitalidad (Viabilidad)

El análisis de la vitalidad en este sistema, se basa en el uso de tinciones fluorescentes, mediante la determinación de la proporción de espermatozoides con

integridad o no de la membrana, identificando así célula viva y muerta de acuerdo a la permeabilidad de su membrana. (Shannon y Vishwanath, 1995; Den-Daas et al., 1998)

El módulo de análisis de fluorescencia está contrastado en la actualidad para la valoración del estado de la membrana de la cabeza espermática y para pruebas de vitalidad (Fig. 13) Por otro lado, este módulo permite el estudio de otros análisis de tinciones fluorescentes como los relacionados al estado de las mitocondrias de la pieza intermedia.

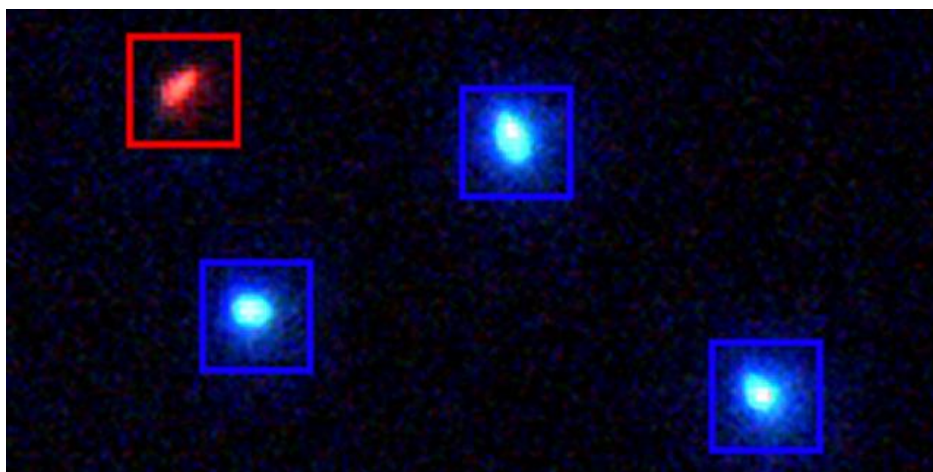


Fig. 13. Espermatozoides teñidos con el kit comercial FluoVit. Azules vivos, Rojos muertos. SCA-Microptic. España

2.4.1.4 Módulo de Fragmentación ADN

Fragmentación de ADN es un módulo para el conteo automático de los espermatozoides con ADN fragmentado y no fragmentado, en muestras tratadas con kits que se basan en el método de Dispersión de la Cromatina (SCD). La fragmentación de ADN está relacionada con la apoptosis, y normalmente se asocia a cambios estructurales en la morfología celular, aun cuando existe daño a nivel de material genético, el espermatozoide mantiene la capacidad de fecundar al ovocito, sin embargo el embrión resultante sufrirá un proceso de apoptosis durante su desarrollo mitótico (dos a cuatro células) (Fatehi et al., 2006).

Al igual que en los módulos anteriores, se toman capturas para identificar aquellas células con daño en el material genético, las capturas muestran la producción de un halo periférico de dispersión del material genético (Fig. 14) (identificado mediante la tinción de Wright o fluorescente) (García et al., 2006).

El estudio de la fragmentación del material genético es, un parámetro independiente en el estudio de la calidad seminal y un potencial instrumento de predicción de la fertilidad en los centros de inseminación artificial (Evenson, 2002).

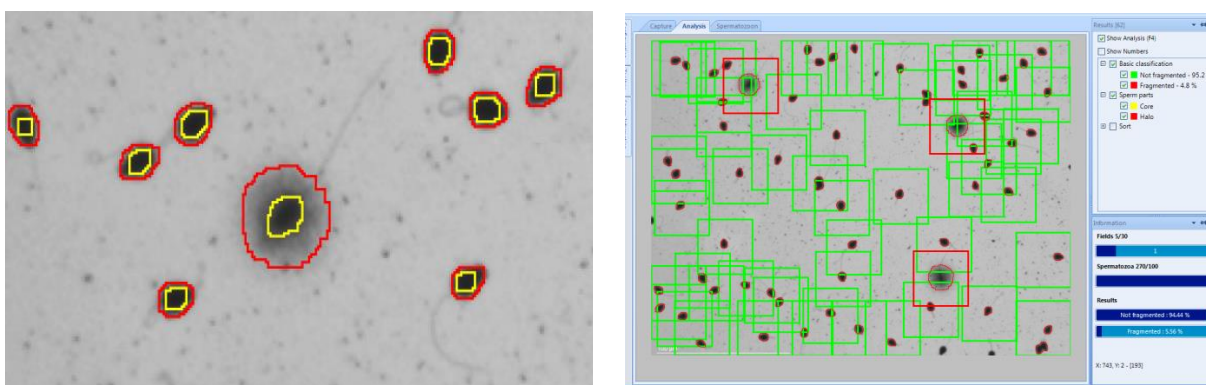


Fig. 14. Células espermáticas analizadas con el módulo de fragmentación de ADN. Aquellas con el material genético intacto no presentan halo. SCA-Microptic. España

2.5 Conservación de semen porcino

Es ampliamente conocido el auge que tienen las Biotecnologías Reproductivas (BR) dentro de la reproducción animal, pero viéndolo de manera aguda, de todas las biotecnologías con posibilidad de aplicación a la reproducción animal asistida, la inseminación artificial (IA) es la que más impacto ha tenido sobre la producción, ya que tras el paso de los años desde su primera aplicación, su uso ha contribuido en gran medida más que ninguna otra en todas las explotaciones pecuarias a nivel mundial (Thibier y Guerin, 2000). Por otra parte la IA no puede solo existir sin la sinergia con otras BR, es decir, para la IA es vital la utilización de semen ya sea fresco, refrigerado o congelado. La conservación de semen de diversas especies representa actualmente uno de los campos de investigación de gran impacto e importancia reproductiva, debido a que se busca facilitar las posibilidades de

reproducción de muchos individuos además de salvaguardar para la posteridad las características genéticas deseables de especímenes con excelentes aptitudes seminales.

El proceso de refrigeración forma parte del proceso de congelación seminal; sin embargo, la refrigeración es también un método de conservación a corto plazo en el cual es necesario agregar medios diluyentes adecuados con características químicas específicas que mantengan viable la dosis conservada, estas características son brindadas por: solución tampón, sales, carbohidratos y sustancias que aporten protección de membrana a causa del descenso de temperatura como la yema de huevo.

La criopreservación a diferencia de la refrigeración agrega al medio de dilución un crioprotector el cual permite ampliar el rango de resistencia para el descenso de temperatura. Los crioprotectores utilizados en la congelación pueden ser clasificados en dos categorías de acuerdo a su mecanismo y lugar de acción. Es decir, existen aquellos que por su bajo peso molecular son permeables y aquellos que ejercen acción a nivel de membrana al exterior celular. Desde el descubrimiento del glicerol como crioprotector, este ha sido el más utilizado debido a su efectividad y su baja toxicidad comparado con el dimetilsulfoxido (DMSO) Etilenglicol, propanediol (Holt, 2000).

El semen de muchas especies se congela actualmente para su uso efectivo en la inseminación artificial, sin embargo la utilización de semen congelado ha mostrado resultados aceptables en la especie bovina, pero en algunas otras debido a que no proporcionan resultados aceptables de fertilidad y por diferencias fisiológicas y bioquímicas del espermatozoide así como la anatomía y fisiología del aparato reproductor de la hembra los protocolos de congelación son poco utilizados, usando la dilución y refrigeración como mejor alternativa para la I.A. en el caso de los cerdos.

2.5.1 Refrigeración

La refrigeración es un método de conservación en la cual las unidades celulares son conservadas a temperaturas superiores al punto de congelación, en la industria porcina, la inseminación artificial (IA) de las cerdas generalmente se realiza utilizando dosis seminales prolongadas almacenadas a 15 ° C a 17 ° C durante al menos 24 horas (Pinart et al., 2015) este proceso el semen es diluido en medios de conservación clasificados como de larga y corta duración (Gadea et al., 2004)

Sin embargo, independientemente del tipo de extensor utilizado, la mayoría de las inseminaciones se realizan dentro de los 3 días posteriores a la recolección porque se sabe que el tamaño de la camada disminuye cuando el semen utilizado se ha almacenado durante más de 4 días. Sin embargo, los extensores a largo y extra largo plazo se usan ampliamente para el almacenamiento a corto plazo porque es ampliamente aceptado que son más eficientes para preservar la calidad y fertilidad de los espermatozoides (Johnson et al., 2000; Waterhouse et al., 204)

En este proceso a pesar de ser menos lesivo también provoca daños bioquímicos relevantes que perjudican la integridad y el nivel de fertilidad espermática, los principales daños celulares inducidos por la refrigeración incluyen alteraciones morfológicas como ruptura de la membrana plasmática, degeneración acrosomal y lesiones en las mitocondrias (De-Leeuw et al., 1990).

En el cerdo, los daños en la membrana plasmática del espermatozoide asociados a la crioconservación están atribuidos a la refrigeración de las células hasta 5 °C, más que a los procesos de congelación-descongelación (Maxwell y Johnson, 1997), la cual provoca disminución de la actividad aerobia del espermatozoide, así como la glucólisis, provocando una reducción en los niveles de ATP y por ello, la pérdida de la motilidad.

La refrigeración provoca daños de la membrana plasmática que normalmente se producen durante la capacitación, fenómeno también observado a nivel de la reactividad y de la fluidez de la membrana y en las concentraciones celulares de iones (Green y Watson, 2001; Yeste et al., 2008). Además, el aumento de Ca^{2+} intracelular durante la refrigeración contribuye a las alteraciones de capacitación y al fenómeno de fusión entre las membranas plasmática y acrosomal externa

(Watson, 2000). Por otra parte, podrían sufrir la reacción acrosómica precoz y serían incapaces de fecundar el ovocito

2.5.2 Congelación

Si bien la criopreservación de espermatozoides es la mejor tecnología para preservar las muestras de diferentes animales domésticos durante períodos prolongados, tan solo el 1% de todas las inseminaciones artificiales (IA) realizadas en todo el mundo se realizan con espermatozoides congelados en el área porcina (Rodríguez y Estrada 2013; Knox et al., 2015; Michiko et al., 2015) la práctica no es común debido a la aparición de extensores de larga duración para semen fresco y refrigerado, considerando también que la congelación es una práctica en granjas que poseen sementales de alto valor genético además de que los espermatozoides porcinos son especialmente sensibles al frío, cuando se someten a temperaturas por debajo de 15 °C ocurriendo daños en membrana plasmática y acrosómica que determinan alteraciones posteriores de la célula, deterioro del citoesqueleto, fragmentación del ADN, incremento la oxidación celular debido a que poseen una gran cantidad de ácidos grasos insaturados (Gloria et al., 2019) y se producen pérdidas de enzimas, todas estas alteraciones provocan daños irreversibles en la viabilidad y funcionalidad de la célula espermática

Las primeras congelaciones de espermatozoides porcinos se realizaron en la década de los 50, en la cual se destaca la mala calidad del semen post-descongelación, hasta el punto de no conseguir partos en cerdas inseminadas esto debido a que los estos espermatozoides son vulnerables a la congelacion, lo que ha motivado la búsqueda para desarrollar métodos para seleccionar espermatozoides funcionales (Yeste, 2015).

Hess (1957) reportó los primeros lechones nacidos vivos tras la I.A con espermatozoides descongelados., sin embargo, esta tecnología se desarrolló realmente en el siglo XX, cuando se utilizó el glicerol como agente crioprotector para

los espermatozoides de los mamíferos y otras células y tejidos somáticos (Grossfeld et al., 2008)

Los 70's representaron un avance enorme para la congelación de espermatozoides de cerdos bajo la estandarización de dos métodos de congelación: el método estadounidense o Beltsville diseñado por Pursel y Johnson (1975) y el método alemán o Hülseberger establecido por Westendorf et al (1975) ambas técnicas utilizaban hielo carbonico y vapores de nitrógeno líquido. Con el establecimiento de estos métodos de congelación, las investigaciones recientes sobre congelación de semen de cerdo se han enfocado en la optimización las técnicas haciendo modificación en extensores e identificación de marcadores de congelación en las membranas celulares, esto debido a que no todos los eyaculados presentan la misma capacidad para resistir el descenso térmico durante la congelación pero se ha informado que existen diferencias de congelación, es decir., la capacidad de las células para resistir los procedimientos criogénicos y esta variación varía entre razas, e incluso entre las fracciones del eyaculado. Por esta razón la clasificación de los sementales y sus eyaculados se pueden estar dentro de los buenos o malos congeladores (Park y yi, 2002; Barranco et al., 2013)

En los procedimientos actuales, el glicerol es el crioprotector penetrante que se usa con más frecuencia para la congelación de semen en diferentes especies incluido el cerdo (Baren et al., 2004; Li et al., 2006) debido a su capacidad de reducir el daño durante las fases de congelación – descongelación, sin embargo a pesar de su efecto positivo en la disminución del daño térmico, está documentado que posee cierto nivel de toxicidad dependiendo de la concentración utilizada la cual varia en especies de 3 a 7%. (Almenar et al., 2007; Medeiros et al., 2002).

El conjunto de daños durante la criopreservacion parece ser el resultado de varios factores, incluida la generación de ROS, el desequilibrio osmótico y la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelación y descongelación (Watson, 2000; Benson et al., 2012)

Por otra parte, los principales retos en el uso de semen de cerdo congelado-descongelado incluyen un menor número de espermatozoides móviles disponibles

para la I.A, la reducida vida útil después de descongelar y la baja fertilidad de los mismos en comparación con el semen fresco o refrigerado (Holt et al., 2005; Roca et al., 2011).

2.5.3 Lesiones estructurales

Para la célula espermática, lo perjudicial no involucra la presencia de hielo extracelular sino la intracelular, por el motivo de que estas estructuras provocan lesión de la membrana alterando su selectividad y permeabilidad y en consecuencia la muerte celular (Morris et al., 2012; Yeste, 2016). Dado que la formación de hielo intracelular es dependiente del ritmo de congelación y descongelación, el estricto control del ritmo del descenso y del aumento de la temperatura puede minimizar las lesiones celulares causadas por el hielo interno (Holt et al., 2005) En concreto, para lograr una longevidad máxima, debe existir una correcta armonía entre la congelación y descongelación por el hecho de que son etapas críticas para la supervivencia celular.

En los muestras seminales de cerdos, el daño extenso de la membrana plasmática de los espermatozoides durante el enfriamiento y la descongelación se ha atribuido al bajo contenido de colesterol y fosfolípidos saturados, en comparación con otras especies (Bailey et al., 2008) Esta composición bioquímica específica de la especie da como resultado una disminución de la viabilidad de los espermatozoides después de la descongelación y también una vida útil más corta de los espermatozoides sobrevivientes al descongelar las dosis (Casas et al., 2010)

Las lesiones causadas en la membrana y en los distintos orgánulos del espermatozoide derivan de dos de los principales motivos de estrés de la criopreservación (las alteraciones de la temperatura y la formación y disolución de los cristales de hielo) (Morris et al., 2012; Yeste, 2016; Hezavehei et al., 2018) también están implicadas alteraciones osmóticas, que conducen a daños celulares evidentes (Holt, 2000). En consecuencia, la motilidad y la integridad acrosómica disminuyen de modo significativo.

Johnson et al (2000) define que las principales situaciones de estrés para las membranas en los procesos de congelación y descongelación son de tipo térmico, mecánico, químico y osmótico; incluyendo

- La adición del crioprotector antes de la congelación
- Las alteraciones del volumen de la célula
- Las contracciones y expansiones de la membrana, en respuesta a las soluciones hiperosmóticas crioprotectoras
- La deshidratación derivada de la congelación
- Las fases de transición de los fosfolípidos de membrana, así como los efectos de la elevada concentración de solutos y la formación intra-celular de hielo

En consecuencia, los daños en la membrana del espermatozoide incluyen alteraciones en su organización, fluidez, permeabilidad y en su composición lipídica. Además de estos cambios se produce la pérdida de algunas proteínas de la membrana durante estos procesos de congelación y descongelación (Cerolini et al., 2001; Daianny et al., 2017).

Otro elemento estructural que sufre lesiones durante la congelación-descongelación es la membrana acrosómica, los daños se manifiestan por la vesiculación conocida como R.A falsa, la cual consiste en la pérdida del acrosoma debido a la desintegración de la MP y acrosoma, a diferencia de la R.A verdadera o fisiológica, estos espermatozoides no representan una población con posibilidades de fertilizar al ovocito.

Además del acrosoma, el espermatozoide congelado-descongelado presenta un estado semejante a la capacitación que contribuye a su reducida longevidad y su rapidez en penetrar los ovocitos sin incubación. Una vez capacitado, el espermatozoide exhibe una tasa metabólica elevada, hipermotilidad aumento de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana y si no llega a alcanzar la fecundación, sufre reacción acrosómica espontánea debido al influjo descontrolado de Ca^{2+} (Curry, 2000).

Por otra parte, varios estudios demuestran que el ciclo de criopreservación aumenta la peroxidación de lípidos presentes en la membrana plasmática originando especies de oxígeno reactivo (ROS) y con ello la reducción de contenido en fosfolípidos insaturados (Ortega et al., 2008). Cuando los niveles de ROS son moderados participan en diversas funciones fisiológicas como la hiperactivación, la capacitación y reacción acrosómica (Bucak et al., 2007; Zhang et al., 2012) sin embargo., cuando la producción se desestabiliza y los antioxidantes endógenos no pueden transformarlos en productos seguros, su acumulación provoca estrés oxidativo dañando las membranas y el material genético (Baumber et al., 2003; Ford, 2004)

El contenido elevado en ácidos grasos insaturados de los fosfolípidos hace al espermatozoide más susceptible a las lesiones de peroxidación, que además de afectar a la motilidad, también afectan al metabolismo, la estructura y la fertilidad. Durante la preparación del semen para la congelación se puede reducir la peroxidación procediendo bajo condiciones anaeróbicas, o adicionando antioxidantes o agentes quelantes (Holt, 2000).

2.5.4 Mecanismos de acción del Complejo Ciclodextrina-Colesterol

Tras la obtención de las muestras seminales, el primer paso a seguir es la dilución en un medio óptimo para la supervivencia de las células durante su procesamiento y conservación, por ello es importante saber elegir el diluyente así como ritmos adecuados de refrigeración, congelación y descongelación, pues estos factores tienen alta influencia en la morfología y motilidad de los espermatozoides y estas variables de calidad, a su vez, influyen los índices de concepción tras la I.A. En esencia, los diluyentes deberán mantener la osmolaridad, el pH y la concentración adecuada de iones del eyaculado. Es fundamental que el diluyente aporte una fuente de energía y proteja a los espermatozoides de los daños causados por la congelación y la descongelación (Province et al., 1984; Bouchard et al., 1990).

A pesar del correcto uso de los diluyentes así como crioprotectores específicos, las diferencias entre las especies en la sensibilidad de los espermatozoides al daño por

choque frío se deben principalmente a la composición de fosfolípidos, así como a la relación colesterol de membrana: fosfolípido (C: P) detallando que una ratio superior a 0.5 confiere una mayor resistencia al choque térmico (Cerolini et al., 2006; Holt, 2000; Parks y Lynch, 1992) debido a que la susceptibilidad de la membrana plasmática a sufrir transiciones durante el enfriamiento, esta inversamente relacionado con la proporción de colesterol (Drobniz et al., 1993; Longobardi et al., 2017) el cual desempeña múltiples funciones como, regular la función de la membrana afectando la fluidez de la misma y la permeabilidad. También reduce la temperatura de transición de fase de la membrana, manteniéndola en un estado fluido, reduciendo así los daños que pueden ocurrir a bajas temperaturas (Travis y Kopf, 2002)

Los oligosacáridos cíclicos tales como las ciclodextrinas tienen un componente externo hidrófilo y un núcleo interno hidrófobo (Christian et al., 1997) por esta característica bioquímica, estas poliglucosas cuando se agregan solas a la suspensión espermática inducen la eliminación del colesterol de la membrana, sin embargo cuando se adicionan como complejo CDC-c estimulan la inserción del colesterol debido a la presencia de un núcleo hidrófobo interno y la alta afinidad por los esteroides (Navratil et al., 2003) Existen actualmente estudios en los cuales se ha evidenciado la eficiencia en la utilización del complejo Ciclodextrina-Colesterol, teniendo mejoras en la criosupervivencia en esperma de varias especies animales: toros (Purdy y Graham, 2004; Yadav et al., 2017) búfalos (Rajoriya et al., 2016; Lone et al., 2016) sementales (Combes et al., 2000; Moore et al., 2005) burros (Alvarez et al., 2006) verracos (Galantino et al., 2006) y carneros (Moce et al., 2010) El tratamiento de espermatozoides con ciclodextrina adicionada con colesterol ha demostrado ser beneficioso con espermatozoides de varias especies, especialmente aquellas especies con esperma que son sensibles al choque frío.

El colesterol exógeno incorporado en la membrana espermática tiene un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la membrana y en la reducción de la permeabilidad al agua a temperaturas relativamente menores, regulando así la transferencia de agua a través de las membranas. Todavía no se conoce el

mecanismo relacionado con la forma en que se incorpora el colesterol en la membrana del espermatozoide; sin embargo, se ha postulado que debido a la mayor afinidad de las ciclodextrinas por unirse a la membrana plasmática de los espermatozoides, el colesterol puede eliminarse de la membrana plasmática (Lopez et al., 2011, Lopez et al., 2013).

El acoplamiento de las ciclodextrinas al colesterol lo hace soluble en soluciones acuosas. La ciclodextrina cargada de colesterol después de interactuar con la membrana celular facilita la transferencia de colesterol a la membrana. La absorción de colesterol refuerza la membrana de los espermatozoides, lo que limita la transferencia de agua a través de la membrana durante las alteraciones osmóticas y de temperatura, y, por lo tanto, mejora la supervivencia criogénica de los espermatozoides (Salmon et al., 2017).

3. METODOLOGIA

3.1 Área de estudio

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio Acuático-Pecuario en las instalaciones del Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El CNRG se encuentra ubicado en la Región Altos Sur del estado de Jalisco en el Municipio de Tepatitlán de Morelos, con la siguiente ubicación geográfica: Latitud: 20° 54' 50" y los 21° 01' 30", Longitud: 102° 33' 10" a los 102° 56' 15", Altitud: 1,780 msnm. El trabajo consistió en dos etapas de estudio, una de campo con la colaboración de la empresa con nombre "Posta el Cuatro" y la fase experimental en las instalaciones de CNRG-INIFAP, ambas instalaciones se encuentran en el municipio descrito (INEGI, 2016).



De manera semanal se colectaron a tres sementales (reproductivamente sanos) diferentes en un periodo de cuatro meses hasta completar 12 repeticiones por tratamiento. La colección se realizaba en las mañanas de todos los martes entre 10:00 am y 13:00 pm a cargo de trabajadores del centro de inseminación de la granja *Posta el Cuatro* mediante la técnica de la mano enguantada, utilizando solo la fracción rica en espermatozoides (fracción espermática). Las dosis fueron diluidas y almacenadas durante un promedio de 7 h hasta su entrega para el correspondiente análisis en el laboratorio acuático pecuario del CNRG.

Debido a que los sementales rotaban cada semana, se realizó un pool para eliminar el efecto macho. De la cantidad de semen colectado solo se tomaron 2 ml de semen puro sin diluir de cada semental, el cual fue diluido en 8 ml de MRA y Vitasem respectivamente, teniendo así una dilución inicial 1 a 5 dando una cantidad de 10 ml por tubo (tabla 3)

Tabla 3. Distribución de las muestras con respecto al semental y diluyente utilizado

SEMENTALES	Diluyentes	
	MRA	Vitasem
SEMENTAL A	Tubo A1 8 ml	Tubo A2 8 ml
SEMENTAL B	Tubo B1 8 ml	Tubo B2 8 ml
SEMENTAL C	Tubo C1 8 ml	Tubo C2 8 ml

Las muestras diluidas en los respectivos tubos eran entregadas en hieleras de unicel de 32x25x19 con refrigerantes forrados con papel dextrasa, manteniendo así una temperatura interior entre 14 y 15 °C.

3.5 Dilución del semen

Para la dilución de las muestras se utilizaron dos diluyentes comerciales MRA®, Kubus S.A y Vitasem® Megapor (39.5 g y 42 g para 1 litro de diluyente) La adición de ciclodextrina fue mediante una dilución previa del complejo en 1 ml de diluyente. Es decir, la cantidad en mg que se calculó en base a la concentración de la muestra,

el complejo CDC-c fue diluido y mezclado en 1 ml de MRA o Vitasem respectivamente para facilitar su incorporación a cada tratamiento.

3.6 Evaluación del semen y adición del complejo CDC-c

Una vez arribadas las muestras en el laboratorio fueron evaluadas la motilidad y concentración utilizando el Computer Assisted Semen Analysis (CASA, versión 5.4 Microptic, España) tomando 10 µl de muestra y llevándolo al microscopio, usando un cubre y portaobjetos previamente atemperados. Una vez determinada la concentración se procedió a calcular la cantidad en mg del complejo Ciclodextrina-Colesterol. Considerando el hecho que la cantidad del complejo CDC-c a utilizar equivale a 1.2 mg por cada 120×10^6 (Lee, 2015) de espermatozoides, la cantidad a adicionar en mg del complejo CDC-c dependerá del, conteo inicial de la concentración, multiplicado por 10 ml, dividido entre 120×10^6 y multiplicado por 1.2.

$$Total\ de\ CDC - c\ en\ mg = \left(\frac{concentracion * 10\ ml}{120 \times 10^6} \right) \times 1.2$$

Ejemplo			
Conteo (concentración)	130 millones/ml		mg
Cantidad en ml	10 ml total		13 totales
Razón de 1.2 mg /Millones de espermatozoides	120 Mill/1.2 mg		

$$Total\ de\ mg\ a\ agregar = \left(\frac{130\ millones * 10\ ml}{120 \times 10^6} \right) \times 1.2 = 13\ mg$$

La motilidad mínima permisible para que las muestras fueran procesadas fue de un 70% (Barth & Oko, 1989). Pasados los análisis respectivos, se procedió a realizar el pool, todos los tubos con el mismo diluyente pasaron a un tubo falcón de mayor tamaño (50 ml) después, se procedió a separarlos de acuerdo al diseño experimental (4 tratamientos, tubos de 10 ml) posteriormente, las muestras se sometieron a 15° C por un periodo de 1 hora como tiempo de equilibrio, trascurrido este lapso, fueron llevadas al refrigerador a 5° C.

3.7 Preparación del complejo Ciclodextrina-Colesterol

La preparación de la ciclodextrina se realizó como la describe Purdy y Graham (2004) en donde el colesterol (200 mg) fue disuelto en 1 ml de cloroformo (solución **A**). Posteriormente en un tubo separado se disolvió 1g de 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrina en 2 ml de metanol (Solución **B**). Teniendo ambas diluciones se añadió una alícuota de 0.45 ml de solución **A** a la solución **B**, el resultado de ambas mezclas se agito hasta lograr una apariencia clara. Después la mezcla se vertió en una placa de Petri, en la cual fue sometido a vapor de nitrógeno para acelerar el secado, una vez logrado lo anterior los cristales resultantes se retiraron de la placa y almacenados en un recipiente de vidrio a 22 °C hasta su utilización.

3.8 Evaluación de la motilidad pos-dilución

Una vez conformados los tratamientos y evaluados la motilidad inicial de las muestras, se sometieron a 5°C. A partir de ese punto, cada uno de los tratamientos fue evaluado a las 12, 36 y 60 horas pos-dilución. Se tomaron 100 µl de cada tratamiento en tubos Eppendorf de 0.5 se atemperaba a 37°C y procedía a tomar lectura colocando 8 µl en un portaobjeto previamente atemperado, usando un microscopio (NIKON Eclipse E200 LED) conectado al sistema computarizado CASA con el objetivo 10X. Una vez obtenida la imagen se tomaban tres capturas para evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles en la muestra clasificándolos como A) Rápidos (rojo), B) Medios (Verde) , C) Lentos (Azul) y D) Inmóviles (Amarillo). Al final cada captura se realizaba una limpieza de campos capturados, es decir verificar la correcta clasificación de acuerdo a la cinética del espermatozoide, obteniendo así un informe que arrojaba la motilidad total y progresiva en porcentaje de 0 a 100%. Las muestras se diluyeron 1-5 en PBS para facilitar la lectura y limpieza de cada campo capturado.

3.9 Análisis de viabilidad espermática

Para la evaluación del porcentaje de espermatozoides vivos, se utilizó una combinación de dos tinciones fluorescentes (Rowlan, 2003; Kumar, 2017) Hoechst

33258 - Ioduro de propidio (Sigma-Aldrich) ambas preparadas dentro del laboratorio Acuático-Pecuario del CNRG (con excitación a 483 y 570 nm respectivamente). Para la evaluación se tomaron 10 µl de cada tratamiento en tubos Eppendorf de 0.5, se adiciono a esta muestra 1 µl de Hoechst 33258, a los 5 minutos se adiciono la misma cantidad de 1 µl de ioduro de propidio, 5 minutos después se procedió a tomar lectura de determinar el porcentaje de vitalidad, haciendo uso del equipo fluorescente conectado al sistema CASA. En cada periodo de evaluación se tomaron 2 ml de cada tratamiento en 4 tubos Eppendorf, se rotularon para distinguirlos y se colocaron sobre la platina térmica a 37° C.

3.10 Funcionalidad de Membrana (HOST)

Para determinar la funcionalidad de la membrana plasmática, se llevó a cabo una prueba de resistencia osmótica HOST (Hipoosmotic Swelling Test) incubando a los espermatozoides durante 30 minutos a 37 °C en una solución hipo-osmótica (100 mosmol/l constituido por 100 ml de agua destilada, 900 mg fructosa y 490 mg citrato de sodio) en donde se determinó la capacidad de captar líquido en un medio con alta proporción de agua y una baja concentración de solutos. Para esto, 25 µl de semen fue incubado en 200 µl de medio host, durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo 8 µl se tomaron del Eppendorf y se procedió a tomar lectura en un microscopio de contraste con objetivo (40x) donde aquellos con membrana citoplasmática intacta mostraron una deformación en flagelo por efecto de la captación de agua.

3.11 Análisis estadístico

Los datos de las variables dependientes (motilidad (Total y progresiva), viabilidad y funcionalidad de membrana) se sometieron a un análisis de varianza, para un diseño completamente al azar en parcelas divididas, previo al análisis los datos expresados como proporciones fueron transformados a su arco-seno para ser analizados usando el paquete estadístico (SAS) posteriormente fueron retransformados en proporciones para ser mostrados en las tablas. Cuando el ANOVA fue significativo, se seleccionó la prueba Duncan con un nivel de confianza

de 0.05 para la comparación promedio. Todos los datos se presentan como medias $\pm$ DE. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativas.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Los efectos de la suplementación con CDC-c al extensor de larga duración sobre los parámetros de calidad del semen porcino, se resumen en las Tablas 4, 5, 6 y 7. En general la respuesta a los diferentes tratamientos MRA, MRA+CDC-c, VitaseM y VitaseM+CDC-c se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en la motilidad Total (MT) y motilidad progresiva (MP), viabilidad y funcionalidad de membrana. Se muestran promedio y desviación estándar de cada parámetro a las 12, 36 y 60 h pos-dilución.

4.1 Motilidad

Los parámetros de motilidad total de los espermatozoides evaluados con el sistema CASA se muestran en la tabla 4 y motilidad progresiva en la tabla 5. El porcentaje de motilidad total y motilidad progresiva fue mayor ($P < 0.05$) a las 12, 36 y 60 h post-dilución con la adición de complejo CDC-c; sin embargo, cuando se adiciono al diluyente VITASEM (VITASEM+CDC-c), el porcentaje de motilidad fue superior, respecto a los demás tratamientos.

Tabla 4. Motilidad Total (MT) de semen porcino tratado con CDC-c

	12h	36h	60h
MRA	50 $\pm$ 16 ^a	25 $\pm$ 13 ^a	12 $\pm$ 8 ^a
MRA+CDC-c	63 $\pm$ 16 ^{bc}	44 $\pm$ 20 ^b	29 $\pm$ 13 ^b
VITASEM	56 $\pm$ 16 ^{ab}	34 $\pm$ 19 ^b	20 $\pm$ 18 ^{bc}
VITASEM +CDC-c	77 $\pm$ 10 ^d	57 $\pm$ 17 ^c	41 $\pm$ 20 ^d

MRA (semen diluido con mra sin cdc-c); **MRA+CDC-c** (semen diluido con mra y el complejo ciclodextrina-colesterol); **VITASEM** (semen diluido con vitasem sin cdc-c); **VITASEM+CDC-c** (semen diluido con vitasem y el complejo ciclodextrina-colesterol). Literales diferentes indican diferencia significativa

El presente estudio mostró que hay una pérdida aparente en la calidad de los espermatozoides durante el almacenamiento a 5 °C cuando no se adiciona el complejo CDC-c como lo demuestran los atributos de motilidad total y progresiva.

Durante el descenso térmico, los espermatozoides tienden a sufrir daños estructurales (membrana plasmática) así como disminución de la actividad aerobia del espermatozoide en consecuencia disminución de la producción de energía y con ello, la pérdida de la motilidad (Li et al, 2018) estudios confirman que la proporción de colesterol en la membrana ayuda a reducir los daños térmicos aumentando el porcentaje de espermatozoides móviles después de la conservación (Spizziri et al., 2010; Murphy et al., 2014; Moraes et al., 2015)

Diversos autores han demostrado la efectividad de la adición de colesterol a la membrana de espermatozoides en diversos animales de interés zootécnico, aunque la mayoría de los estudios se enfocan en la congelación de estas células, no queda aislado el efecto favorable del complejo. Estudios realizados por Wojtusik et al. (2018) demostraron que la adición del complejo CDC-c durante la congelación de espermatozoides de gacela, reduce de manera considerable la pérdida la pérdida de proteínas que se relacionan con el metabolismo espermático y por ende la motilidad observada fue mayor.

Por otro lado, Partyka et al. (2018) reportaron resultados similares al trabajar con 1 y 1.2 mg de CDC-c en la conservación de espermatozoides de pollos, mejorando el porcentaje final de motilidad espermática (28%) en comparación con el control donde se observó 18%. Adicionalmente, Salmon et al. (2017) compararon la efectividad del complejo contra un extensor basado en yema de huevo, obteniendo mejores proporciones de motilidad (58.8%) y acrosomas íntegros (83%) en comparación con un extensor basado en yema de huevo donde se observó el 33% y 52.2%, respectivamente. De igual manera Mocé et al. (2010) en sus estudios sobre el efecto del colesterol sobre la supervivencia del semen de sementales ovinos reportaron motilidad superior (62%) en los espermatozoides tratados con CDC-c antes de la congelación en comparación con el control (Sin CDC-c) 43%.

Tabla 5. Motilidad Progresiva (MP) de semen porcino tratado con CDC-c

	12h	36h	60h
MRA	36 ± 19 ^a	14 ± 10 ^a	5 ± 4 ^a
MRA+CDC-c	52 ± 17 ^{bc}	34 ± 19 ^b	23 ± 15 ^{bc}
VITASEM	42 ± 21 ^{ab}	22 ± 20 ^{ab}	12 ± 15 ^b
VITASEM +CDC-c	67 ± 18 ^d	46 ± 20 ^c	30 ± 20 ^d

MRA (semen diluido con mra sin cdc-c); **MRA+CDC-c** (semen diluido con mra y el complejo ciclodextrina-colesterol); **VITASEM** (semen diluido con vitasem sin cdc-c); **VITASEM+CDC-c** (semen diluido con vitasem y el complejo ciclodextrina-colesterol). Literales diferentes indican diferencia significativa

La motilidad progresiva (MP) también es un parámetro de importancia durante el trayecto del espermatozoide en el tracto reproductivo de la hembra, si bien la motilidad masal es un indicativo general de toda la suspensión espermática, la MP es un indicativo de la cinética individual, tanto la motilidad espermática masal y la individual puede correlacionarse tomando como valores mínimos aceptables para monta natural, una muestra que posea una motilidad individual de 30% y una motilidad masal regular 70%, mientras que para ser utilizado con fines de criopreservación, la muestra de semen deberá tener una motilidad masal regular 70 % con 50% de motilidad individual.

4.2 Viabilidad

Se evaluó la vitalidad espermática mediante una tinción fluorescente a base de Ioduro de propidio y Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) mediante la cual se considera que los espermatozoides que pierden la integridad de membrana (muertos) son permeados por el fluorocromo, y se tiñen rojo-rosa.

Los vivos se muestran en color azul (Fig. 15). Las muestras fueron sometidas a evaluación de vitalidad a las 12, 36 y 60 h pos-dilución. La tabla 6 muestra el porcentaje promedio de espermatozoides vivos encontrados en cada periodo de evaluación, el tratamiento 4 (Vitasem+CDC-c) muestra mejores resultados en cuanto a porcentaje de supervivencia (71% las primeras 12 h)

La viabilidad fue mayor ($P < 0.05$) cuando se utilizó VITASEM+CDC-c respecto a los demás tratamientos

Tabla 6. Viabilidad de espermatozoides porcinos tratados con CDC-c

	12h	36h	60h
MRA	53 ± 14 ^a	31 ± 10 ^a	16 ± 9 ^a
MRA+CDC-c	74 ± 11 ^{cd}	52 ± 16 ^{bcd}	38 ± 15 ^{bcd}
VITASEM	59 ± 15 ^{bc}	38 ± 11 ^{ab}	25 ± 15 ^{ab}
VITASEM +CDC-c	82 ± 11 ^d	63 ± 13 ^d	46 ± 16 ^d

MRA (semen diluido con mra sin CDC-c); **MRA+CDC-c** (semen diluido con mra y el complejo ciclodextrina-colesterol); **VITASEM** (semen diluido con vitasem sin CDC-c); **VITASEM+CDC-c** (semen diluido con vitasem y el complejo ciclodextrina-colesterol). Literales diferentes indican diferencia significativa

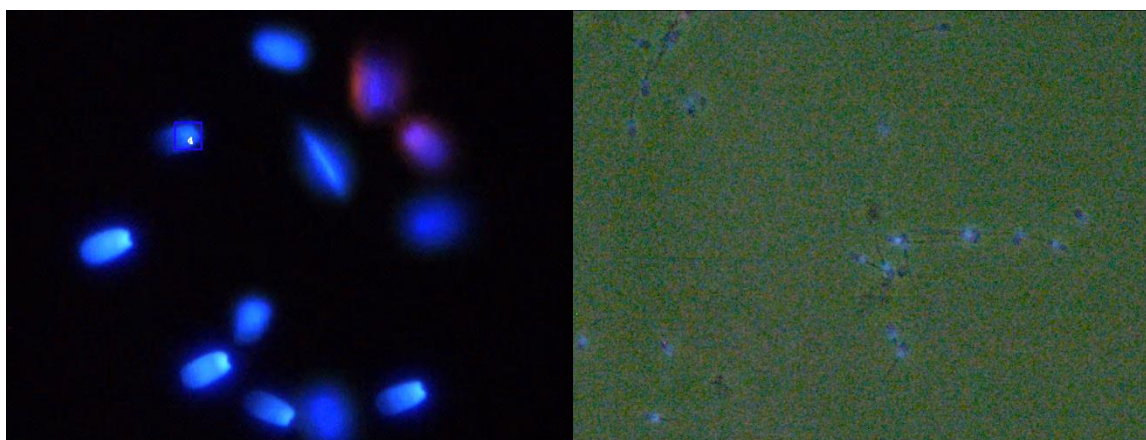


Fig. 15 Viabilidad espermática a las 12h Tx-Vitasem + CDC-c (teñidos con Fluorocromos a base de Ioduro de propidio y Hoescht) Azul = Vivos, Rojos= Muertos.

Cuando los espermatozoides porcinos son expuestos a temperaturas inferiores a 15°C tienden a sufrir cambios bioquímicos que resultan en muerte celular, cuando se adiciona al medio de conservación los medios adecuados para el mantenimiento energético y protección de membranas, se evita la apoptosis en cierto porcentaje, siendo este parámetro un indicativo del éxito o fracaso del medio de conservación, las ciclodextrinas en acción conjunta con el colesterol han demostrado su eficacia en diversos estudios al mantener viables un gran número de espermatozoides durante su utilización durante la conservación, (Qamar et al., 2013; Rajoriya et al., 2014). Cuando se le adiciona colesterol al medio, los parámetros de viabilidad, motilidad y funcionalidad de membranas, no se muestran comprometidos totalmente.

Resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con los reportados por Hartwig et al. (2014) Quienes encontraron que el semen de caballos (manga larga

marchador y cuarto de milla) tratados con CDC-c presentó mejores resultados de motilidad y membrana plasmática intacta, para esto se usaron tres concentraciones de CDC-c (1, 1.5 y 2 mg por cada 120 millones de espermatozoides), enfriándolos durante 48 horas a 5° C, obteniendo mayor porcentaje de viabilidad a las 24 h con 1 y 1.5 mg/120 millones de espermatozoides encontrando resultados de 67% y 68%, respectivamente. En otro estudio, Lee et al. (2015) en su trabajo con espermatozoides de jabalí tratados con metil beta ciclodextrina antes de la congelación reporta mejores porcentajes de viabilidad $76.9 \pm 1.01\%$ en comparación con los no tratados con el complejo ($58.7 \pm 1.31\%$). Adicionalmente, Yildiz et al. (2015) demuestra que la suplementación de 1 y 1.5 mg de ciclodextrina adicionada al extensor para congelación de semen de carpa, protege la membrana espermática sin afectar la motilidad y la viabilidad de los espermatozoides (74.7 ± 1.9 y 78.2 ± 0.7 , respectivamente; contra el daño por congelación en comparación con extensores que contenían 2.5 mg y 3.0 mg (56.3 ± 1.9 y 41.0 ± 1.3 % de Ciclodextrina debido a que una proporción elevada del complejo CDC-c tiene un efecto toxico afectando los parámetros de motilidad y viabilidad).

4.3 Funcionalidad de membrana (HOST)

Esta prueba seminal se fundamenta en que la suspensión de espermatozoides en un medio hipo-osmótico ocasiona un desequilibrio entre los medios intracelular y extracelular, situación que la célula trata de compensar difundiendo agua al compartimento intracelular; considerando un aumento del volumen del espermatozoide que se manifiesta en cambios morfológicos como dilatación y enrollamiento de flagelo (Fig. 16)

La adición del complejo CDC-c influyó en el porcentaje de espermatozoides sensibles a la prueba HOST ($P < 0.05$) dando como resultado un aumento significativo en el porcentaje espermatozoides con integridad física y funcional de las membranas incubadas en condiciones de 100 mOsm/L. Respecto al porcentaje de espermatozoides con membrana espermática funcional (Tabla 7), después de ser sometidos a la prueba HOST, fue superior cuando el CDC-c se adiciona a los

diluyentes; sin embargo, el valor más alto se observó cuando los espermatozoides fueron diluidos en VITASEN+CDC-C, a las 12, 36 y 60 h post-dilución.

Tabla 7. Funcionalidad de membrana de espermatozoides porcinos tratado con CDC-c.

	12h	36h	60h
MRA	39 ± 12 ^a	18 ± 7 ^a	10 ± 7 ^a
MRA+CDC-c	58 ± 11 ^{cd}	35 ± 11 ^{bc}	22 ± 12 ^{bc}
VITASEM	43 ± 14 ^{ab}	23 ± 9 ^{ab}	14 ± 12 ^a
VITASEM +CDC -c	70 ± 14 ^d	49 ± 11 ^d	31 ± 15 ^{cd}

MRA (semen diluido con mra sin cdc-c); **MRA+CDC-c** (semen diluido con mra y el complejo ciclodextrina-colesterol); **VITASEM** (semen diluido con vitasem sin cdc-c); **VITASEM+CDC-c** (semen diluido con vitasem y el complejo ciclodextrina-colesterol). Literales diferentes indican diferencia significativa

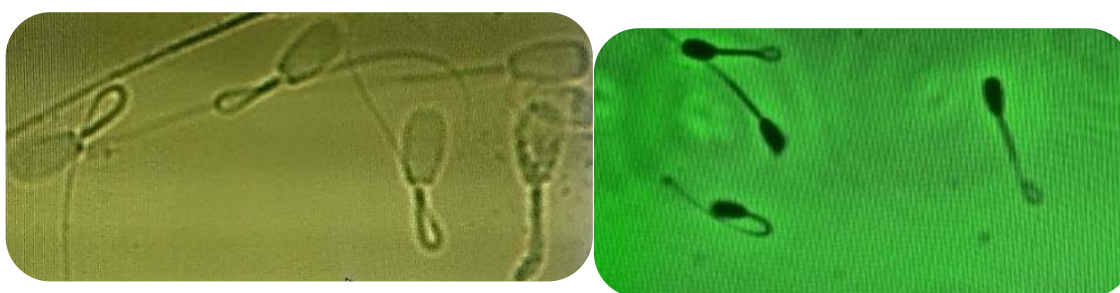


Fig. 16 Test de resistencia osmótica, visto con y sin filtro verde. Espermatozoides funcionales muestran enrollamiento de flagelo a causa de la absorción de líquido.

La integridad de la membrana plasmática es uno de los parámetros evaluados con mayor frecuencia durante el análisis seminal de rutina y su determinación es vital para predecir *in vitro* la capacidad fecundante del espermatozoide (Rijsselaere et al., 2005; Yeste et al, 2010).

Durante el descenso térmico los espermatozoides están expuestos daños por cambios de temperatura, daño oxidativo, alteraciones en la membrana espermática, y estrés osmótico que finalmente van a afectar su funcionalidad (Holt, 2000; Aksoy et al., 2010; Sánchez et al., 2017) La prueba de resistencia osmótica (HOST), que evalúa la integridad de la membrana espermática permiten predecir con una alta confiabilidad la capacidad fértil del semental (Aisen et al., 2002) y la adición de ciclodextrina combinada con el colesterol aumenta la tolerancia osmótica de las células espermáticas, lo que puede deberse a que la integridad de la membrana no es comprometida drásticamente el shock frio conservando así la funcionalidad y correcta apertura de los canales de K⁺ y Cl⁻ para permitir la salida de iones, a fin de

mantener el equilibrio osmótico (Glazar et al., 2009; Salmon et al., 2017). Cuando existe daño que involucra a la MP tienden a disminuir su capacidad de equilibrar/regular la concentración de iones intra y extracelular, por ello, una exposición a medios hipo-osmóticos es un indicativo de la funcionalidad espermática, por su estructura bioquímica, el espermatozoide porcino tiende a perder estabilidad de membrana con mayor rapidez que los demás espermatozoides animales debido a daños que perjudican la fisiología celular, las diferencias entre las especies en la sensibilidad de los espermatozoides al daño por choque frío se deben principalmente a la composición de fosfolípidos, así como a la relación colesterol de membrana: fosfolípido (C: P) (Holt, 2000; Longobardi et al., 2017); sin embargo, de acuerdo a los resultados en el estudio se puede comprobar la efectividad del colesterol al momento de conservarlo a 5 °C, diversos autores han confirmado las bondades protectoras del complejo CDC-c en varias especies animales, en contraste, estudios realizados por Aksoy et al. (2010) y Serin et al. (2011) en su trabajo con células espermáticas de conejo reportaron que estos, al adicionar colesterol a su membrana responden de manera positiva a la exposición de medios osmóticos diferentes mostrando mejora significativa en funcionalidad de membrana (45% CDC-c vs 35% control) y disminución de la reacción acrosomal (40% CDC-c vs 50% control). Por otra parte Ahmad et al. (2013) demuestran que el pretratamiento de espermatozoides ovinos con ciclodextrina cargada de colesterol aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides vivos (78%) que en el grupo control sin el complejo (13%) y funcionales (35% CDC-c vs 10% sin CDC-c) durante los desafíos osmóticos en una amplia gama de presiones osmóticas, entre 20 y 1500 mOsm. En este experimento, los dosis conservadas usando el complejo CDC-c mostraron una mejor respuesta al HOST, aunque es importante aclarar que este test es meramente informativo, existen reportes de una estrecha relación entre este test y el potencial de fertilidad de los espermatozoides, sin embargo hay una correlación positiva entre la respuesta al HOST y la viabilidad (Kasimanickam et al., 2017).

5. CONCLUSION

La adición del complejo CDC-c a los extensores de larga duración para mantenimiento de semen porcino (MRA y Vitasem) confiere un efecto positivo al disminuir los daños inducidos por el descenso de temperatura, mostrando mayores proporciones en las variables de calidad seminal (motilidad total, motilidad progresiva, vitalidad y funcionalidad de membrana) en las primeras 12 y 36 h post-dilución cuando se almacenan a 5 °C. Consecuentemente el diluyente comercial vitasem+CDC-c de acuerdo a los resultados en los parámetros mencionados con anterioridad, resulto ser el adecuado para la conservación de semen porcino hasta al menos 60 horas pos-dilución.

6. ANEXOS

6.1 Abreviaturas

CDC-c: Complejo Ciclodextrina- Colesterol

IA: Inseminación Artificial

ROS: Especies de oxígeno reactivo

MT: Motilidad Total

MP: Motilidad Progresiva

MM: Motilidad Masal

IP: Ioduro de propidio

RA: Reaccion Acrosomal

BR: Biotecnologías Reproductivas

mOsm: Osmolaridad

CASA: Por su siglas en inglés Computerized Assisted Sperm Analysis.

SCA: Por su siglas en inglés Sperm Class Analyzer.

6.2 Glosario

Motilidad: Término utilizado para describir el movimiento de las células espermáticas en un campo visual, cuando se valora el movimiento del total de la suspensión se denomina motilidad masal y cuando se valora de manera individual el tipo de movimiento se denomina motilidad progresiva.

Viabilidad: Se refleja en la proporción de los espermatozoides que están "vivos" de acuerdo al criterio de exclusión de algún colorante vital o mediante la expresión de su capacidad osmorreguladora cuando se los expone a condiciones hipoosmóticas.

Host: Prueba de resistencia osmótica basada en la hinchazón de los espermatozoides debido a la captación de agua en un medio hipoosmótico (100 mOsm)

Osmolaridad: Concentración de las partículas osmóticamente activas contenidas en una disolución, expresada en osmoles o en miliosmoles por litro de disolvente.

Hipo-osmótico: Solución que posee una gran proporción de agua en comparación a la cantidad de solutos.

Variables de calidad seminal: Motilidad, viabilidad, host (Funcionalidad de membrana).

Capacitación espermática: Proceso que consiste en una serie de cambios esenciales que se producen en la membrana del espermatozoide, principalmente la remoción del colesterol, por medio de los cuales obtiene su capacidad de fecundación, así como una hipermotilidad. Este proceso ocurre naturalmente en el interior del aparato reproductor de la hembra, aunque también puede ser logrado *in vitro*.

Reacción acrosomal: Proceso seguido después de la capacitación que finaliza cuando se fusionan las membranas plasmáticas y acrosomales de la cabeza del espermatozoide, liberando enzimas que reacciona con las proteínas de la zona pelúcida, lo cual permite el paso del espermatozoide hasta el espacio perivitelino.

7. REFERENCIAS

- Aboul, M. E., Elmonem, M.A., Hussein, M., Eldesouky, A., Badr, M., Elraouf H.A., Balboula, A., Zaabel, S.M (2017) The effect of cholesterol loaded cyclodextrins on post-thawing quality of buffalo semen in relation to sperm DNA damage and ultrastructure. *Reproductive Biology*. 17:42-50.
- Ahmad, E., Aksoy, M., Serin, I., Küçük, N., Ceylan, A., Uçan, U (2013) Cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment of ram spermatozoa protects structural integrity

- of plasma membrane during osmotic challenge and reduces their ability to undergo acrosome reaction in vitro. *Small Ruminant Research*. 115:77-81.
- Aisen, E., Medina, V.H., Ventrino, A (2002) Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*. 57:1801-1808.
- Aksoy, M., Akman, O., Lehimcioğlu, N.C., Erdem, H (2010) Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 120(1-4):166-172.
- Alberio, R., Rebuffi, G., Aller, J.F., Cancino A.K (2003) Influencia de la criopreservación sobre la motilidad, viabilidad y fertilidad de espermatozoides de llama (Lama Glama) *Archivos de zootecnia*. 52(197):15-23
- Aldal, O.A., Egeli, A.K., Haugen, J.E., Grodum, A., Fjetland, O., Eikaas, J.L.H (2005) Levels of androstene and skatole and the occurrence of boar taint in fat from young boars. *Livestock Production Science*. 95:121–129.
- Almenar, C.T (2007) Nuevos protocolos para la crioconservación de espermatozoides de macho cabrío. Instituto Valenciano de Investigaciones Agropecuarias.
- Alvarez, A.L., Serres, C., Torres, P., Crespo, F., Mateos, E., Gómez-Cuétara, C (2006) Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryopreservation of donkey spermatozoa. *Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction - Equine Reproduction IX*, 94, Kerkrade, The Netherlands. *Animal Reproduction Science*. 89-91.
- Amann, R.P & Katz, D.F (2004) Andrology Lab Corner *: Reflections on CASA After 25 Years. *Journal of Andrology*. 25:317-325.
- Amann, R.P & Waberski, D (2014) Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81:5-17.
- American Society of Theriogenology (1992) Parameters for evaluation of sperm motility. 5th edition.
- Anderson, E.M & Navara, K.J (2011) Effect of seminal plasma progesterone on sperm hole penetration in White Leghorn. *Pavipollo Science*. 90: 2035 – 2040

- Asprón, M (2004) Manejo reproductivo del ganado bovino. International Veterinary Information Service. 19-22.
- Aulesa, C., Cabrera, M., Alonso, R., Benítez, M., Martínez, M (2009) Evaluación del sistema automatizado Sperm Class Analyzer (SCA) para análisis del semen. Revista del Laboratorio Clínico. 2:8-16.
- Avalos, R. A., Ortíz, M.A.R., Ortega, C.C. Vergara, O.M., Rosado, G.A, Rosales, T (2004) Fluorometric study of rabbit sperm head membrane phospholipid asymmetry during capacitation and acrosome reaction using Annexin-V fitc. Archives Andrology. 50(4):273-85.
- Bailey, J.L., Lessard, C., Jacques, J., Brèque, C., Dobrinski, I., Zeng, W (2008) Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. Theriogenology. 70:1251-1259
- Banks, W. J (2002) Histología veterinaria aplicada. (2ª edición) Editorial, El manual moderno. México. 750 p.
- Baren, A., Bacinoglu, S., Evecen, M., Sahin, B.E., Alkan, S., Demir, K., Ak, K., Ileri, K (2004) Freezing of cat semen in straws with different GLY levels containing Tris-extender. Turkey Journal Veterinary Animal Science. 28:545-552.
- Barranco, I., Ortega, M.D., Martinez, M.M.J., Vazquez, J.M., Martinez, E.A., Roca, J (2013) Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. Cryobiology. 67(3):299-304.
- Barth, A.D & Oko, R.J (1989) Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. United State of America. Ed. Iowa State University Press. Ames.
- Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., Ball, B.A (2003) Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. Theriogenology. 60:1239-1247
- Bearden, J., G., McCallow, G., Smith, P (1982) Sperm dilutions for appropriate routine of semen evaluation. Theriogenology. 33:157-160

- Cummings, B (2001) Human Anatomy & Physiology, 5th. An imprint of Addison Wesley Longman, Inc.
- Benson, J.D., Woods, E.J., Walters, E.M., Critser, J.K. (2012) The Cryobiology of spermatozoa. *Theriogenology*. 78(8):1682-1699.
- Boe-Hansen, G.B., Christensen, P., Vibjerg, D., Nielsen, M.B.F., Hedeboe, A.M (2008) Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*. 69(6):728-736.
- Broekhuijse, M.L.W.J., Šoštarić, E., Feitsma, H., Gadella, B.M (2011) Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology*. 76 (8):1473-1486.
- Bucak, M.N., Atessahin, A., Varish, O., Yuce, A., Tekin, N., Akcay, A (2007) The influence of trehalose, taurine, custemine and hyaluronan on ram semen. *Theriogenology*. 67:1060-1067.
- Cabrera, V.P y Pantoja, A.C (2012) Viabilidad espermática e integridad del acrosoma en semen congelado de toros nacionales. *Revista de investigacion veterinaria Perú*. 23(2):192-200.
- Casas, S. Sancho, J. Ballester, M. Briz, E. Pinart, E. Bussalleu, M. Yeste, A. Fàbrega, J.E. Rodríguez-Gil, S. Bonet, (2010) The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*. 74 (6):940-950.
- Castellini, C., Dal-Bosco, S. A., Ruggeri., Collodel. G (2011) What is the best frame rate for evaluation of sperm motility in different species by computer-assisted sperm analysis? *Fertility and Sterility*. 96:24-27.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T.M (2001) Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction*. 121:395-401
- Chandler, J.E., Painter, C.L., Adkison, R.W., Memon, M.A., Hoyt. P.G (1988) Semen quality characteristics of dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 71:1638-1646.

- Christensen, P., Knudsen, D.P., Wachman, H., Madsen, M.T (2004) Control de calidad en la producción de semen de verraco mediante el uso del sistema FACSCount AF. *Theriogenology*. 62:1218-1228.
- Christian, A.E., Haynes, M.P., Phillips, M.C; Rothblat, G.H (1997) Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of Lipid Research*. 38:2264 – 2272.
- Claus, R., Weiler, U., Herzog, A (1994). Physiological aspects of androstenone and skatole formation in the boar: A review with experimental data. *Meat Science*. 38:239–305.
- Colenbrander, B & Kemp, B (1990) Factors influencing semen quality in pigs. *Journal of Reproduction and Fertility*. 40:105-115.
- Combes, G.B., Varner, D.D., Schroeder, F., Burghardt, R.C., Blanchard, T.L (2000) Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56:127-132
- Coraza, L., Bouza, R. y Petrocelli, H. (1990) Inseminación Artificial en cerdos. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. p. 17.
- Cortés, G.E.I., Dávila, R.M.I., López, F.C., Fernández, J.L., Gosálvez, J (2007). Evaluación del daño en el DNA espermático. *Actas Urológicas Españolas*. 31(2):120-131.
- Cox, J.F., Fernandez, P., Saravia, F., Santa Maria, A (1998). Utilización de lectina *Pisum sativum* y yoduro de propidio para la evaluación rápida de integridad de acrosoma en espermatozoides caprinos. *Archivos de medicina veterinaria*. 30: 93-99.
- Creasy, D.M & Chapin, R.E (2013) Chapter 59 - Male Reproductive System, Editor(s): Wanda M. Haschek, Colin G. Rousseaux, Matthew A. Wallig, Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition). Academic Press. 2493-2598.

- Cunningham, J.G (1999) Fisiologia Veterinaria. (2ª ediccion) Editorial McGraw-Hill Interamericana. Mexico. 763 p.
- Curry, M.R (2000) Cryopreservation of semen from domestic livestock. Revision Reproduction. 5:46-52
- Daianny B. Guimarães, Tatyane B. Barros, Maurício F. van Tilburg, Jorge A.M. Martins, Arlindo A. Moura, Frederico B. Moreno, Ana C. Monteiro-Moreira, Renato A. Moreira, Ricardo Toniolli (2017) Sperm membrane proteins associated with the boar semen cryopreservation. Animal Reproduction Science. 183:27-38.
- Davis, R.O., Bain, D.E., Siemers, R.J., Thal, D.M., Andrew, J.B., Gravance, C.G (1992) Accuracy and precision of the CellForm-Human automated sperm morphometry instrument. Fertility and Sterility. 58:763-769
- De-Alba, J (1985) Reproducion animal. Editorial Copilco. Mexico.
- De-Andrade, A.F.C., De Arruda, R.P., Celeghini, E.C.C., Nascimento, J., Martins, S.M.M.K., Raphael, C.F., Moretti, A.S (2007) Fluorescent Stain Method for the Simultaneous Determination of Mitochondrial Potential and Integrity of Plasma and Acrosomal Membranes in Boar Sperm. Reproduction in Domestic Animals. 42:190194.
- De-Leeuw, F.E., Colenbrander, B., Varkleij, A.J (1990) Reproduction Domestic Animals. Wiley Online Library. 1-95.
- De-Vos, A., Van de Helde, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., Van Steirteghem A (2003) Influence of individual sperm morphology on fertilization, embryo morphology and pregnancy outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertility and Sterility. 79:42-48
- Den-Daas, J.H., De-Jong, G., Lansbergen, L.M., Van-Wagtendonk., A.M.L (1998) The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. Journal Dairy Science. 81:1714-1723

- Donoghue, A.M; Wishart, G.J (2000) Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*. 62:213-232.
- Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G (2012) *Anatomía Veterinaria*. (4a ed.). Editorial el manual moderno. México.
- Ehlers, J., M. Behr., H. Bollwein., M. Beyerbach., Waberski, D (2011) Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology* 76:448-454.
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost. L.K (2002) Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*. 23:25-43.
- Fatehi, A.N., Bevers, M.M., Schoevers, E., Roelen, B.A., Colenbrander, B., Gadella, B.M (2006) DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of Andrology*. 27:176-188
- Foote, R.H (2002) The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *Journal of Animal Science*. 80:1-10.
- Ford, W.C (2004) Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 10:387–299.
- Fraser, L., Dziekońska, A., Strzeżek, R., Strzeżek, J (2007) Dialysis of boar semen prior to freezing–thawing: Its effects on post-thaw sperm characteristics. *Theriogenology*. 67(5):994-1003.
- Fu-Jun, L & Xiao-Fang S (2012) Comparative analysis of human reproductive proteomes identifies candidate proteins of sperm maturation. *Molecular Biology Reproduction*. 39(12):10257-10263
- Gadea, J (2005) Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology*. 63:431-444.
- Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A (2004) The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*. 39:303-308

- Gadella, B.M & Van Gestel, R.A (2004) Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. *Animal of Reproduction Science*. 82:07-29
- Gadella, B.M., Flesch, F.M, Van, G., Colenbrander, B (1999) Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *The Veterinary Quarterly*. 21(4):14-26.
- Galantino, H.L., Zeng, W.X., Megee, S.O., Mallmeyer, M., Voelkl, D., Dobrinski, I (2006) Effects of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Molecular Reproduction and Development*. 73:638-650.
- Galina, C y Valencia J (2014) Reproducción de los animales domésticos (3a ed.). Editorial limusa. México.
- García, P., Pérez, B., Gosálvez, J (2006) Estudio del nivel de fragmentación del ADN en semen de verraco. En: S. Bonet et al., editores, Manual de técnicas de reproducción asistida en porcino. Universidad de Gerona, y Red temática nacional de reproducción porcina, Gerona, España. 125-132
- Geisert, R.D. (1999) Pigs. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil, E., Neill, J.D. (ed.) Academic Press (San Diego, USA). pp. 792-799.
- Gibb, Z., & Aitken, R.J (2016) Recent Developments in Stallion Semen Preservation, *Journal of Equine Veterinary Science*. 43:S29-S36.
- Gil, M.C., García, H., M., Barón, F.J., Aparicio, I.M., Santos, A.J., GarcíaMarín, L.J (2009) Morphometry of porcine spermatozoa and its functional significance in relation with the motility parameters in fresh semen. *Theriogenology*. 71:254-263
- Giraldo, G y Jairo, J (2007) Una mirada al uso de la inseminación artificial en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación*. 4(1) 51-57 p.
- Glazar, A.I., Mullen, S.F., Liu, J., Benson, J.D., Critser, J.K., Squires, E.L., Graham J.K (2009) Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology*. 59:201-206.

- Gloria, A., Contri, A., Grotta, L., Carluccio, A., Robbe, D., Ianni, A., Vignola, G., Martino, G (2019) Effect of dietary grape marc on fresh and refrigerated boar semen. *Animal Reproduction Science*. 205:18-26.
- Gómez, M. A., Vieira, L.A., De Ondiz, A., Paterna, A., Gadea, J., De la Fe, C (2012) Evalaucion de la viabilidad y motilidad espermatica. *Anales de veterinaria de Murcia*. 28:129-139
- Gómez, M., Girela, J., Fernández, P., Romeo, A (2005) Estudio de las alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos con microscopia electrónica de barrido (sem). *Revista Iberoamericana.de Fertilidad y. Reproduccion Humana*. 22:59-66.
- Graham, J.K & Mocé, E (2005) Fertility evaluation of frozen/thawed semen. *Theriogenology*. 64(3):492-504.
- Green, C.E & Watson, P.F (2001) Comparison of the capacitation –like state off cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*. 122:889-898.
- Grossfeld, R., Sieg, B., Struckmann, C., Frenzel, A., Maxwell, W.M., Rath, D (2008) New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology*. 70:1225 – 1233.
- Hacker, R.R., Du, Z., D' Arcy, C.J (1994) Influence of penning type and feeding level on sexual behavior and feet and leg soundness in boars. *Journal Animal Science*. 72(10):2531-2537.
- Hae-Lee, L., Sue-Hee, K., Dong-Beom, J., Yong-Jun, K.A (2009) A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *Journal Veterinary Science*. 10(3):249-255.
- Hafez, E.S.E y Hafez, B (2002) Reproducción e inseminación artificial en animales. (7a ed.). Editorial Interamericana-McGraw-Hill. México.
- Hancock, J.L., G.J.R. Howell (1959) The collection of boar semen. *Veterinary Record*. 71: 664.

- Harald, S., Harri tte O., Willem F. W (2016) Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Animal Reproduction Science*. 169:2-5.
- Harrison, R & Vickers, S (1990) Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalia spermatozoa. *Journal Reproduction and Fertility*. 88:343-352.
- Hartwig, F.P., Lisboa, F.P., Hartwig, F.P., Monteiro, G.A., Maziero, R.R.D., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Alvarenga, M.A., Papa, F.O., Dell'Aqua, J.A (2014) Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*. 81:340-346.
- Hasler, J.F (2014) Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. *Theriogenology*. 81:152-169.
- Hernandez, C.P., Perez, C.E., Martinez, M.L., Ortiz, B., Martinez G (2005) Las lectinas vegetales como modelo de estudios de las interacciones proteína-carbohidratos. *Revista de Educacion Bioquimica*. 24:21-27.
- Hernández, D.P., Martín, G. O., Rodríguez, P.V.Y., Ganem, B.C.F (1999) Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematologia Inmunologia y Hemoterapia*. 15(2):91-95.
- Hernández, P.J.E., Rodríguez, S.J.L; Sánchez, M.C, Ramirez, F.R (2015) Efecto de técnicas de separación espermática en la viabilidad y estado acrosomal de espermatozoides posdescongelados de ovinos. *Revista de salud animal*. 37:15-20.
- Hernandez, R.J., Togno, P.C., Lopez, J.C., Perez, A.S.G., Arenas, R.A., Vigueras, V.R.M., Montes, L.S., Bonilla, J.H., Damian, M.P., Arteaga, S.M (2016) Efecto del cadmio en la maduración espermática epididimaria. *Revista Iberoamericana de Ciencias*. 3(3):11-21.
- Hess, E.A., Teague, H.S., Ludwick., T.M., Martig, R.C (1957) Swine can be bred with frozen semen. *Ohio Fm Home Res*. 42:100
- Hezavehei, M., Sharafi, M., Kouchesfahani, H.M., Henkel, R., Agarwal, A., Esmaeili, V., Shahverdi, A (2018) Sperm cryopreservation: A review on current molecular

- Cryobiology and advanced approaches. Reproductive BioMedicine Online. 37(3):327-339.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Pérez, C., Dorado, J., Sánchez, M. (2002) Parámetros Morfométricos de la cabeza del espermatozoide de macho cabrío. In Jornadas Internacionales de Ovinotecnia y Caprinotecnia. (Valencia, España.)1053-1058.
- Hidalgo, M., Rodríguez, I., Dorado, J (2006) Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. Theriogenology. 66:996-1003.
- Holt, W.V (2000) Fundamental aspects of sperm Cryobiology: The importance of species and individual differences. Theriogenology. 53:47-58.
- Holt, W.V., Medrano, A., Thurston, L.M., Watson, P.F (2005) The significance of cooling rates and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. Theriogenology. 63:370-382
- IIP (2008) Manual de Procedimientos Técnicos para la Crianza Porcina. Instituto de Investigaciones Porcinas. Ediciones CIMA. La Habana.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (2016) Imágenes de territorio.
- Johnson, L.A., Weitze, K.F., Fiser, P., Maxwell, W.M.C (2000) Storage of boar semen. Animal Reproduction Science. 62:143-172.
- Jurado, S., Sarmiento, P. Stornelli, A. (2008) La microscopía electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. Analecta veterinaria. 28:7-14.
- Kasimanickam, R.K., Kasimanickam, V.R., Arangasamy, A., Kastelic, J.P (2017) Associations of hypoosmotic swelling test, relative sperm volume shift, aquaporin7 mRNA abundance and bull fertility estimates. Theriogenology. 89:162-168.
- Kawakami, E., Morita, Y., Hori, T., Tsutsui, T (2002) Lectin-binding characteristics and capacitation of canine epididymal spermatozoa. Journal of Veterinary Medicine Science. 64(7):543-549.

- Knox, R.V., Ringwelski, J.M., McNamara, K.A., Aardsma, M., Bojko, M (2015) The effect of extender, method of thawing, and duration of storage on in vitro fertility measures of frozen–thawed boar sperm. *Theriogenology*. 84 (3):407-412.
- Kumar, P., Srivastava N., Pande, M., Prasad, J.K., Sirohi, A.S (2017) Evaluating Sperm Cell Viability and Membrane Integrity. In: Srivastava N., Pande M. (eds) *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*. Springer, Singapore
- Kumaresan, A., Kadirvel, G., Bujarbaruah, K., Bardoloi, R., Das, A., Kumar, S., Naskar, S (2009) Preservation of boar semen at 18 °C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 110:162-171.
- Larson, E.L., Kopania, E.E.K., Good, M.J (2018) Spermatogenesis and the Evolution of Mammalian Sex Chromosomes, *Trends in Genetics*. 34(9):722-732.
- Lee, Y.S., Lee, S., Lee, S.E., Yang, B.K., Park, C.K (2015) Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 159:124-130.
- Lemoine, M., Mignon-Grasteaue, S., Grasseau, I., Magistrinia, M., Blesbois, E (2011) Ability of chicken sperm to undergo acrosome reaction after liquid storage or cryopreservation. *Theriogenology*. 75:122-130
- Li, G., Saenz, J., Godke, R.A., Devireddy, R.V (2006) Effect of GLY and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing-induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction*. 131:875-886.
- Li, J., Parrilla, I., Ortega, M.D., Martinez, E.A., Martinez, H.R., Roca, J (2018) Post-thaw boar sperm motility is affected by prolonged storage of sperm in liquid nitrogen. A retrospective study. *Cryobiology*. 80:119-125.
- Li, J., Roca, J., Perez, P.C., Barranco, I., Martinez, E.A., Martinez, R.H., Parrilla, I (2018) Is boar sperm freezability more intrinsically linked to spermatozoa than to the surrounding seminal plasma?. *Animal Reproduction Science*. 195:30-37.
- Lone, S.A (2018) Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 192:1-5.

- Lone, S.A., Prasad, J.K., Ghosh, S.K, Das G.K., Kumar.N., Balamurugan B., Katiyar.R., Verma, M.R.(2016) Effect of cholesterol loaded cyclodextrin (CLC) on lipid peroxidation and reactive oxygen species levels during cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa, *Asian Pacific Journal of Reproduction*: 5(6):476-480.
- Lone, S.A., Prasad, J.K., Ghosh., Kumar, N., Bhat, S.A., Das, G.K (2016) Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on activity of antioxidants during cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Indian Journal Animal Science*. 86:1255-1258.
- Longobardi, V., Albero, G., De Canditiis, C., Salzano, A., Natale, A., Balestrieri, A., Neglia, G., Campanile, G., Gasparini, B (2017) Cholesterol-loaded cyclodextrins prevent cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) cryopreserved sperm. *Theriogenology*. 89:359-364.
- Lopez, C.A., De Vries, A.H., Marrink, S.J (2011) Molecular mechanism of cyclodextrin mediated cholesterol extraction. *PLoS Computational Biology*. 7(3):1-11
- Lopez, C.A., De Vries, A.H., Marrink, S.J (2013) Computational microscopy of cyclodextrin mediated cholesterol extraction from lipid model membranes. *Science Reproduction*. 3:1-6
- Love, C.C (2018) Sperm quality assays: How good are they? The horse perspective. *Animal Reproduction Science*. 194:63-70
- Maree, L., Du-Plessis, S.S., Menkveld, R., Van der Horst, G (2010) Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used *Reproduction human*. 25:1369-1382
- Martinez, P.F., Johannisson, A., Gil, J., Kaabi, M., Anel, L., Paz, P., Rodriguez-M.H (2004) Use of chromatin stability assay, mitochondrial stain JC-1, and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Animal Reproduction Science*. 84(1-2):121-33.

- Maxwell, W.M.C & Jhonson, L.A (1997) Chorl tetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling or cryopreservation. *Molecular Reproduction and Development*. 46(3):408-418.
- McLaren, D.G & Bovey, M (1992) Genetic Influences on Reproductive Performance. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 8(3):435-459.
- Medeiros, C.M.O., Forell, F., Oliveira, A.T.D., Rodrigues, J.L (2002) Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better?. *Theriogenology*. 57:327-344.
- Michiko, N., Koji, Y., Hirokazu, H., Chie, S., Kazuhiro, K., (2015) Effect of semen extenders on frozen-thawed boar sperm characteristics and distribution in the female genital tract after deep intrauterine insemination in sows. *Animal Reproduction Science*. 163:164-170.
- Mocé, E., Purdy, P.H., Graham, J.K (2010) Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Animal Reproduction Science*. 118:236-247.
- Mokgadi, M.S., Masindi, L.M., Tshimangadzo, L.M (2016). Comparison of four different permitting and combination of two best cryoprotectants on freezing Nguni sperm evaluated with the aid of Computer Aided Sperm Analysis. *Cryobiology*. 72:1-7.
- Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K (2005) Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology*. 51:241-249.
- Moore, S.G y Hasler, J.F (2017) A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *Journal of Dairy Science*. 100(12):10314-10331.
- Moraes, E.A., Matos, W.C.G., Graham, J.K., Ferrari, W.D (2015) Cholesterol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 15:19-24.
- Morris, G.J., Acton, E., Murray, B.J., Fonseca, F (2012) Freezing injury: The special case of the sperm cell. *Cryobiology*. 64(2):71-80.

- Muiño, R., Peña, A.I., Rodríguez, A., Tamargo, C., Hidalgo, C.O (2009) Effects of cryo-preservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*. 72:860-868.
- Murphy, C., English, A.M., Holden, S.A., Fair, S (2014) Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 145(3–4):123-129.
- Murphy, E.M., Eivers, B., O'Meara, C.M., Lonergan, P., Fair, S (2018) Effect of increasing equilibration time of diluted bull semen up to 72 h prior to freezing on sperm quality parameters and calving rate following artificial insemination. *Theriogenology*. 108:217-222.
- Navratil, A.M., Bliss, S.P., Berghorn, K.A., Haughian, J.M., Farmerie, T.A., Graham, J.K., Clay, C.M., Roberson, M.S (2003) Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *Journal Biology Chemical*. 278:31593-31602
- Nolan, J.P., Graham, J.K., Hammer-Stedt, R.H (1992) Artificial induction of exocytosis in bull sperm. *Archives Biochemical Biophys*. 292: 311-322
- Ochoa, G y Ortega, R (2008) Evaluación in vitro e in vivo de semen porcino conservado en diluyentes de larga duración. *Revista Computadorizada de Producción Porcina*. 15(4):298-306.
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., Giraldo, C (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 19(4):426-436.
- Ortega,F.C., Sotillo, G.Y, Varela, F.E, Gallardo, B.J.M, Muriel A, González, F.L, Tapia J.A., Peña, F.J (2008) Detection of “apoptosis-like” changes during the cryopreservation process in equine sperm. *Journal of Andrology*. 29:213-221
- Park, C.S & Yi, J (2002) Comparison of semen characteristics, sperm freezability and testosterone concentration between Duroc and Yorkshire boars during seasons. *Animal Reproduction Science*. 73:53-61

- Partyka, A., Strojceki, M., Niżański, W (2018) Cyclodextrins or cholesterol-loaded-cyclodextrins? A better choice for improved cryosurvival of chicken spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 193:235-244.
- Peña A., Linde, F.C (2000) Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54:703-718.
- Peña, F.J., F. Saravia, M. García-Herreros, I. Núñez-Martínez, J.A. Tapia, A. Johannisson, M. Wallgren., Rodríguez, M.H (2005) Identification of sperm morphometric sub-populations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to post thaw quality. *Journal of Andrology*.26:716-723.
- Pérez, P.F y Pérez, G.J.F (1985) Reproducción animal: Inseminación artificial y trasplante de embriones. 2a. Ed. Científico médica. Barcelona, España.
- Pinart, E., Sancho, S., Briz, M., Bonet, S., Garcia, N., Badia, E (2000) Ultrastructural study of the boar seminiferous epithelium: changes in cryptorchidism. *Journal of Morphology*. 244:190-202
- Pinart, E., Yeste, M., Prieto, M.N., Reixach, J., Bonet, S (2015) Sperm quality and fertility of boar seminal doses after 2 days of storage: Does the type of extender really matter?.*Theriogenology*. 88:1428-1437.
- Pintado, B., De la Fuente, J., Roldan, E. R (2000) Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of Reproduction and Fertility*. 118(1):145-52.
- Pond, W.G y Houpt, K. A (1981) *Biología del cerdo*. Editorial Acribia-Royo, 23-zaragoza. España.
- Purdy, P.H & Graham, J.K (2004) Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 48:36-45.
- Pursel, V.G & Johnson, L.A (1975) Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal Animal Science*. 40:99-102

- Qamar, A.Y., Sattar, A., Ahmad, N (2013) Cholesterol enhances post-thaw semen quality in buffaloes (*Bubalus bubalis*) Buffalo Bull. 32:370-374.
- Quintero, V.G.A., Bermúdez, C.R.M., Cadena, C.J (2015) Infertilidad masculina y fragmentación del ADN espermático: un problema Actual. TIP Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas. 18(2):144-151.
- Rajoriya, J.S., Prasad, J.K., Ghosh, S.K., Ramteke, S., Barik, N.C., Das, G.K (2014) Cholesterol loaded cyclodextrin increases freezability of buffalo bull (*Bubalus bubalis*) spermatozoa by increasing cholesterol to phospholipid ratio. Veterinary World. 7:702-706.
- Rajoriya, J.S., Prasad, J.K., Ramteke, S.S., Perumal, P., Ghosh, S.K., Singh, M., Pande, M., Srivastava, N (2016) Enriching membrane cholesterol improves stability and cryosurvival of buffalo spermatozoa. Animal Reproduction Science.164:72-81
- Restrepo G (2008) Biotecnologías Reproductivas Aplicables a la Producción Bovina en Colombia, GIBA.
- Risopatron, J., Catalán, S., Sepúlveda, N., Sanchez, R (2005). Effect of different concentrations of heparin on canine sperm capacitation in vitro. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia. 15. 528-535.
- Robaire, B & Hinton, B.T (2015) The Epididymis” en: Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction, 4th ed, T.M. Plant y A.J. Zeleznik, Eds. USA: Elsevier. 619-677.
- Roca, J., Parrilla, I., Rodriguez, M.H., Gil, M.A., Cuello, C., Vazquez, J.M., Martinez, E.A (2011) Approaches towards efficient use of boar semen in the pig industry. Reproduction in Domestic Animals. 46:79-83.
- Rodríguez, G.J.E & Estrada, E (2013) Artificial insemination in boar reproduction. In: S Bonet, I Casas, WV Holt , M Yeste (eds), Boar Reproduction. Springer, Berlín. pp. 589 – 608.
- Rodríguez, M.V., Riquelme, B., Valverde, J., Gattuso, S (2004) Caracterización del efecto aglutinante de lectinas de la familia de las fabáceas sobre los eritrocitos

humanos mediante el análisis de imágenes. *Anales de Asociacion Fisica Argentina*. 16:247-248

Rodríguez, P.B.V., Toledo, S.C.A., Gomez, A.M., Santana, P.F., Dominguez A.E (2013) Alteraciones morfológicas de espermatozoides humanos por microscopia electrónica de barrido. *Revista cubana de endocrinología*. 23 (2):153-160.

Roldan, E (2012) Forma, función y fertilidad de los espermatozoides. Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC). SEBBM divulgación.

Romar, R., Cánovas, S., Matás, C., Gadea, J., Coy, P (2019) Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go?. *Theriogenology*. 137:113-121.

Rosenberger, G. (1981). *Exploración Clínica de los Bovinos*. Primera Edición. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. Pp. 281-319.

Rowlan, S.C., Jacobson, D.J., Patton, C.W., King, A., Chan, J.P (2003) Dual fluorescence analysis of DNA apoptosis in sperm. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 188(5):1157-1157.

Rueda, M., Perdigón, R., Arias, T., Mendoza, D., Benítez, J., Lemus, S., Tosar, M (2009) Diluyentes Cubanos de semen porcino. *Revista Computarizada de Producción Porcina*.16:26-29.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P (2004) The measurements of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture* 234:1-28.

Salmon, V.M., Castonguay, F., Demers-Caron, V., Leclerc, P., Bailey, J. L. (2017) Cholesterol-loaded cyclodextrin improves ram sperm cryo-resistance in skim milk-extender. *Animal Reproduction Science*. 177:1-11.

Samardzija, M., Karadjole, M., Getz, I., Makek, Z., Cergoji, M., Dobranic, T (2006) Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 4:58

Sánchez, C.M.J., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., De la Fuente, M.J., Carrillo, S.G., Pérez, J.F.P., Pérez, C.S (2017) Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. *Reproductive Biology*. 17(3):233-238.

Sistem Computer Analyzer (SCA). Microptic. España

Schulze, M., Ammon, C., Schaefer, J., Luther, A.M., Jung, M., Waberski, D (2017) Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 182:138-145.

Serhat, B., Tuncer, P.B., Bucak, M.N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., Endirlik, B.U (2014) Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*. 150(3-4):77-83.

Serin, I., Aksoy, M., Ceylan, A (2011) Cholesterol-loaded cyclodextrin inhibits premature acrosomal reactions in liquid-stored rabbit spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 123:106-111.

Shannon, P & Vishwanath, R (1995) The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Animal Reproduction Science*. 39:1-10.

Silva, C.G; Cunha, E.R., Blume, G.R., Malaquias, J.V., Báó, S.N; Martins, C.F (2015) Cryopreservation of boar sperm comparing different cryoprotectants associated in media based on powdered coconut water, lactose and trehalose. *Cryobiology*. 70(2):90-94.

Silva, P.F & Gadella, B.M (2006) Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, 65(5):958-78.

Sisson, S y Grossman, J.D (2001) *Anatomía de los animales domésticos* (5a ed.). Editorial Salvat. Barcelona.

Spizziri, B.E., Fox, M.H., Bruemmer, J.E., Squires, E.L., Graham, J.K (2010) Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 118:255–264.

Thibier, M & Guerin, B. (2000). Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62(1-3):233-251.

- Vassan, S.S (2011) Semen analysis and sperm function tests: How much to test?. Indian Journal of Urology. 27:41-48.
- Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., Onclin, K (2002) Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 57:149-179.
- Waterhouse, K.E., De Angelis, P.M., Haugan, T., Paulenz, H., Hofmo, P.O., Farstad W (2004) Effects of in vitro storage time and semen extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. Theriogenology. 62:1638-1651.
- Watson, P.E (200) The caused of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal reproduction Science. 60:481-492.
- Way, A.L., Henault, M.A., Killian, G.J (1995) Comparison of four staining methods for evaluating acrosome status and viability of ejaculated and cauda epididymal bull spermatozoa. Theriogenology. 43: 1301-1316
- Westendorf, P., Richter, L., Treu, H (1975) Zur Tiefgefrierung von Ebersperma. Labor- und Besamungsergebnisse mit dem Hülsenberger Pailletten-Verfahren Dtsch Tierärztl Wschr. 82:261-267
- Wojtusik, J., Wang, Y., Pukazhenth, B.S (2018) Pretreatment with cholesterol-loaded cyclodextrins prevents loss of motility associated proteins during cryopreservation of addra gazelle (*Nanger dama ruficollis*) spermatozoa. Cryobiology. 81:74-80.
- Yadav, H.P., Kumar, A., Shah, N., Chauhan, D.S., Saxena, A., Yadav, S., Swain D.K (2017) Effect of cholesterol loaded cyclodextrin supplementation on tyrosine phosphorylation and apoptosis like changes in frozen thawed Haryana bull spermatozoa. Theriogenology. 96:164-171.
- Yeste, M (2015) Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. Reproduction in Domestic Animals. 50:71-79
- Yeste, M (2016) Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. Theriogenology. 85:47-64.

- Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Bussalleu, E., Bonet, S (2010) The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. *Animal Reproduction Science*. 119 (3–4):265-274.
- Yeste, M., Briz, M., Pinart, E., Sancho, S., Garcia, G.N., Badia, E., Bassols, J., Pruneda, A., Basalleu, E., Casas, I., Bonet, S (2008) Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 days of storage at 15 °C. *Animal reproduction Science*. 109(1-4):236-250.
- Yildiz, C., Yavas, I., Bozkurt, Y., Aksoy, M (2015) Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on cryosurvival and fertility of cryopreserved carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Cryobiology*. 70:190-194.
- Zhang, W., Yi, K., Chen, C., Houa, X., Zhou, X (2012) Application of antioxidants and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 132:123-128.
- Zirkin, B.R., Brown, T.R., Jarow, J.P., Wright, W.W (2011) Chapter 3 - Endocrine and Paracrine Regulation of Mammalian Spermatogenesis, Editor(s): David O. Norris, Kristin H. Lopez, *Hormones and Reproduction of Vertebrates*, Academic Press. 45-57.