

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**



**EFEECTO DE DOSIS DE FLUIDO FOLICULAR PORCINO Y  
TIEMPO DE CONSERVACIÓN SOBRE LA CALIDAD  
ESPERMÁTICA DE SEMEN PORCINO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA**

**ESTHER SÁNCHEZ VILLALBA**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Ph. D. LEONEL AVENDAÑO REYES**

**MEXICALI, B.C.**

**NOVIEMBRE DEL 2011**

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Sistemas de Producción Animal**

Consejo Particular

---

Ph. D. Leonel Avendaño Reyes

Director de tesis

---

Ph. D. Abelardo Correa Calderón

Sinodal

---

Dr. Ulises Macías Cruz

Sinodal

---

M. C. Daniel Álvarez Valenzuela

Sinodal

**“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”**

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mi maestría y estancia en el extranjero.

Al Ph. D. Leonel Avendaño por ser mi asesor y tutor, por darme la oportunidad de aprender nuevas técnicas de reproducción, conocer nuevas culturas. Que me han enriquecido como profesionista y ser humano.

Sin duda alguna al Dr. Sergi Bonet, por recibirme 9 meses en TechnoSperm (grupo de investigación en reproducción animal perteneciente a la Universidad de Girona, España) y por haberme integrado a su grupo.

También le agradezco al grupo de TechnoSperm; Al Dr. Marc Yeste, a las doctoras; Mailo Briz, Elisabeth Pinart, Silvia Sancho, Eva Bussalleu, Eva María Flores, Marta Puigmulé y a sus estudiantes de doctorado; Eva Torner, Míriam Castillo, Estela García, Lílían Sepúlveda e Ingrid Vilagran. A todos les agradezco por facilitarme la estancia y obsequiarme su apoyo en el momento adecuado.

Pero de una manera muy especial a la Dra. Isabel Casas por haberme brindado su ayuda siempre, por compartir sus conocimientos científicos y empíricos, por su amistad y por ser partícipe de este trabajo que hoy presento. No tengo como agradecerle, *Merci per tot noia!!!*

A la Dra. Anna Fàbrega por sus chistes, no te creas. Por tu ayuda infinita en el laboratorio, tus clases de catalán, tus regaños con sutileza, pero sobre todo tú amistad

*maca. Visca Catalunya!!!*

Al Dr. Miguel Barrera por su infinita ayuda, los 365 días del año durante toda mi maestría hasta la fecha. Eres una gran persona a la cual admiro, aprecio y quiero

mucho.

A mis maestros particulares en ciencias, Isabel Castro y Carlos Raúl Rivera por sus palabras de aliento, amistad y su ayuda en este trabajo.

A mis sinodales y profesores, Ph. D. Abelardo Correa, Dr. Ulises Macías y M.C. Daniel Álvarez. Gracias, por sus opiniones y sugerencias en el presente trabajo.

Finalmente a todos mis compañeros, pero sobre todo a mis amigos de posgrado que estuvieron conmigo antes de que ingresara a él y que hasta la fecha siguen siendo parte de mi familia elegida. *Los quiero!!!*

**“La gratitud es la memoria del corazón”**

***Jean Baptiste Massieu***

***(1772-1846)***

## DEDICATORIAS

*A Dios, a mis padres y a mi hermano.  
Porque los amo y son parte fundamental de  
mi vida.*

## CONTENIDO

<b>LISTA DE CUADROS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xii
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	3
2.1. Colección de semen	3
2.2. Análisis de calidad espermática	3
2.2.1. <i>Morfología espermática</i>	4
2.2.2. <i>Motilidad espermática</i>	6
2.2.3. <i>Reacción acrosomal</i>	8
2.2.4. <i>Integridad de la membrana espermática</i>	9
2.3. Diluyentes	10
2.4. Inseminación artificial	11
2.5. Transporte y fecundación de espermatozoides	12
2.6. Mejoramiento de dosis seminales y calidad espermática	15
2.7. Fluido folicular	15
2.7.1. <i>Efecto de fluido folicular sobre los espermatozoides</i>	16
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
3.1. Obtención de semen, dilución y preparación de dosis	17
3.2. Obtención de fluido folicular	18
3.2.1. <i>Recolección y transporte de ovarios</i>	18

3.3.	Análisis de laboratorio	19
3.3.1.	Colección y adición del fluido folicular a dosis refrigeradas de semen	19
3.3.2.	<i>Motilidad y calidad de movimiento espermático</i>	20
3.3.3.	<i>Reacción acrosomal</i>	22
3.3.4.	<i>Integridad de membrana espermática</i>	22
3.4.	Elaboración de diluyentes BTS para espermatozoides porcinos	23
3.5.	Elaboración kit vivos/muertos	24
3.6.	Diseño experimental y análisis estadístico	24
3.6.1.	<i>Variables independientes</i>	25
3.6.2.	<i>Variables de respuesta</i>	25
3.6.3.	<i>Modelo estadístico</i>	26
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	28
4.1.	Hiperactivación espermática	28
4.2.	Motilidad espermática	30
4.3.	Velocidad espermática	31
4.4.	Integridad de la membrana espermática	32
4.5.	Reacción acrosomal	32
<b>V.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	33
5.1.	Hiperactivación espermática	34
5.2.	Motilidad y velocidad espermática	36
5.3.	Integridad de membrana espermática	37
5.4.	Reacción acrosomal	38
5.5.	Perspectivas	38

<b>VI.</b>	<b>CUADROS Y GRAFICAS</b>	<b>41</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>53</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>54</b>



## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Descripción de parámetros de motilidad	21
<b>Cuadro 2.</b>	Diluyentes BTS para espermatozoides porcinos	24
<b>Cuadro 3.</b>	Efecto de concentración de FFP y días sobre la motilidad total espermática	47
<b>Cuadro 4.</b>	Efecto de concentración de FFP y días sobre la motilidad progresiva espermática	48
<b>Cuadro 5.</b>	Efecto de concentración de FFP y días sobre la integridad de la membrana espermática	52

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Estructura del espermatozoide	5
<b>Figura 2.</b>	Concentración de líquido folicular en dosis refrigeradas	20
<b>Figura 3.</b>	Relación entre concentración de FFP y velocidad curvilínea espermática	41
<b>Figura 4.</b>	Relación entre la concentración de FFP e índice de linealidad espermática	42
<b>Figura 5.</b>	Relación entre concentración de FFP y amplitud del desplazamiento lateral de cabeza espermática	43
<b>Figura 6.</b>	Relación entre días y velocidad curvilínea espermática	44
<b>Figura 7.</b>	Relación entre días e índice de linealidad espermática	45
<b>Figura 8.</b>	Relación entre días y amplitud del desplazamiento lateral de cabeza espermática	46
<b>Figura 9.</b>	Relación entre concentración de FFP y velocidad promedio de espermatozoides	49
<b>Figura 10.</b>	Relación entre concentración de FFP y velocidad rectilínea de espermatozoides	50
<b>Figura 11.</b>	Relación entre días y velocidad promedio espermática	51

## RESUMEN

Se evaluó *in vitro* el efecto de la adición de concentraciones de fluido folicular porcino (FFP) y de tiempos de conservación (TC) sobre parámetros de calidad espermática en dosis seminales de cerdos. Se utilizaron las dosis 0, 5, 10 y 15% de FFP y los TC 0, 1, 2 y 3 d en un diseño de bloques completos al azar bajo un arreglo factorial. Se analizaron 12 eyaculados procedentes de 12 sementales raza Piétrain y se evaluó la hiperactivación de los espermatozoides, observándose que agregar FFP no hiperactivó a los espermatozoides, por lo que probablemente el FFP actúe como una herramienta para atraer a los espermatozoides al sitio de fertilización. Se encontró que el FFP mantiene la motilidad total espermática al mismo nivel ( $P > 0.05$ ) que una dosis sin FFP, por lo que se puede utilizar como un aditivo para espermatozoides sin alterar su motilidad. Se observó que la motilidad progresiva mejoró ( $P < 0.05$ ) con respecto a las dosis sin FFP. Agregar FFP no solo estimula la motilidad, sino que también aumenta la velocidad de los espermatozoides, de modo que *in vivo* podría facilitar el recorrido de éstos a través del tracto reproductor de la hembra. El FFP no disminuyó ( $P > 0.05$ ) la integridad de la membrana respecto a las dosis sin FFP, por lo que puede ser añadido sin repercusiones para la calidad espermática. Además, al día 3 se observó, en el grupo testigo, un descenso ( $P < 0.05$ ) en la integridad de membrana con respecto a los tratamientos con FFP. No se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) en la reacción acrosomal entre tratamientos, observando más del 90% de los espermatozoides con un acrosoma intacto. Se concluye que el FFP ayuda a mantener la viabilidad espermática mejorando la función del espermatozoide. Adicionar 15% de FFP a dosis refrigeradas de cerdo podría beneficiar la inseminación artificial, puesto que favorecería el acceso de un mayor número de espermatozoides competentes al lugar de la fertilización.

## ABSTRACT

The effect of adding porcine follicular fluid (PFF) concentrations at different storage times (ST) on sperm quality parameters in boar semen doses was evaluated *in vitro*. Doses were 0, 5, 10 and 15% of PFF and ST were 0, 1, 2 and 3 d, and were used in a randomized block design with a factorial arrangement. There were 12 ejaculates from 12 boars breed Pietrain and the variables evaluated were the spermatozoa hyperactivity, observing that PFF did not hyperactivate sperm, so probably the PFF acts as a tool to attract the sperm to the fertilization site. Also, the PFF maintained the total sperm motility at the same level ( $P>0.05$ ) that a dose without PFF, so it can be used as an additive without altering its motility. It was observed that progressive motility improved ( $P<0.05$ ) with respect to the doses without PFF. Addition of PFF not only stimulated motility, but also increased the velocity of sperm, so *in vivo* it could facilitate their course through the female reproductive tract. The PFF did not decrease ( $P>0.05$ ) the integrity of the membrane with respect to the doses without PFF, so it can be added without repercussions on sperm quality. Besides, there was a decrease ( $P<0.05$ ) in membrane integrity in the control group compared to treated groups on day 3. There were not differences ( $P>0.05$ ) in the acrosome reaction between treatments, observing more than 90% of the sperm with an intact acrosome. In conclusion, FFP helped to maintain sperm viability improving spermatozoa function. Addition of 15% of FFP to refrigerated doses of boars could benefit the artificial insemination because of improvement of the access to a higher number of competent spermatozoa to the fertilization site.

## I. INTRODUCCIÓN

La inseminación artificial (IA) es cada vez más utilizada en granjas porcinas (Johnson et al., 2000; Vázquez et al., 2005). El problema de la IA son las pruebas de calidad espermática que hoy se ofrecen, están muy limitadas (Waberski et al., 2011) e identifican solo infertilidad muy marcada (Coy et al., 2010). Por consecuencia, las pruebas están pobremente correlacionadas con la fertilidad (Gadea, 2005) y no permiten identificar animales subfértiles ni dosis de mala calidad con suficiente exactitud (Waberski et al., 2011).

Actualmente se sabe que la edad, la estación del año, el manejo, el estado nutricional y la presencia de enfermedades demeritan la calidad espermática (González-Urdiales et al., 2006). Por lo mismo, muchos estudios se han realizado para identificar la fertilidad de los sementales antes de la IA; pero ninguno ha sido consistente (Braundmeier et al., 2004) debido a la complejidad del proceso (Gadea, 2005). Sin duda alguna, cuando se logren establecer todos los parámetros ideales de los espermatozoides para fecundar, la eficiencia en el uso de la IA incrementará y con ello, el impacto económico en granjas donde se utilice la IA (Coy et al., 2010).

Hasta ahora se conoce que la clave de la fertilización es la capacitación de los espermatozoides (Pentrunkina et al., 2003), y en las últimas décadas se han realizado con éxito nuevas pruebas en sistemas de fecundación *in vitro* para evaluar la capacitación de los espermatozoides para fecundar (Gadea, 2005; Coy et al., 2010). Uno de estos estudios fue realizado por Waberski et al. (2005), quienes identificaron la subfertilidad en cerdos diagnosticando la capacidad que tienen los espermatozoides para unirse a las células en el oviducto.

Hasta el momento estos análisis son caros, lentos y están lejos de utilizarse en granjas comerciales (Gadea, 2005). Pentrunkina et al. (2003) señalan que el problema comenzó con la creación de métodos fáciles y rápidos para identificar espermatozoides de mala calidad. Mientras se establecen protocolos fijos para evaluarla, es importante seguir intentando mejorar la calidad espermática de los sementales. Con base en los conocimientos que hasta hoy se tienen, una herramienta es el uso de diluyentes para mejorar las dosis seminales de porcinos. Otra herramienta es la utilización de sustancias físicas y químicas que son utilizadas como aditivos para mejorar la fertilidad del macho en diferentes mamíferos (Kmenta et al., 2011; Michael et al., 2009; Perumal et al., 2010; Martín-Hidalgo et al., 2011). También algunos autores mencionan la importancia del fluido folicular (FF) para una correcta fertilización (Tacconis et al., 2001). Por tal motivo, el efecto que ejerce el FF sobre los espermatozoides podría ser utilizado en porcinos para mejorar la fertilidad de dosis seminales destinadas a la IA. Sin embargo, el FF ha recibido escasa atención por parte de los investigadores en los últimos años (Raymond et al., 2010), por lo que los mecanismos moleculares no se conocen con certeza y los hallazgos aún se encuentran en discusión (Eisenbach, 1999; Ralt et al., 1994).

Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el efecto de diferentes concentraciones (0, 5, 10 y 15%) de fluido folicular porcino a diferentes tiempos de conservación (0, 1, 2 y 3 días) sobre parámetros de calidad espermática en dosis comerciales de semen en cerdos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

Un programa de inseminación artificial se puede dividir en: 1) Colección de semen, 2) Análisis de calidad espermática, y 3) Diluyentes (Estienne, 2009):

### 2.1. Colección de semen

La colección de semen debe realizarse una vez por semana como mínimo, ya sea que se requiera el eyaculado o no para la IA con el único fin de mantener la calidad espermática y la libido del semental (Glossop, 1996).

Una vez en el área de colecta se cuenta con un maniquí o potro (simulador de la hembra) al cual el semental, al sentirse estimulado, será capaz de montar. Posteriormente, al desenvainar el pene, se sujetará el glande con la mano, se hará presión en forma gradual y se sostendrá hasta que el semental eyacule. Eyaculando, se deben tirar los primeros chorros de semen (a criterio del operador). Por último, se dirige el pene hacia el termo colector de semen a fin de recolectar la fracción más rica de éste. La colección de cada uno de los sementales puede durar entre 5 y 20 minutos (PIC, 1994; Frandson y Spurgeon, 1995). Finalmente se prosigue a analizar la calidad espermática del semental en laboratorio.

### 2.2. Análisis de calidad espermática

El objetivo de analizar la calidad seminal es para predecir si un eyaculado es potencialmente fértil o no (Colenbrander y Kemp, 1990; Rajasingam, 2003). El análisis

e interpretación adecuada son imprescindibles en las técnicas de reproducción asistida (Rajasingam, 2003). También se debe de reconocer que a pesar de una serie de estudios realizados sobre la evaluación de espermatozoides, todavía no se han encontrado todos los parámetros exactos que se asocien con la fertilidad real (Colenbrander y Kemp, 1990; Rajasingam, 2003), y no sólo para distinguir animales fértiles, sino también subfértiles (Gadea, 1997; Gadea et al., 2004; Petrunkina et al., 2007).

Existe la necesidad de continuar creando pruebas que permitan seguir identificando células defectuosas o anormales que impidan tener a los espermatozoides una buena fertilización, ya que los espermatozoides son células complejas que pueden convertirse fácilmente en infértiles. Asimismo, otras pueden ser sensibles bioquímica, fisiológica o morfológicamente, y solo diseñando nuevos métodos se podrá garantizar el mayor número de células de calidad (Colenbrander y Kemp, 1990; Rajasingam, 2003). Por otro lado, las evaluaciones que actualmente se ofrecen, indican una razonable evaluación de la calidad del eyaculado (Colenbrander y Kemp, 1990).

### *2.2.1. Morfología espermática*

La morfología es una prueba importante para la fertilidad, ya que puede ayudar a detectar alteraciones en la espermatogénesis y en la maduración epididimaria. Esto puede resultar útil en la eliminación de reproductores machos con baja calidad seminal cuando estas anomalías rebasen los niveles normales (Gonzales-Urdiales et al., 2006). Los espermatozoides normales maduros poseen una longitud de 45  $\mu\text{m}$ . En ellos se



distinguen tres partes principales: la cabeza de forma oval en la que se diferencia el acrosoma y el núcleo (7  $\mu\text{m}$ ), la pieza de conexión o cuello (0.7  $\mu\text{m}$ ) y el flagelo o cola (37  $\mu\text{m}$ ), dividida en 3 regiones: segmento intermedio o mitocondrial, pieza principal y pieza terminal, como se observa en la Figura 1 (Sansegundo, 2008; Bonet et al., 2000).

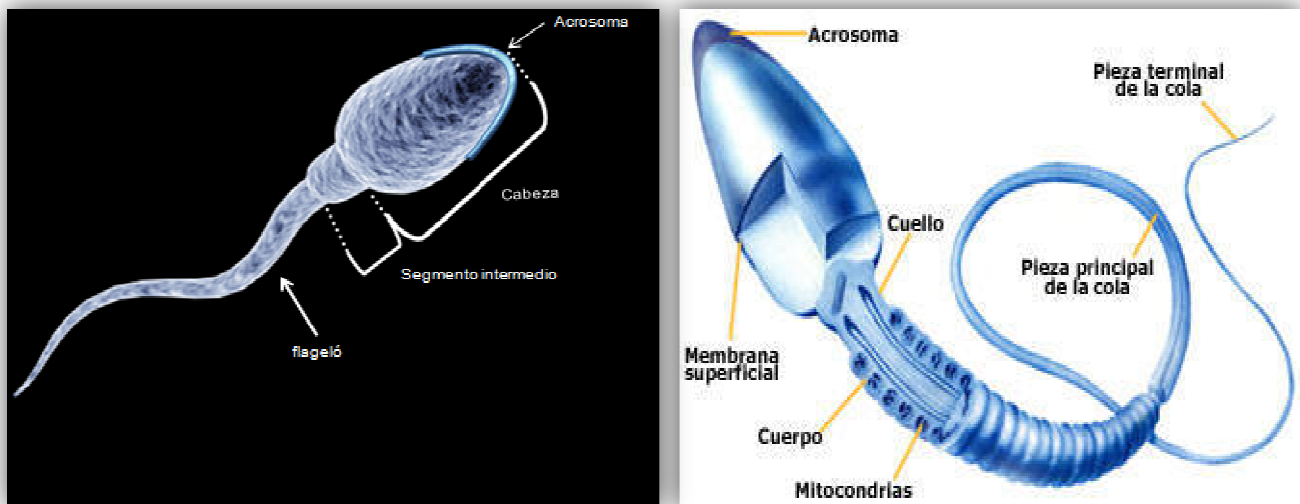


Figura 1. Estructura del espermatozoide (Sansegundo, 2008).

El núcleo del espermatozoide ocupa prácticamente la totalidad de la cabeza y difiere del resto de las células del organismo tanto en cantidad de DNA como en la composición de las nucleoproteínas (Sansegundo, 2008). La cabeza posee un acrosoma que es una vesícula en forma de capuchón que cubre el 80% de la longitud nuclear. Esta parte de la cabeza que contiene el acrosoma es conocida como la región acrosómica y posee material amorfo distribuido homogéneamente (Bonet et al., 2000).

Los espermatozoides anormales pueden presentar malformaciones de diferentes tipos (Varner, 2008; Gadea, 1997; Gonzales-Urdiales et al., 2006), tales como:

1. Anomalías espermáticas primarias, que se consideran mal formaciones durante la espermatogénesis. Por lo tanto, son de origen testicular y genético (las anomalías no son precisamente específicas).
2. Anomalías espermáticas secundarias, que son malformaciones creadas en el epidídimo. Se distinguen por poseer cola enrollada en la parte distal o cola enrollada completamente, cabezas sin cola y colas de látigo.
3. Anomalías espermáticas terciarias, se presentan por una mala manipulación en el laboratorio debido alteraciones de osmolaridad o cambios de temperatura bruscos. También se pueden encontrar colas de látigo y cabezas sin cola. Esta última por ejercer presión sobre una muestra en portaobjetos.

### *2.2.2. Motilidad espermática*

Otro parámetro es la motilidad del espermatozoide, el cual es un parámetro de los más utilizados para evaluar la calidad espermática. La motilidad espermática es importante porque el espermatozoide es una célula muy móvil e hidrodinámica que le confiere la capacidad de desplazarse a una velocidad determinada para llevar a cabo la fecundación (Schmidt y Kamp, 2005). Su movimiento de flagelo es característico y adquiere la capacidad de movimiento durante el tránsito por el epidídimo. Sin embargo, el movimiento real comienza después de la eyaculación, proceso conocido como activación del esperma (Turner, 2006; Fradson y Spurgeon, 1995), y el cual consiste en un bateo simétrico con la cola que hace que el espermatozoide se desplace

progresivamente sobre un medio acuoso (Olivera et al., 2006; Schmidt y Kamp, 2005). Esta actividad se logra gracias a las mitocondrias que se encuentran colocadas estratégicamente y que aportan la energía necesaria para el movimiento del flagelo (Schmidt y Kamp, 2005). Existen varias formas para evaluar la motilidad, siendo la más utilizada en centros de IA comercial la valoración visual por medio de microscopia óptica. Sin embargo, este método es muy subjetivo, ya que consiste en valorar el movimiento espermático masal de 0 a 100% y la calidad espermática de 0 al 5.

Otra manera más precisa, exacta y mayormente utilizada en centros de investigación, es el programa CASA (Computerized-assisted sperm analysis), el cual permite evaluar a los espermatozoides mediante un análisis de imágenes convencionales o reencuentro de partículas (Tejerina et al., 2008). El programa CASA permite obtener mediciones cinéticas exactas y objetivas de subpoblaciones espermáticas con un cierto grado de sofisticación. La trayectoria de movimiento de los espermatozoides es individual en parámetros cinéticos y viene reconstruida a partir del movimiento de cabeza, aunque ésta en realidad sea por el movimiento del flagelo de los espermatozoides (Sansegundo, 2008; Mortimer, 1997).

Por otra parte, los espermatozoides no solo se mueven, sino que también expresan diferentes patrones de movimiento que muchas veces no pueden ser evaluados en centros de IA debido a su alto costo y/o tiempo que requiere su evaluación (Gonzales-Urdiales et al., 2006). Sin embargo, estos patrones reflejan fielmente el estado fisiológico de la célula (Sansegundo, 2008; Aitken, 2006). Como por ejemplo, la hiperactivación, proceso considerado como un patrón de movimiento observado justo en el momento de la ovulación, en la cual, el espermatozoide se

distingue por cambiar sus pequeños movimientos simétricos por latigazos irregulares y rápidos (Ho y Suarez, 2001; Chang y Suarez, 2010). Este proceso puede ser evaluado por el sistema CASA, el cual establece que para considerar a los espermatozoides como hiperactivos deben poseer una velocidad curvilínea  $>97 \mu\text{m}/\text{seg}$ , una amplitud media del desplazamiento de cabeza  $>3.5 \mu\text{m}/\text{seg}$ , y un índice de linealidad  $<32\%$  (Schmidt y Kamp, 2004).

### *2.2.3. Reacción acrosomal espermática*

El acrosoma juega un papel relevante en la fecundación, por lo que hacer una valoración específica del mismo es necesario. En la cabeza de los espermatozoides de muchos mamíferos existe una vesícula secretora muy especializada llamada vesícula acrosómica, que forma una especie de gorro. Esta vesícula tiene enzimas hidrolíticas que ayudan a atravesar la envoltura externa del ovocito. Cuando un espermatozoide entra en contacto con un ovocito, el contenido de la vesícula se libera por exocitosis, lo cual se conoce como reacción acrosomal. En algunos espermatozoides esta reacción también libera proteínas que colaboran específicamente en la unión del espermatozoide con la cubierta del ovocito (Alberts et al., 2002; Harvey et al., 2008). Este proceso depende de los canales de  $\text{Ca}^+$  y se debe completar con el fin de penetrar la zona pelúcida (ZP) y fusionarse con la membrana plasmática del óvulo (Harvey et al., 2008).

#### 2.2.4. *Integridad de la membrana espermática*

Uno de los parámetros más importantes es identificar el buen estado de la membrana del espermatozoide, ya que como en todas las células, se rodean por una membrana que permite, entre otras actividades fisiológicas, el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior, siempre y cuando esté presente una integridad funcional y estructural. La vitalidad espermática hace referencia a la integridad de la membrana plasmática del espermatozoide, ya que la pérdida de permeabilidad selectiva en esta membrana hace que el espermatozoide sea incapaz de mantener las concentraciones de iones y solutos, perdiendo importantes metabolitos y coenzimas, lo que conducirá a la supresión de la motilidad y de todas las funciones vitales.

Unas de las técnicas para evaluar la integridad de la membrana es la tinción fluorescente. Esta técnica está ampliamente difundida, ya que a pesar de requerir un equipamiento más sofisticado, no presenta los inconvenientes clásicos de las tinciones como es la dificultad para diferenciar entre vivos y muertos (Gonzales-Urdiales et al., 2006). Esta técnica consiste en la utilización de fluoró cromos como el SYBR-14, que se intercala en el ADN de todos los espermatozoides emitiendo fluorescencia verde, mientras que el yoduro de propidio (IP) penetra solo en las células que presenten la membrana alterada, intercalándose en su ADN y emitiendo fluorescencia roja (Molecular Probes, 2001).

En conclusión para que un eyaculado sea valorado de buena calidad para el uso de la IA, los espermatozoides deben poseer los siguientes valores (Casas, 2010):

1. Un 80% de morfología normal
2. Una motilidad total del 80%

3. Una progresiva motilidad del 60%
4. Poseer una membrana intacta del 80%
5. Finalmente, poseer un 80% de acrosoma intacto

## 2.2. Diluyentes

Una vez determinada la calidad espermática del semental se prosigue a seleccionar el diluyente más adecuado dependiendo del tipo de manejo que realice la granja. En el caso de que el uso de las dosis refrigeradas sea menor a 3 d, se utilizarán extensores de corta duración. Estos suelen ser más económicos que los de larga duración, los cuales poseen un número mayor de espermatozoides en la dosis para compensar el envejecimiento de éstos (Gadea, 2003). Cualquiera que sea la elección, todo diluyente poseen un mismo objetivo mejorar los parámetros de productividad.

Una de las ventajas más importantes al diluir los eyaculados de los sementales es que cubre mayor número de cerdas y se disemina más rápidamente el material genético, incluso con mejores resultados que la monta natural. El diluyente es una solución acuosa que permite aumentar el volumen de los eyaculados, su función es aportar los nutrientes necesarios para mantener el metabolismo de la célula espermática (Gadea, 2003). Todos los diluyentes están diseñados para lograr mantener la capacidad fertilizante de los espermatozoides a través de fuentes energéticas hasta el momento de la IA (Medrano, 2005).

Los espermatozoides se encuentran en el plasma seminal, el cual les sirve como fuente de nutrición para mantener una elevada actividad metabólica (Gadea, 2003). Sin embargo, esta actividad metabólica se mantiene por muy poco tiempo (Lewis, 1911),

por lo que es necesario conservar los espermatozoides reduciendo su actividad metabólica por medio de una dilución y una reducción en la temperatura (Althouse et al., 1998).

Los espermatozoides de cerdo son muy sensibles a golpes por frío (Pursel et al., 1973) y cuando se les disminuye la temperatura, su viabilidad también decrece por la composición lipídica de sus membranas, ya que los movimientos laterales de los fosfolípidos que componen la membrana disminuyen y se produce la separación de fases lipídicas, situación asociada a alteraciones irreversibles de las proteínas de las membranas (White, 1993). Es por eso que las dosis deben ser conservadas a una temperatura de 15-20 °C y así evitar este golpe en los espermatozoides (Gadea, 2003).

#### 2.4. Inseminación artificial

La inseminación artificial (IA) porcina es una técnica de reproducción asistida y su objetivo es facilitar la unión entre el espermatozoide y el óvulo (Morrell, 2011).

El uso de la IA porcina ha aumentado aproximadamente 3 veces en los últimos años y se estima que actualmente se realizan en todo el mundo 19 millones de inseminaciones en granjas porcinas (Johnson et al., 2000).

Esta técnica consiste en la colocación manual del semen por el tracto reproductor de la hembra, donde es absorbido por medio de contracciones uterinas (Estienne, 2009; Morrell, 2011). Su principal objetivo es trabajar de la manera más higiénica posible y menos traumática para el animal (Colenbrander et al., 1999).

La IA se practica con un semental que se coloca enfrente de la hembra en celo (tratando que sea el contacto nariz con nariz). El semental así provocará la inmovilidad de la cerda, desencadenando el inicio de las contracciones uterinas (Estienne, 2009).

Actualmente, la IA permite disminuir el número de sementales en granja, ya que un semental puede ser capaz de cubrir de 20 a 25 cerdas con un eyaculado (Lesur, 2007). Asimismo, con el uso de esta técnica es posible promover el mejoramiento genético al utilizar sementales de alto valor genético para las características de interés en la granja (Hafez y Hafez, 2002).

Por último, no hay que olvidar que un semental aporta la mitad de sus genes, por lo tanto, influirá en un 50% en la producción de la granja, convirtiéndose en uno de los individuos más reveladores del hato (Hafez y Hafez, 2002).

## 2.5. Transporte y fecundación de espermatozoides

Durante la eyaculación, miles e incluso millones de espermatozoides rápidamente se activan cuando son liberados en el tracto reproductor de la hembra (Turner, 2006; Fradson y Spurgeon, 1995). El espermatozoide en esta etapa se caracteriza por su baja amplitud y motilidad progresiva. A pesar del gran número de espermatozoides, esto no es garantía de fertilización (Chang y Suárez, 2010). Al realizar la IA intra-cervical, los espermatozoides se dirigen a la unión útero-tubal (Olivera et al., 2006), que se encuentra dividido en 3 segmentos: Istmo, ámpula e infundíbulo (Rodríguez-Martínez, 2007). El istmo funciona como reservorio donde los espermatozoides se vuelven inactivos temporalmente (Suarez, 2002).



Antes de la ovulación (en monta natural o la IA), los espermatozoides serán liberados gradualmente (Warberski et al., 2005; Coy et al., 2010). A medida que se acerque la ovulación, la liberación de los grupos de espermatozoides se hará más continua y de igual manera la capacitación de los espermatozoides (Rodríguez – Martínez, 2007). Las células epiteliales del oviducto seleccionarán y secuestrarán espermatozoides de alta calidad, asegurando que éstos sean viables y fértiles para el momento que se encuentren con los ovocitos dentro del ámpula (Rodríguez – Martínez, 2007; Warberski et al., 2005; Coy et al., 2010).

Otra función del oviducto es capacitar a los espermatozoides para garantizar el éxito de la fecundación (Petrunkina et al., 2003). La capacitación se define como las modificaciones funcionales que tiene el espermatozoide para fecundar (Bailey, 2010) o más bien a la capacidad que tienen los espermatozoides para unirse a la zona pelúcida (ZP), someterse a hiperactivación, reacción acrosomal y la capacidad de fusionarse con el óvulo (Bailey, 2010; Harvey et al., 2008; Chang y Suarez 2010).

La capacitación es muy similar para todos los espermatozoides, sin embargo, la capacidad y la velocidad de respuesta varía entre espermatozoides. Tal diversidad en la capacitación de respuesta asegura la viabilidad espermática por completo. La capacitación de los espermatozoides en diferentes momentos maximiza las posibilidades de fecundar (Rodríguez – Martínez, 2007).

También se sabe que sólo los mejores espermatozoides se capacitarán y se someterán a la hiperactivación, aunque este tema ha sido discutido desde hace 25 años (Kay y Robertson, 1998), es un proceso complejo pero fundamental para la fertilización *in vivo* (Kay y Robertson ,1998; Ho y Suárez, 2001). El espermatozoide se

caracteriza por su gran amplitud asimétrica en el flagelo. Actualmente, la señal de la hiperactivación aún no ha sido identificada, sin embargo, el  $\text{Ca}^{+}$  es un elemento importante en la vía de señalización para la flexión simétrica por la cual el espermatozoide se caracteriza (Chang y Suárez, 2010; Ho y Suárez, 2001). Este proceso es, biológicamente, un patrón de la motilidad en el oviducto y se realiza distantes antes de que el espermatozoide llegue al cúmulo-ooocito. La hiperactivación ayuda a los espermatozoides a salir de la unión útero-tubal, fenómeno que se observa exactamente en el momento de la fertilización (Ho y Suárez, 2001; Ho et al., 2002; Chang y Suárez, 2010), Schmidt y Kamp (2005) aseguran que las mitocondrias le proporcionan la energía necesaria a los espermatozoides para desencadenar este patrón de movimiento.

En condición *in vitro*, si los espermatozoides se colocan en un porta objetos, se observará que nadan en forma circular (Ho et al., 2002; Chang y Suárez, 2010). Este proceso es indispensable para la fertilización, ya que mejora la capacidad de los espermatozoides para liberarse del oviducto, penetrar a las sustancias mucosas y finalmente llegar a la ZP del ovocito (Ho y Suárez, 2001) (Olivera et al., 2006). Posteriormente se lleva a cabo la reacción acrosomal, donde el espermatozoide se distingue por llevar en la cabeza anterior varias vesículas secretoras que va a liberar durante la primera etapa de interacción con el óvulo a través de un proceso de exocitosis en el cual este debe penetrar la ZP del óvulo y fusionarse, regulando y coordinando la disponibilidad de los ovocitos (Harvey et al., 2008).

## 2.6. Mejoramiento de dosis seminales y calidad espermática

Actualmente las dosis refrigeradas de semen porcino para la IA, son las más utilizadas en granjas porcinas. Aún así, varios estudios demuestran que esta técnica tiene baja eficiencia en cuanto a fertilidad (Colenbrander et al., 2003; Christensen et al., 2004; Vázquez et al., 2005). Por esta razón, el mejoramiento de dosis refrigeradas de semen y la calidad espermática tiene un amplio campo en la investigación cuando los sementales presentan una pobre calidad de semen (Yeste, 2008).

Varios autores han trabajado con diferentes sustancias o moléculas que han sido utilizadas como aditivos en dosis seminales, como las prostaglandinas, ácido hialurónico y cafeína, las cuales han modificado positivamente al espermatozoide (Yeste et al., 2008<sup>a</sup>; Yeste et al., 2008<sup>b</sup>; Román et al., 2007). Se ha observado que el fluido folicular porcino tiene una fuerte relación con los espermatozoides, ayudando a mejorar su velocidad y consecutivamente la fertilidad (Fahiminiya y Gerard, 2010; Giorgetti et al., 1992).

## 2.7. Fluido folicular

El fluido folicular (FF) es un complejo extracelular, semi-viscoso y de color amarillo, que durante la fase de crecimiento de los folículos se va acumulando en el antro (Fahiminiya y Gerard, 2010). El fluido folicular proporciona un microclima dentro de los cúmulos y el ovocito maduro. La composición del FF es diferente para cada folículo y depende de su metabolismo; éste a su vez proporciona un ambiente propicio

para el crecimiento y la diferenciación de las células foliculares en el área de maduración del ovocito (Fahiminiya y Gerard, 2010).

El FF se compone bioquímicamente de aminoácidos, enzimas, carbohidratos, glicoproteínas, gonadotropinas, esteroides, prostaglandinas, minerales, sales, inmunoglobulinas y otras proteínas como la albúmina, fibrinógeno, lipoproteínas y péptidos (Ducolomb, 2004).

### *2.7.1. Efecto de fluido folicular sobre los espermatozoides*

En humanos, el FF es capaz de modificar la función del espermatozoide en condiciones *in vitro* y se ha encontrado que estimula la motilidad, aumenta el porcentaje de espermatozoides hiperactivos, la reacción acrosomal e induce a los espermatozoides al sitio de fertilización, facilitando la penetración de los ovocitos por parte de los espermatozoides. Es posible que el FF proporcione un ambiente favorable para fertilizar el ovocito. Este fluido también puede mejorar la tasa de éxito de la reproducción asistida (Hong et al., 1993; Fahiminiya y Gerard, 2010) Los componentes individuales del FF que mejoran la funcionalidad del espermatozoides aun no se conocen y se esperan más análisis al respecto (Hong et al., 1993).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para realizar este estudio se utilizaron 12 eyaculados procedentes de 12 sementales raza Piétrain, con edad promedio de 18 meses y pertenecientes a un centro de inseminación artificial de la empresa Cardona, en Girona, España. Los animales fueron alojados en corrales individuales bajo condiciones de bioseguridad sanitaria, se alimentaron con una dieta comercial y su consumo promedio diario fue de 3 Kg, mientras que el agua fue ofrecida *ad libitum*. El desarrollo experimental que se describe a continuación es sobre un mismo eyaculado en el cual se realizaron mediciones clásicas de espermiograma, pruebas bioquímicas y ensayos de funcionalidad espermática para valorar *in vitro* el efecto del fluido folicular a diferentes concentraciones y a diferentes tiempos sobre dosis refrigeradas.

#### 3.1. Obtención de semen, dilución y preparación de dosis

Las muestras de semen fueron colectadas durante el mes de febrero; de cada colecta (o eyaculado) se elaboraron dosis comerciales a partir del semen de cada semental. Una dosis comercial de semen se tomaba al azar de cada uno de los 12 sementales para realizar el experimento.

Cada día de la colección de semen los animales eran conducidos desde los corrales individuales a la sala de colección; una vez en la sala se prosiguió a evacuar la orina del semental que se encontraba almacenada en el prepucio (para evitar la contaminación de la muestra). La extracción de semen fue manual, utilizando la técnica de mano enguantada con la ayuda de un maniquí (simulador de la hembra), que

voluntariamente montaba el semental al estar excitado. Una vez finalizado el proceso de colección, el eyaculado se llevaba al laboratorio para determinar el volumen como primer análisis macroscópico. Y posteriormente se depositaba en baño maría a una temperatura de 37°C. Una muestra se tomaba del eyaculado para observar la motilidad y la calidad del movimiento de los espermatozoides usando un microscopio de contraste de fase 10x y fase negativa. Las anomalías eran observadas mediante fase 40x y fase positiva. La concentración espermática se calculó por medio de un espectrofotómetro, estimando así el número total de espermatozoides del eyaculado. Finalmente se elaboraron dosis de semen con una concentración espermática  $3 \times 10^9$  células por dosis en un volumen de 80 ml de diluyente comercial. Cada inicio de semana se transportaban al laboratorio de TechnoSperm (grupo de investigación en reproducción animal perteneciente a la Universidad de Girona), cuatro dosis frescas de diferentes machos a una temperatura de 17°C y se colocaban en nevera a la misma temperatura en espera de ser utilizadas.

### 3.2. Obtención de fluido folicular

#### 3.2.1. *Recolección y transporte de ovarios*

Los ovarios fueron recolectados de hembras prepúberes de 90-100 kg de peso, sacrificadas 30 min antes en un rastro de Girona, España. El transporte hacia el laboratorio se realizó en un termo de  $\frac{3}{4}$  de litro isotérmico con una solución salina (SS) con 0.1 g/l de kanamicina y a 38°C, en un plazo máximo de 2 h desde el sacrificio de los animales. Una vez en el laboratorio, los ovarios se lavaron con SS. Se

seleccionaron los mejores ovarios con desarrollo folicular de 2-6 mm de radio y se excluyeron aquellos que presentaban cuerpos lúteos, formaciones quísticas o una morfología anormal. Los ovarios seleccionados se mantuvieron dentro de un vaso de precipitado con SS en baño maría a 38.5°C.

### 3.3. Análisis de laboratorio

#### 3.3.1. *Colección de fluido folicular y su adición a dosis refrigeradas de semen.*

Se recolectó el fluido folicular mediante sección del ovario con una aguja 18 G, utilizando el método de aspiración por gravedad, el cual consiste en realizar dos pequeños orificios en la parte exterior de la jeringa, uno a la altura de 2 ml y otro a los 8 ó 10 ml y colocar el émbolo entre estos dos, creando así el vacío. El contenido folicular fue recolectado en vaso de precipitado a 38.5°C de temperatura. Posteriormente se centrifugó el fluido folicular a 1900 g a 5°C por 30 min retirando el pellet, se filtró el fluido folicular y se elaboraron alícuotas de 2 ml que fueron congeladas a -20°C para posteriormente ser utilizadas.

Para adicionar el fluido folicular al semen refrigerado, una dosis refrigerada se colocó completa en un frasco de laboratorio y se prosiguió a mezclarla (en forma lenta y cuidadosa) para dispersar los espermatozoides de manera uniforme y, una vez terminado esto, inmediatamente se retiraron 10,000 µl del frasco y se colocaron en un falcón de 14 ml. Posteriormente, del congelador se seleccionaron 2 alícuotas de 2 ml de fluido folicular y se dejaron descongelar para ser añadidos a los falcons como a continuación se muestra:

1. Testigo, 10000  $\mu$ l de dosis refrigerada.
2. 520  $\mu$ l de fluido folicular (5%) /10000  $\mu$ l de dosis refrigerada.
3. 1110  $\mu$ l de fluido folicular (10%) /10000  $\mu$ l de dosis refrigerada.
4. 1760  $\mu$ l de fluido folicular (15%) /10000  $\mu$ l de dosis refrigerada.

Finalmente se etiquetaron los falcons de acuerdo con su tratamiento. Esto se hizo para cada dosis refrigerada que se utilizó en el experimento. Por último, los falcons fueron almacenados a una temperatura de  $-17^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso (Figura 2).

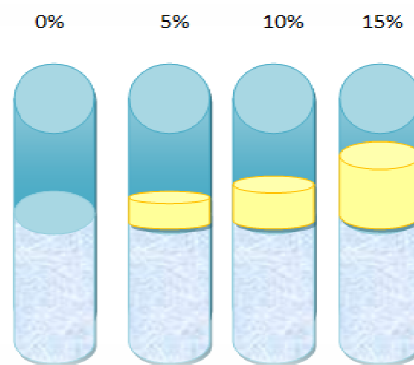


Figura. 2 Concentración de líquido folicular en dosis refrigeradas

Una vez elaborados los tratamientos, se prosiguió a evaluar la calidad espermática con los métodos descritos a continuación.

### 3.3.2. *Motilidad y calidad de movimiento espermático*

La observación de la motilidad se realizó de la siguiente manera:

1. De los 4 tratamientos se tomaron 4 muestras de 500  $\mu$ l y cada una se colocó en eppendorfs de 1.5 ml.



2. Se calentaron las muestras a 37°C por 10 min.
3. Se tomaron 20 µl de cada muestra de 500 µl, colocándose en una cámara de Makler® previamente a temperatura a 37°C.
4. La cámara era colocada sobre la platina del microscopio a 37°C y rápidamente se observaba la motilidad bajo el microscopio de contraste de fases 10x y fase negativa.
5. Se evaluaron 1000 espermatozoides usando el programa de análisis de imagen Sperm Class Analyzer 2010 (CASA).
6. La descripción de los parámetros de motilidad identificados por el sistema CASA se define a continuación en el cuadro 1.

Cuadro 1. Descripción de parámetros de motilidad (Sansegundo, 2008 ; Coy et al., 2010).

Parámetros	Unidades	Definición
Motilidad total (MOT)	%	Porcentaje estimado de espermatozoides que presentan algún tipo de movimiento.
Motilidad progresiva (MOT PROG)	%	Porcentaje de espermatozoides motiles que presentan algún tipo de movimiento.
Velocidad Curvilínea (VCL)	µm/seg	Velocidad progresiva a lo largo de todo el trayecto en función del tiempo.
Promedio de Velocidad (VAP)	µm/ seg	Velocidad progresiva a lo largo de su trayectoria promedio en función del tiempo.
Velocidad de línea recta (VSL)	µm/ seg	Distancia recorrida por el espermatozoide en el primer punto y el último de su trayectoria en función del tiempo.
Linealidad (LIN)	%	$VSL/VCL * 100$
Frecuencia de batida (BCF)	Hz	Frecuencia con la cual la trayectoria curvilínea atraviesa la línea en función del tiempo.
Desplazamiento de amplitud de cabeza lateral (ALH)	Mm	Máximo desplazamiento efectuado por la cabeza del espermatozoide en su trayectoria curvilínea de un lado de la trayectoria media o lineal.

### 3.3.3. *Reacción acrosomal*

La observación de la reacción acrosomal (RA) se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomaron tres gotas de 15  $\mu$ l de cada tratamiento, se colocaron en portaobjetos y se cubrieron.
2. Se observó la RA en microscopio de contraste de fases a 40x y fase positiva y los espermatozoides se clasificaron en dos categorías, con RA y sin RA.
3. Se contaron por lo menos 200 espermatozoides por muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides reaccionados.

### 3.3.4. *Integridad de membrana espermática*

La observación de la integridad de la membrana se realizó de la siguiente manera:

1. De los 4 tratamientos se tomaron muestras de 250  $\mu$ l de cada uno, las cuales fueron depositadas en eppendorfs de 1.5 ml y diluidas a  $1 \times 10^6$  spz/ ml en BTS, elaborando así alícuotas de 500  $\mu$ l para cada tratamiento.
2. Se tomó 0.5  $\mu$ l de SYBR-14 de la dilución madre 1/10 en DMSO (solución madre) del kit vivos/muertos (L-1011).
3. Se incubaron las muestras por 10 min a 37°C.
4. Se tomó de solución madre 2.5  $\mu$ l de yoduro de propidio (PI) y se agregó a cada eppendorf.
5. Se incubaron las muestras por 5 min a 37°C.

6. Una vez concluido el tiempo se procedió a la valoración microscópica: Se depositaron 3 gotas de 15  $\mu$ l de la suspensión sobre un portaobjetos y se valoró la muestra en un microscopio de fluorescencia (Leica DMR) a 400 aumentos (40x). Como se mencionó anteriormente, los espermatozoides se clasificaron en dos categorías, aquellos que emitían fluorescencia de color verde (funcionales) y los que emitían fluorescencia roja por la entrada en la célula de IP (membrana dañada).
7. Se contaron por lo menos 300 espermatozoides por muestra para determinar el porcentaje de espermatozoides funcionales.

A continuación se detalla la forma en que se elaboraron los reactivos para la evaluación de integridad de membrana por medio de microscopía de fluorescencia.

#### 3.4. Elaboración de diluyente BTS para espermatozoides porcinos

1. Se colocaron los siguientes ingredientes en un frasco (Cuadro 2) para diluir la dosis comercial a la concentración deseada.
2. Se agitó para disolver todos los ingredientes y fue colocada la solución en refrigerador a 4°C hasta su uso (máximo 1 semana).

## Cuadro 2. Diluyente BTS para espermatozoides porcinos.

Composición	Medidas gr/litro
Agua mili Q (agua bidestilada)	1 litro
Glucosa	36.94 gr
Citrato de sodio	5.99 gr
Bicarbonato sódico	1.26 gr
EDTA	1.25 gr
Cloruro de potasio	0.75 gr
Kanamicina	0.05 gr

### 3.5. Elaboración kit vivos/muertos

La preparación de los reactivos para la evaluación de la integridad de membrana se realizó de la siguiente manera:

1. Se tomaron 5 ml de IP.
2. Se realizaron alícuotas de 100  $\mu$ l.
3. Se tomaron 10  $\mu$ l de SYBR-14 solución madre y se colocaron 90  $\mu$ l de DMSO.
4. Se elaboraron alícuotas de 5  $\mu$ l.
5. Se etiquetaron y colocaron en congelador.

### 3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Se analizaron cuatro concentraciones (0, 5, 10 y 15%) de líquido folicular que fueron agregadas a distintas alícuotas de una misma dosis refrigerada y se evaluaron en diferentes días (0, 1, 2 y 3). Este esquema dio lugar a 16 combinaciones de

tratamientos donde fueron analizadas 9 variables donde cada semental fue tomado como una repetición (n=12).

### 3.6.1. Variables independientes

Las variables independientes de este trabajo fueron las siguientes:

1. Concentración de líquido folicular (0, 5, 10, 15%).
2. Tiempo de conservación experimental (0, 1, 2, 3 d).
3. Eyaculado (variable de bloqueo que se incluyó para eliminar el efecto de la calidad espermática, ya que se identificó que ésta variaba entre sementales y podría influenciar negativamente el experimento).

### 3.6.2. Variables de respuesta

1. El índice de linealidad (LIN %), la velocidad curvilínea (VCL  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) y la amplitud de desplazamiento lateral de la cabeza espermática (ALH  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) ayudaron a determinar un posible efecto de hiperactivación en los tratamientos.
2. La motilidad progresiva (MOT PROG %), la motilidad total (MOT %), la integridad de membrana espermática (VITAL %) y la reacción acrosomal (RA %) ayudaron a valorar si se demeritaba la calidad espermática al adicionar líquido folicular.
3. Por último, la velocidad rectilínea (VSL  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) y la velocidad promedio (VAP  $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) (considerando éstas últimas como las más importantes de entre las

variables de respuesta) ayudaron a predecir si el líquido folicular poseía efectos positivos al adicionarlo.

### 3.6.3. Modelo Estadístico

Las variables se analizaron mediante un diseño de bloques al azar bajo un arreglo factorial 4 x 4, utilizando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + C_k + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = Respuesta observada en la k-ésima repetición, i-ésimo nivel de FFP y j-ésimo nivel del factor tiempo.

$\mu$  = Media general de la variable de respuesta.

$A_i$  = Efecto del factor concentración de líquido folicular,  $i=1, 2, 3, 4$ .

$B_j$  = Efecto del factor tiempo de conservación,  $j=1, 2, 3, 4$ .

$(AB)_{ij}$  = Efecto de la interacción entre los factores concentración y tiempo.

$C_k$  = Efecto del bloque,  $k= 1, 2, 3, \dots, 12$ .

$\xi_{ijk}$  =Error aleatorio.

Para el análisis estadístico se utilizó el procedimiento GLM (General Linear Models) del programa SAS (SAS, 2004). En caso de observar el efecto de interacción significativo ( $P < 0.05$ ), las medias de las combinaciones de tratamientos se compararon mediante pruebas de "t" student. En caso contrario, se procedió a realizar polinomios ortogonales para determinar tendencias en los niveles de cada factor significativo, ya sea concentración de FFP o días de conservación, hasta el polinomio de tercer orden en ambos casos y comparación de medias. Para el análisis estadístico de la información se utilizó un  $\alpha = 0.05$ .

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Hiperactivación espermática

El análisis de varianza para las variables velocidad curvilínea, índice de linealidad y amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza demostró que la interacción tratamiento por días no fue significativa ( $P>0.05$ ). Por tanto, se muestran los resultados de efecto de concentraciones de fluido folicular porcino y de días en los cuales se realizó el experimento (Figuras 3, 4, 5, 6, 7 y 8).

La velocidad curvilínea presentó un efecto cuadrático ( $P<0.05$ ) conforme la concentración de FFP incrementó de 0 a 15% (Figura 3). El promedio de velocidad curvilínea presentó su máximo nivel en la concentración de 10% de FFP ( $55.36 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ), seguido del 15% ( $55.31 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ) y 5% de FFP ( $52.58 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ), siendo similares ( $P>0.05$ ) entre ellas, finalizando con la concentración de 0% de FFP ( $48.04 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ), que mostró menor ( $P<0.05$ ) velocidad curvilínea que el resto de las concentraciones.

En el índice de linealidad tuvo un efecto cuadrático ( $P<0.05$ ) conforme la concentración FFP incrementó de 0 a 15% (Figura 4). El promedio de índice de linealidad presentó su máximo nivel en la concentración de 15% ( $49.23 \pm 0.91\%$ ) y con menor nivel en la de 0% ( $41.79 \pm 0.91\%$ ), 10% ( $40.41 \pm 0.91\%$ ) y 5% de FFP ( $39.96 \pm 0.91\%$ ), siendo similares ( $P>0.05$ ) estos últimos tres niveles.

En la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza por concentración de FFP se observó un efecto cuadrático ( $P<0.05$ ; Figura 5). El promedio de la amplitud del movimiento lateral de la cabeza presentó niveles similares ( $P>0.05$ ) en las



concentraciones de 5% ( $2.27 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ), 10% ( $2.27 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ) y 0% de FFP ( $2.23 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ) y con menor amplitud ( $P < 0.05$ ) para la concentración de 15% de FFP ( $2.10 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ).

Los resultados de velocidad curvilínea por días de tratamiento se muestra en la Figura 6, donde se observa que el efecto lineal fue significativo ( $P < 0.05$ ). Los promedios de velocidad curvilínea fueron iguales ( $P > 0.05$ ) entre los días 0 ( $57.11 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ) y 1 ( $56.70 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ), pero diferentes ( $P < 0.05$ ) a los días 2 ( $50.53 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ) y 3 ( $46.95 \pm 1.05 \mu\text{m/s}$ ).

Los resultados de índice de linealidad por días de conservación se muestran en la Figura 7, donde se observa que el efecto cuadrático en la variable fue significativa ( $P < 0.05$ ). El promedio de índice de linealidad presentó su máximo nivel en el día 3 ( $47.81 \pm 0.91\%$ ), seguido del día 2 ( $44.33 \pm 0.91\%$ ), y con menor nivel en el día 0 ( $39.79 \pm 0.91\%$ ) y el día 1 ( $39.46 \pm 0.91\%$ ), siendo similares ( $P > 0.05$ ) estos últimos dos niveles.

Los resultados de la amplitud del desplazamiento de cabeza por días de conservación se muestran en la Figura 8, donde se observa que el efecto lineal en la variable fue significativa ( $P < 0.05$ ). El promedio de la amplitud del movimiento lateral de la cabeza presentó su máximo nivel en el día 0 ( $2.34 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ) y el día 1 ( $2.31 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ), siendo similares estos entre sí ( $P > 0.05$ ), y un menor nivel ( $P < 0.05$ ) en el día 2 ( $2.15 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ) y el día 3 ( $2.05 \pm 0.03 \mu\text{m}$ ).

## 4.2. Motilidad espermática

El análisis de varianza para las variables motilidad total y motilidad progresiva espermática resultó en la interacción entre concentración de FFP y tiempo significativa ( $P < 0.05$ ), por tanto, se muestran los resultados de distintas concentraciones de FFP por cada día de conservación de la muestra (Cuadros 3 y 4).

Los resultados de motilidad espermática total expuestos a distintos días con diferentes concentraciones de FFP se presentan en el Cuadro 3. En los días 1 y 2, la motilidad espermática total fue similar ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, en el día 0 la motilidad espermática total fue mayor ( $P < 0.05$ ) a una concentración del 10% ( $93.33 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$ ) sobre el resto de las concentraciones, entre las cuales no hubo diferencia ( $P > 0.05$ ) ( $92.00 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$  para 15%;  $90.66 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$  para 0%; y  $88.00 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$  para 5% de FFP). Por último, los valores de  $85.58 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$  a 10% de FFP,  $84.75 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$  a 5% de FFP y  $84.58 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$  a 0% de FFP fueron similares ( $P > 0.05$ ) entre ellos, observándose menor ( $P < 0.05$ ) motilidad espermática total en la concentración 15% de FFP ( $75.58 \pm 1.50 \mu\text{m/s}$ ) al día 3.

Los resultados de motilidad espermática progresiva expuestos a distintos días por diferentes concentraciones de FFP se presentan en la Cuadro 4. En los días 0 y 2, la motilidad progresiva espermática fue similar ( $P > 0.05$ ) entre los niveles de FFP. Sin embargo, en el día 1 la motilidad progresiva espermática fue mayor ( $P < 0.05$ ) en la concentración del 15% ( $59.33 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$ ) sobre el resto de las concentraciones, entre las cuales no hubo diferencia ( $P > 0.05$ ) ( $55.5 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$  a 0%;  $53.08 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$  a 5%; y  $50.41 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$  para 10% de FFP). Para el día 3 se observó una mayor ( $P < 0.05$ ) motilidad progresiva espermática en la concentración 0% ( $58.83 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$ ),

sobre el resto de las concentraciones que fueron de  $52.66 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$  (10%),  $48.08 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$  (5%) y  $46.58 \pm 2.13 \mu\text{m/s}$  (15%), siendo éstas similares ( $P>0.05$ ).

#### 4.3. Velocidad espermática

El análisis de varianza para las variables velocidad promedio y velocidad rectilínea, se observó que la interacción concentración por tiempo no fue significativa ( $P>0.05$ ). Por tanto, se muestran los resultados de distintas concentraciones de fluido folicular porcino y días en los cuales se realizó el experimento (Figuras 9 y 10).

En los resultados de velocidad promedio por concentraciones de FFP, se observa que el efecto lineal fue positivo ( $P<0.05$ ; Figura 9). El promedio de velocidad promedio presentó su máximo nivel en la concentración de 15% ( $42.05 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ), seguido de 10% ( $38.10 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ), 5% ( $34.59 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ) y 0% ( $31.21 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ).

En los resultados de velocidad rectilínea por concentraciones de FFP de la Figura 10, se observa que el efecto cuadrático fue significativo ( $P<0.05$ ). El promedio de velocidad rectilínea presentó su máximo nivel en la concentración de 15% ( $26.34 \pm 0.42 \mu\text{m/s}$ ) y 10% ( $21.77 \pm 0.42 \mu\text{m/s}$ ), con menor porcentaje en las concentraciones de 5% ( $20.57 \pm 0.42 \mu\text{m/s}$ ) y 0% ( $19.75 \pm 0.42 \mu\text{m/s}$ ), siendo éstas últimas similares ( $P>0.05$ ).

Los resultados de velocidad promedio por días de tratamiento se muestran en la Figura 11, donde se observa que la tendencia lineal en la variable fue significativa ( $P<0.05$ ), Los promedios de velocidad fueron iguales ( $P>0.05$ ) entre los días 0 ( $38.46 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ) y 1 ( $38.43 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ), y diferentes ( $P< 0.05$ ) al día 2 ( $35.52 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ) y 3 ( $33.54 \pm 0.67 \mu\text{m/s}$ ).

#### 4.4. Integridad de membrana espermática

El análisis de varianza para la variable de integridad de membrana espermática, resulto en la interacción concentración por tiempo significativa ( $P < 0.05$ ; Cuadro 5). En los días 0, 1 y 2, la integridad de la membrana espermática fue similar ( $P > 0.05$ ). De igual manera, en el día 3 se obtuvieron valores similares entre las concentraciones de 5, 10 y 15% ( $P > 0.05$ ), siendo de  $81.83 \pm 0.86\%$  para el 15% de FFP,  $80.75 \pm 0.86\%$  para el 10% de FFP y  $80.75 \pm 1.34\%$  para el 5% de FFP, pero se observó una integridad de membrana espermática menor ( $P < 0.05$ ) para la concentración 0% de FFP ( $72.91 \pm 1.34\%$ ).

#### 4.5. Reacción acrosomal

En el análisis de varianza para reacción acrosomal no hubo significancia ( $P > 0.05$ ) de ninguno de los factores incluidos en el modelo.

## V. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran un claro efecto positivo por adicionar FFP en dosis refrigeradas de semen porcino. Esto indica que, al utilizarlo como aditivo *in vitro*, activa rápidamente la velocidad de los espermatozoides en comparación con el testigo. Este hecho es especialmente interesante, ya que *in vivo* podría facilitar el recorrido a los espermatozoides a través del tracto reproductor de la hembra cuando se dirigen a la unión útero-tubal de la región del istmo del oviducto (Olivera et al., 2006), lugar donde los espermatozoides se distinguen por interactuar con las células epiteliales para modular las concentraciones de  $Ca^{+}$  interno, fluidez de la membrana y motilidad (Coy et al., 2010). Otra función relevante del oviducto es que se asegura que los espermatozoides sean viables y fértiles, para que en el momento de la fertilización, sean liberados gradualmente (Waberski et al., 2005; Rodríguez–Martínez, 2007; Coy et al., 2010).

Estudios previos demuestran que las células epiteliales del oviducto también seleccionan y secuestran espermatozoides de alta calidad con la finalidad de que se encuentren con los ovocitos dentro de la ampulla (Waberski et al., 2005; Coy et al., 2010). Se sospecha que adicionar FFP a dosis refrigeradas de semen podría aumentar las posibilidades de selección y secuestro, ya que los espermatozoides llegarían rápidamente al oviducto y posiblemente con menor desgaste del que comúnmente son sometidos *in vivo*. Por otra parte, existen evidencias de que los espermatozoides son guiados por un gradiente químico (quimiotaxis) para llegar al óvulo (Ho y Suárez, 2001). Aunque no se conoce con exactitud la sustancia química que desencadena este proceso (Sliwa, 2003), el FF podría ser el principal actor. Villanueva-Díaz et al. (1990)

construyeron un modelo *in vitro* en humanos y efectivamente observaron que los espermatozoides eran dirigidos por un gradiente aún no identificado (Hong et al., 1993). De esta misma manera, Jeon et al. (2001) observaron que el FF desempeñaba un papel crucial en cuanto a la atracción de los espermatozoides en humanos, atracción que podría ser causada por una proteína de 86 KDa presente en este fluido (Serrano et al., 2001). También se menciona que aunque los espermatozoides sean de baja calidad, por medio de este fluido pueden lograr la capacitación (Tacconis et al., 2001), que según Pentrunkina et al. (2003) es la clave de la fertilización, y por otro lado, se encuentra la quimioatracción (Tacconis et al., 2001). Así, la respuesta quimiotáctica de los espermatozoides al FF requeriría previamente la inducción de la capacitación mediante este mismo fluido, la cual se puede detectar por un aumento en los parámetros de motilidad (hiperactivación). Contrariamente, Ho y Suárez (2001) afirman que el contacto de los espermatozoides con el FF no hiperactiva a los espermatozoides, ya que el proceso se observa mucho después de la liberación de este líquido al oviducto precisamente cuando se desencadena la ovulación.

Los mismos autores manifiestan que las señales concretas para iniciar la hiperactivación no están aún descritas y que el fenómeno se observa exactamente en el momento de la fertilización.

### 5.1. Hiperactivación espermática

En este estudio, la evaluación de distintos parámetros demostró que la adición de FFP en dosis comerciales de semen porcino mejoró la calidad espermática *in vitro* y no indujo la hiperactivación, en concordancia con los resultados de Ho y Suárez (2001).

Como se mencionó anteriormente, la hiperactivación de los espermatozoides se caracteriza por sus movimientos no lineales (Suarez y Ho, 2003; Ho et al., 2001). Por el contrario, Isobe et al. (2002) aseguran que el FF en humanos estimula la hiperactivación.

Para identificar lo anteriormente debatido se utilizó el sistema de análisis computarizado CASA, una herramienta que según Ehlers et al. (2011) puede brindar resultados confiables con o sin personal capacitado, lo cual proporciona veracidad a los resultados. También se basó en la clasificación de Schmidt y Kamp (2004); de igual manera que Cremades et al. (2005) definen a un espermatozoide como hiperactivo si su velocidad curvilínea es  $>97 \mu\text{m}/\text{seg}$ , la amplitud media del desplazamiento de cabeza es  $>3.5 \mu\text{m}/\text{seg}$  y el índice de linealidad  $<32\%$ . De acuerdo con esta categorización, los resultados de velocidad curvilínea, amplitud de los desplazamientos de cabeza e índice de linealidad no se encuentran en ninguno de los rangos mencionados anteriormente. Otra prueba por la cual no se presentó hiperactivación es el tiempo en que se llevó a cabo el experimento (0, 1, 2 y 3 días). La manifestación de este proceso no hubiera permitido evaluar los espermatozoides a lo largo del tratamiento dado que su viabilidad se acorta una vez hiperactivados.

Por tal motivo se deduce que agregar fluido folicular a dosis refrigeradas no induce la hiperactivación de los espermatozoides y posiblemente represente una herramienta crucial para atraer a los espermatozoides al sitio de fertilización (Serrano et al., 2001; Jeon et al., 2001). Además, adicionar FF sobre dosis refrigeradas destinadas a IA podría asegurar un mayor número de espermatozoides preparados

para competir por los ovocitos, tal y como demuestran los resultados obtenidos en este trabajo sobre los parámetros de calidad.

## 5.2. Motilidad y velocidad espermática

Se ha observado que agregar FFP a diferentes concentraciones de dosis refrigeradas de semen porcino mantiene la motilidad total espermática al mismo nivel que una dosis sin FFP (Yeste et. al., 2008; Yeste et. al., 2008; Estienne et al., 2007; Casas et al., 2010; Martín-Hidalgo et al., 2011 Hong et al., 1993). Por lo tanto, se puede utilizar como un aditivo para espermatozoides sin alterar su motilidad.

Para garantizar el adecuado movimiento del espermatozoide no basta con tener una gran cantidad de células en movimiento, sino que también es necesario que los espermatozoides sean capaces de avanzar en línea recta a una velocidad progresiva adecuada (Hong et al., 1993; Petrunkina et al., 2003; Casas et al., 2010; Martín-Hidalgo et al., 2011;). Por tal motivo se evaluó la influencia que podía tener el FFP sobre la motilidad progresiva en dosis comerciales de semen y se observó que este parámetro mejoró considerablemente respecto a las dosis que no contenían FFP a partir del día 1, siendo 15% la concentración óptima. De acuerdo con los resultados del presente experimento y a los de otros autores, el FF ayuda a mejorar la motilidad de los espermatozoides (Nichol et al., 1997; Rodríguez et al., 2001; Briton-Jones et. al., 2001; Yao et al., 2000; Jeon et al., 2001; Wang et al., 2001; Duran et al., 1997; Villanueva-Díaz et al., 1990; Fahiminiya y Gerard, 2010). De modo que *in vivo*, el FF facilitaría el recorrido de los espermatozoides a través del tracto reproductor de la hembra.



No obstante, las motilidades total y progresiva disminuyeron al día 3 en comparación con las dosis sin FFP. Esta caída podría atribuirse al aumento de la tasa metabólica de los espermatozoides mediada por el FFP, limitándolos a mantener la motilidad elevada hasta el día 3 por el desgaste de energía. Se sugiere limitar el FFP en dosis refrigeradas hasta 15%, ya que incrementarlo podría ser nocivo para la viabilidad del espermatozoide en dosis de más de 3 días.

Nichol et al. (1997) observaron que agregar FFP no solo estimulaba la motilidad, sino que también aumentaba la velocidad de los espermatozoides, como también se ha observado en el presente estudio. Los mejores valores de velocidad promedio y velocidad rectilínea se han obtenido para concentraciones de 15% de FFP. Esto hace pensar que agregar 15% de FFP a las dosis comerciales en porcinos puede aumentar el número de competidores para el óvulo (Gomendio y Roldan, 2008; Tourmente et al., 2011), ya que se ha observado que cuánto más rápido es el espermatozoide, mayores son las posibilidades de fertilizar con éxito el óvulo (Gomendio y Roldan, 2008; Turner, 2006; Flowers, 2009), asegurando así el número de camadas de cerdos (Braundmeier et al., 2004).

### 5.3. Integridad de la membrana espermática

Como ocurre con la motilidad total, el FFP no disminuyó la integridad de la membrana respecto a las dosis sin FFP, por lo que puede ser añadido sin repercusiones para la calidad espermática. Además, al día 3 se observó un descenso significativo de la integridad de membrana en el testigo con respecto a los tratamientos con FFP. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores en los cuales se

concluye que el FFP ayuda a mantener la viabilidad espermática, mejorando la función del espermatozoide (Villanueva-Díaz et al., 1990; Hamamah et al., 1994; Fahiminiya y Gerard, 2010).

#### 5.4. Reacción Acrosomal

Otro fenómeno importante a estudiar es la reacción acrosomal, la cual ha sido investigada por varios autores para conocer la influencia que ejerce el FF sobre los espermatozoides (Li et al., 2006; Rodríguez et al., 2001; De Jonge et al., 1993). Este proceso se lleva a cabo de manera natural dentro de las criptas del istmo de los ovarios (Olivera et al., 2006), mecanismo por el cual el espermatozoide libera, de la cabeza, enzimas hidrolíticas para penetrar la ZP de ovocito y fusionarse (Alberts et al., 2002; Harvey, 2008). Sin embargo, si dicho proceso se desencadena antes de tiempo, el espermatozoide ya no puede penetrar (Cumminis y Yanagimachi, 1986), por lo que no es deseable que se produzca prematuramente. En el presente estudio no se encontraron diferencias en las dosis de FFP con respecto a las dosis sin fluido, siendo más del 90% los espermatozoides que presentaban un acrosoma intacto, en contradicción con Burrello et al. (2004), que aseguran que la reacción acrosomal depende de la concentración de FF que se agregue.

#### 5.5. Perspectivas

Los resultados sobre los parámetros de calidad espermática evaluados en el presente estudio conducen a proponer que el FFP podría utilizarse como un aditivo en

dosis refrigeradas de semen porcino para mejorar los índices de fertilidad en la IA. Aunque actualmente no se conocen los componentes individuales del FF que intervienen sobre la funcionalidad de los espermatozoides (Hong et al., 1993), el FF ha recibido escasa atención por parte de los investigadores. Sin embargo, debería ser un tema de suma importancia para comprender muchos procesos fisiológicos que aun están sin comprender en la reproducción (Raymond et al., 2010), y por tal motivo se esperan más análisis al respecto.

Por el momento se puede especular que el FF podría ser una herramienta clave para animales con problemas reproductivos debidos a la edad, al estrés estacional, al manejo, al estado nutricional u otros problemas desconocidos que causan subfertilidad o simplemente para garantizar la fertilidad en el hato (Esteves y Agarwal, 2011). Tal como se ha especulado, al utilizar el FFP como un aditivo en la IA en cerdos podría aumentar la selección y secuestro de espermatozoides de mejor calidad por parte de las células del oviducto, dónde se mezclarán con el FFP real de la hembra cuando sean liberados durante la ovulación, garantizando así el mayor número de espermatozoides que interactúen con los ovocitos dentro del ámpula.

Con todo lo descrito, el FF podría aprovecharse para asegurar el potencial genético de los mejores sementales en un gran número de reproductoras facilitando el mejoramiento genético de estos animales, y no sólo en cerdos, sino también en otras especies de interés.

Las propiedades que ofrece el FFP podrían a su vez utilizarse para optimizar el volumen de las dosis comerciales, ya que actualmente en la IA el número de espermatozoides en dosis refrigeradas de semen es muy alto (Vázquez et al., 2005) y

conviene implementar nuevos programas para reducir costos. Asimismo, en un futuro se podría pensar en elaborar FF sintético con los componentes que éste posee, dado que la recolección de FF en grandes volúmenes supondría un elevado costo de mano de obra.

Se ha observado que en la reproducción asistida humana, el FF mejora la tasa de preñez (Giorgetti et al., 1992), por lo que el más inmediato interés es realizar un estudio de la IA en cerdos utilizando dosis comerciales con un 15% de FFP añadido, asegurando así que el FFP tampoco altera el normal desarrollo de los embriones *in vivo*.

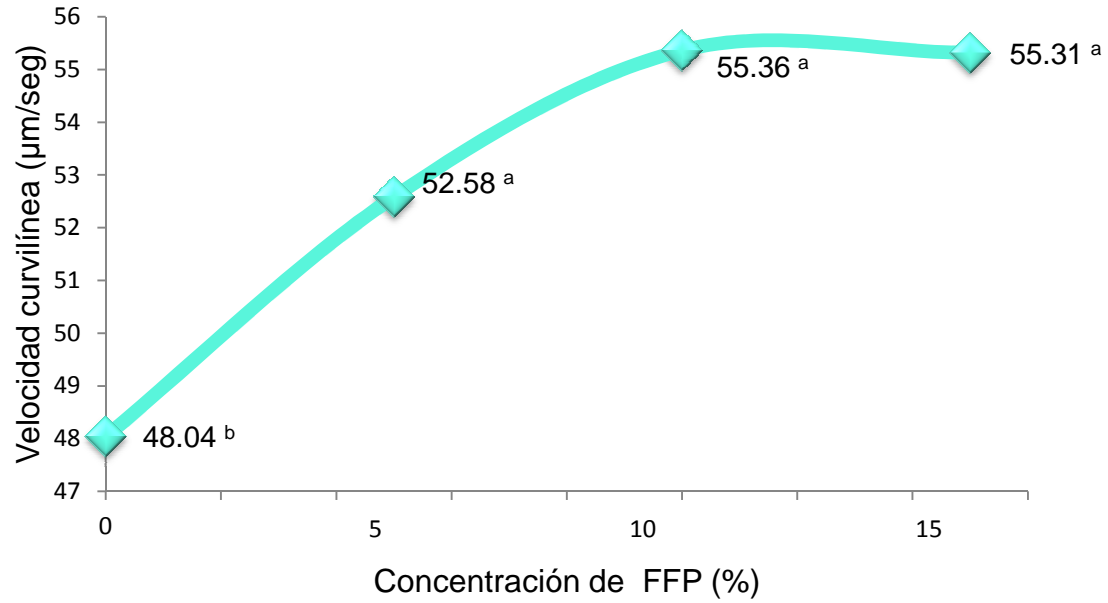


Figura 3. Relación entre concentración de fluido folicular porcino y velocidad curvilínea espermática (µm/seg) (efecto cuadrático significativo  $P < 0.0318$ ).

a,b,c,d Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

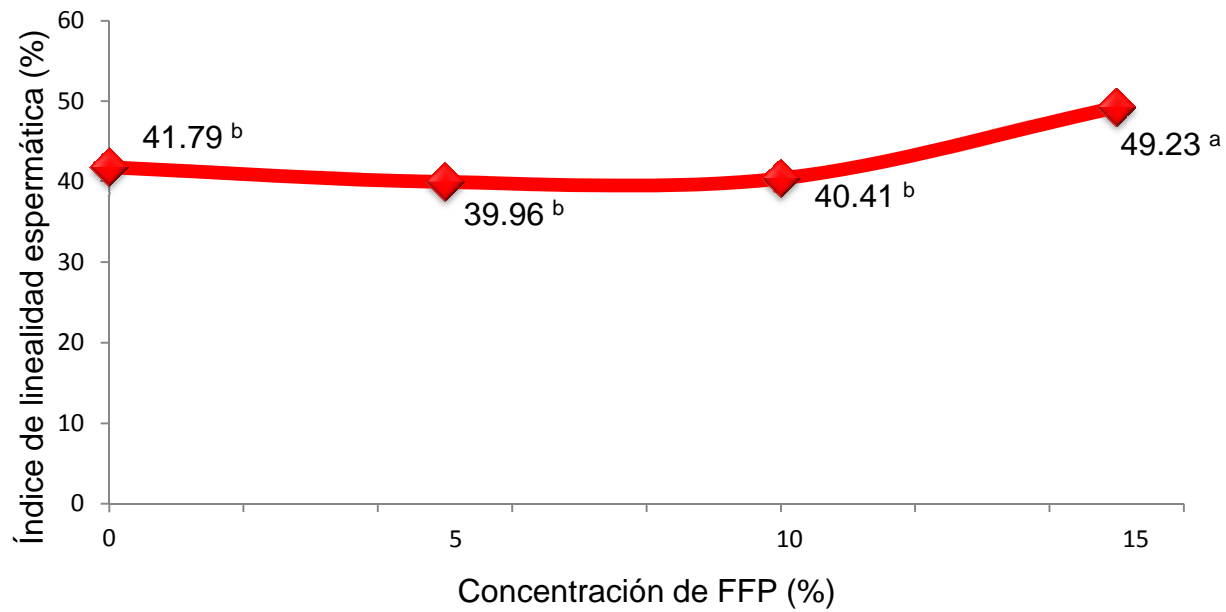


Figura 4. Relación entre la concentración de fluido folicular porcino e índice de linealidad espermática (%) (efecto cuadrático significativo  $P < 0.001$ ).

<sup>a,b</sup>, Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

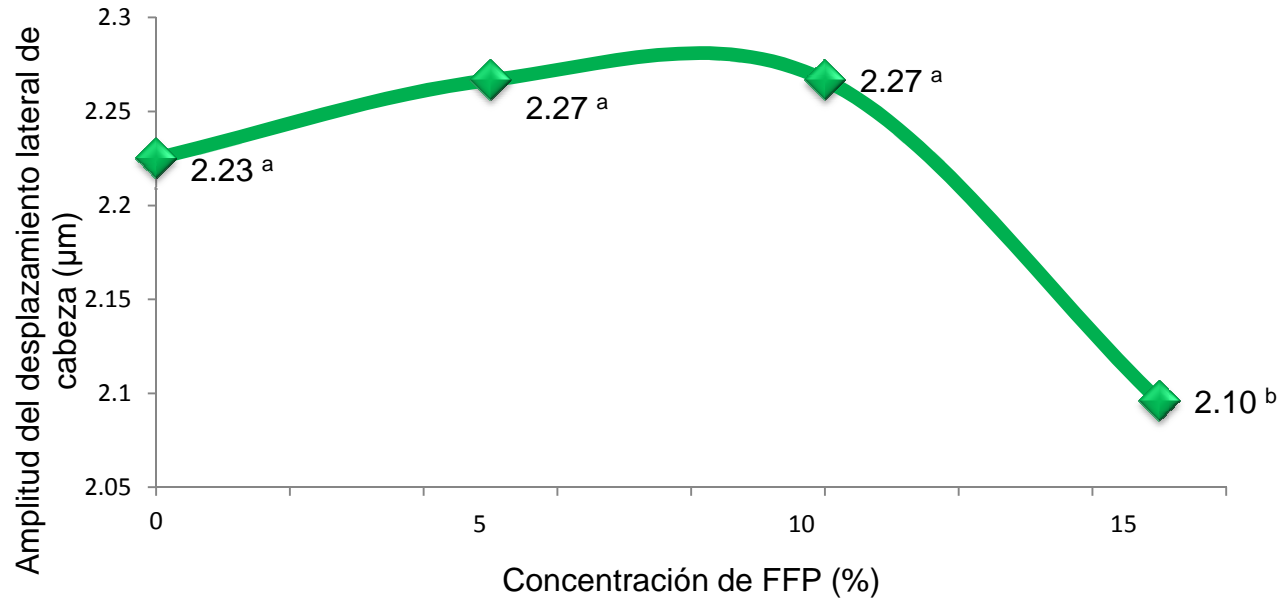


Figura 5. Relación entre concentración de fluido folicular porcino y lateral de cabeza espermática ( $\mu\text{m}$ ) (efecto cuadrático significativo  $P < 0.0052$ ).

<sup>a,b</sup> Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

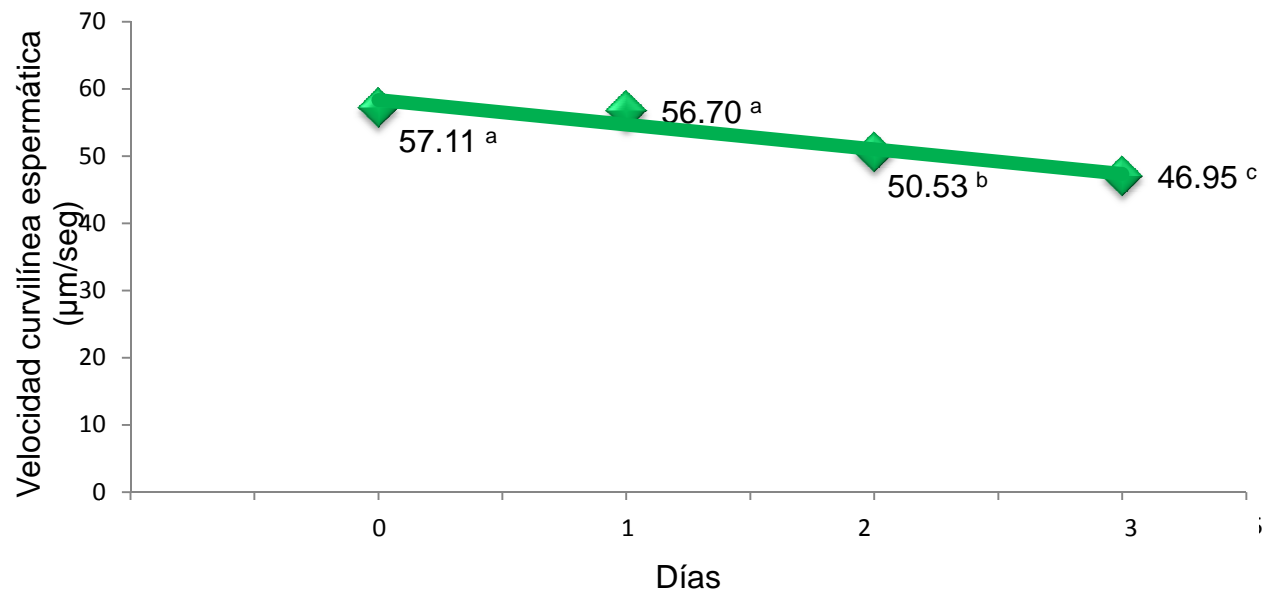


Figura 6. Relación entre días y velocidad curvilínea espermática ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) (efecto lineal significativo  $P < 0.0001$ ).

a,b,c Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



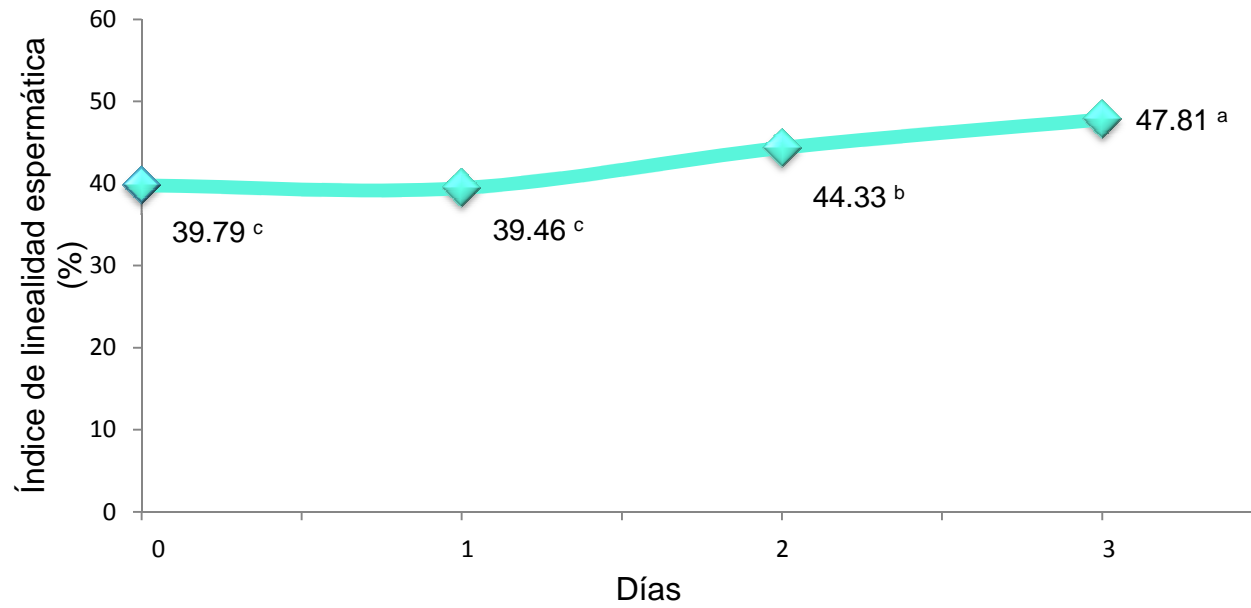


Figura 7. Relación entre días e índice de linealidad espermática (%) (efecto cuadrático significativo  $P < 0.0388$ ).

<sup>a,b,c</sup> Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

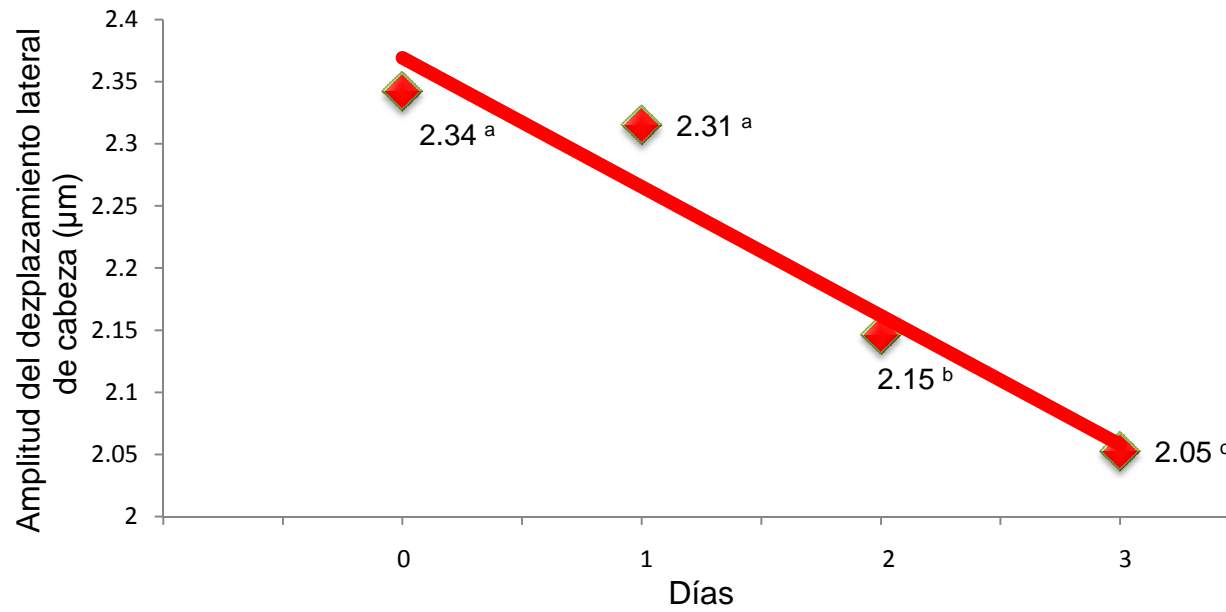


Figura 8. Relación entre días y lateral de cabeza espermática ( $\mu\text{m}$ ) (efecto lineal significativo  $P < 0.0001$ ).

<sup>a,b,c</sup> Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 3. Efecto de concentración de fluido folicular porcino y días de conservación sobre la motilidad total espermática.

	Días de conservación				Error Est.
	0	1*	2*	3	
Nivel de FFP					
0%	90.66 <sup>b</sup>	90.16	89.91	84.58 <sup>a</sup>	1.50
5%	88.00 <sup>b</sup>	89.75	88.25	84.75 <sup>a</sup>	1.50
10%	93.33 <sup>a</sup>	90.58	90.50	85.58 <sup>a</sup>	1.50
15%	92.00 <sup>b</sup>	90.66	89.41	75.58 <sup>b</sup>	1.50

<sup>a,b</sup> Medias con distinta literal en columna indican diferencia significativa (P<0.05).

\*Medias estadísticamente iguales (P>0.05).

Cuadro 4. Efecto de concentración de fluido folicular porcino y días de conservación sobre la motilidad progresiva espermática.

	Días de conservación				Error Est.
	0*	1	2*	3	
Nivel de FFP					
0%	53.75	55.50 <sup>b</sup>	54.66	53.83 <sup>b</sup>	2.12
5%	53.58	53.08 <sup>b</sup>	56.25	48.08 <sup>a</sup>	2.13
10%	56.50	50.41 <sup>b</sup>	57.33	52.66 <sup>a</sup>	2.13
15%	58.50	59.33 <sup>a</sup>	60.25	46.58 <sup>a</sup>	2.13

<sup>a,b</sup> Medias con distinta literal en columna indican diferencia significativa (P<0.05).

\*Medias estadísticamente iguales (P>0.05).

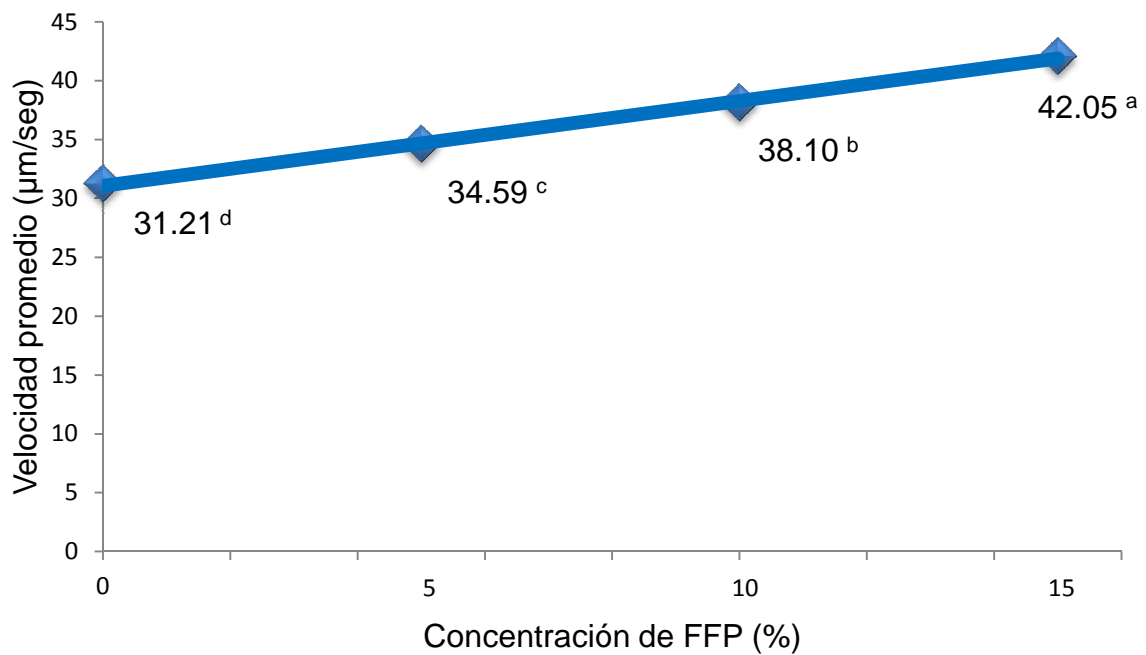


Figura 9. Relación entre concentración de fluido folicular porcino y velocidad promedio ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) (efecto lineal significativo  $P < 0.0001$ ).

a,b,c,d Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

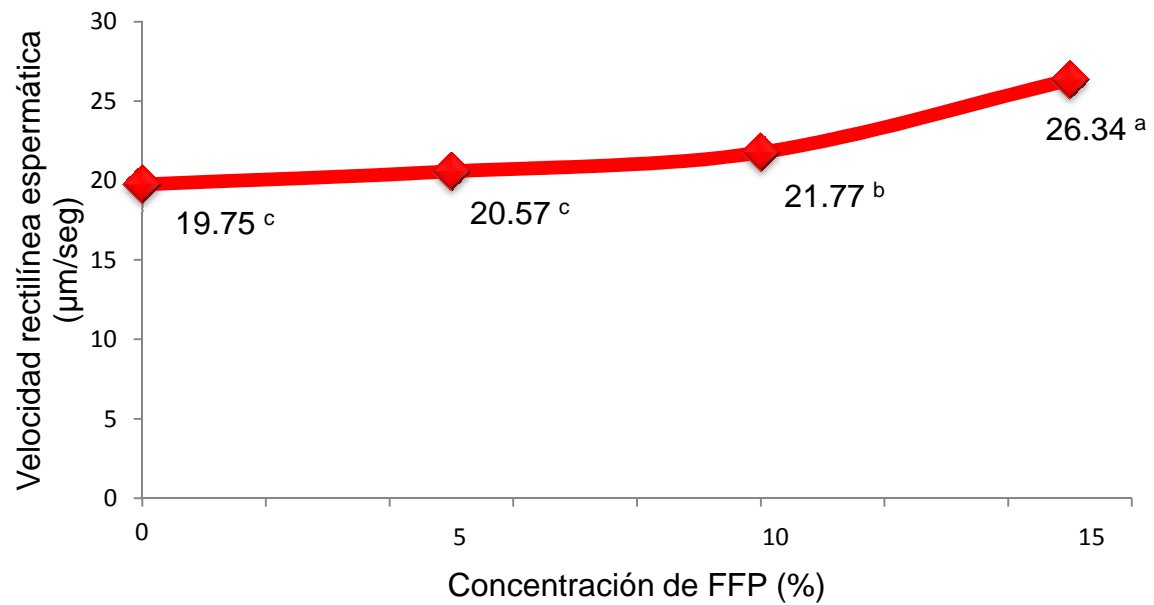
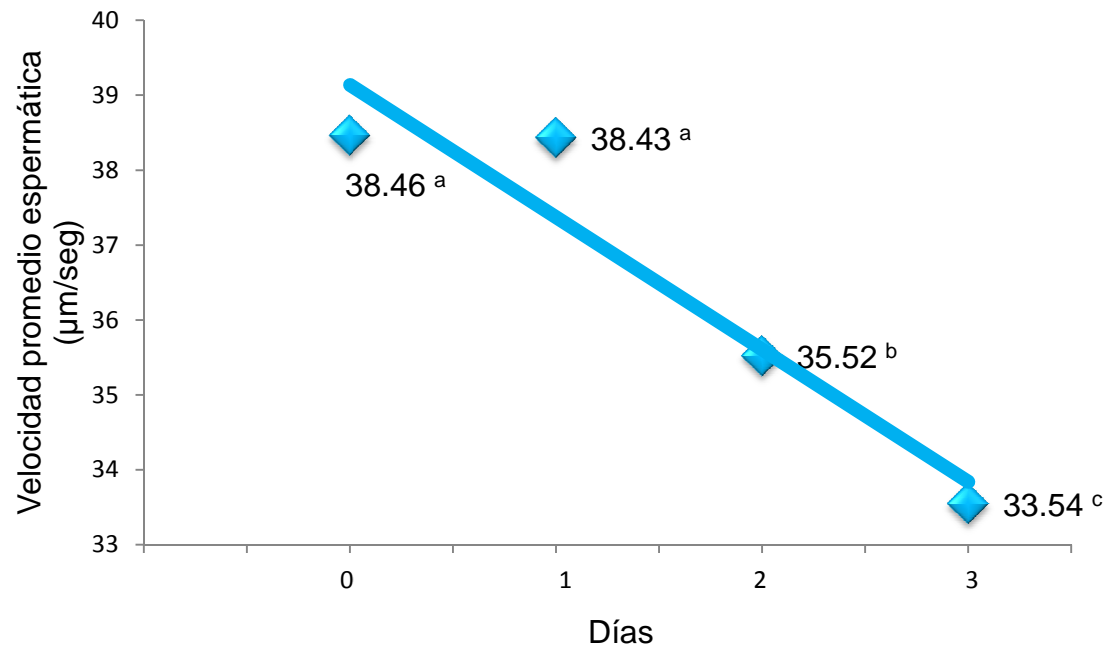


Figura 10. Relación entre concentración de fluido folicular porcino y velocidad rectilínea espermática ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ ) (efecto cuadrático significativo  $P < 0.0001$ ).

<sup>a,b,c</sup> Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).



Gráfica 11. Relación entre días y velocidad promedio espermática (µm/seg) (efecto lineal significativo  $P < 0.0001$ ).

<sup>a,b,c</sup> Valores por día con diferente literal indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ).

Cuadro 5. Efecto de concentración de fluido folicular porcino y días de conservación sobre la integridad de la membrana espermática.

	Días de conservación				Error Est.
	0*	1*	2*	3	
Nivel de FFP					
0%	88.75	88.00	85.00	72.91 <sup>b</sup>	0.86
5%	90.33	87.25	87.16	80.75 <sup>a</sup>	0.86
10%	88.33	85.83	87.08	80.75 <sup>a</sup>	0.86
15%	88.16	88.00	87.16	81.83 <sup>a</sup>	0.86

<sup>a,b</sup> Medias con distinta literal en columna indican diferencia significativa (P<0.05).

\*Medias estadísticamente iguales (P>0.05).



## VII. CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que el FFP no tiene efectos nocivos sobre las dosis comerciales de semen porcino. Por el contrario, mejoró la motilidad de los espermatozoides y su viabilidad a largo plazo, siendo la concentración del 15% de FFP la óptima en cuanto a su efecto en la calidad espermática.

Se recomienda utilizar el FFP en dosis refrigeradas antes del día 2, ya que posteriormente la calidad espermática comienza a disminuir.

Finalmente, añadir 15% de FFP a dosis refrigeradas de cerdo en los primeros días podría tener un impacto benéfico en la IA, puesto que favorecería el acceso de un mayor número de espermatozoides competentes al lugar de la fertilización.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aitken, R. J. 2006. Sperm function tests and fertility. *Int. J. Androl.* 29: 69-75.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. R. Roberts, P. Walter. 2002. *Biología Molecular de la Célula*. Ed. Omega S.A. Pp. 1-463.
- Althouse, G. C., M. E. Wilson, C. Kuster, M. Parsey. 1998. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 50: 535-543.
- Bailey, J. L. 2010. Review and hypothesis, factors regulating sperm capacitation. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 56:334-348.
- Bonet, S., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. García-Gil, E. Badia. 2000. *Morfología espermática en porcino*. Institut d'estudis Catalans. Pp.49-65.
- Braundmeier, G., J. M. Demers, R. D. Shanks and D. J. Miller. 2004. The relationship of porcine sperm zona-binding ability to fertility. *J. Anim. Sci.* 82:452-458.
- Briton-Jones, C., Q. S. Yeung, G. C. Tjer, T. T. Chiu, L. P. Cheung, S. F. Yim, I. H. Lok, C. Haines. 2001. The effects of follicular fluid and platelet-activating factor on motion characteristics of poor-quality cryopreserved human sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.* 18:165-170.
- Burrello, N., E. Vicari, L. D'Amico, A. Satta, R. D'Agata, A. E. Calogero. 2004. Human follicular fluid stimulates the sperm acrosome reaction by interacting with the gamma-aminobutyric acid receptors. *Fertil. Steril.* 3:1086-1090.
- Casas R. I. 2010. A practical approach on boar sperm cryodamage, Morphofunctional and immunocytochemical study of cryopreserved boar sperm intended for use in artificial insemination. Doctoral Thesis. University of Girona.
- Casas, I., S. Sancho, M. Briz, E. Pinart, E. Bussalleu, M. Yeste, S. Bonet. 2010. Fertility after post-cervical artificial insemination with cryopreserved sperm from boar ejaculates of good and poor freezability. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 69–76.
- Chang, H., S.S. Suarez. 2010. Rethinking the relationship between hyperactivation and chemotaxis in mammalian sperm. *Biol. Reprod.* 83:507–513.

- Christensen, P., D. B. Knudsen, H. Wachmann, M. T. Madsen. 2004. Quality control in boar semen production and correlation to field fertility. *Theriogenology* 62:1218-1228.
- Cremades, T., J. Roca, H. Rodríguez-Martínez, T. Abaigar, J. M. Vázquez, E. A. Martínez. 2005. Kinematic changes during the cryopreservation of boar spermatozoa. *J. Androl.* 26:610-618.
- Colenbrander, B., B. M. Gadella, H. Feitsma, H. Woelders. 1999. Semen quality evaluation, present and future. IV International Conference on Boar Semen Preservation. Beltsville, Maryland USA. P. 4.
- Colenbrander, B., B. M. Gadella, T. A. E. Stout. 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.* 38:305–311.
- Colenbrander, B. and Kemp B. 1990. Factors influencing semen quality in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 40:105-115.
- Coy, P., R. Lloyd, R. Romar, N. Satake, C. Matas, J. Gadea, W. V. Holt, 2010. Effects of porcine pre-ovulatory oviductal fluid on boar sperm function. *Theriogenology* 74: 632–642.
- Cumminis, J. and Yanagimachi. 1986. Development of ability to penetrate the cumulus oophorus by hamster spermatozoa capacitated in vitro in relation to the timing of the acrosome reaction. *Gamete Res.* 15:187-212.
- De Jonge, C. J., C. L. R. Barratt, E. Radwanska and L. D. Cooke. 1993. The acrosome reaction-inducing effect of human follicular and oviductal fluid. *J. Androl.* 14:359-365.
- Ducolomb, R. Y. 2004. Estudio de las fracciones proteínicas del fluido folicular porcino en la maduración, fertilización in vitro y polispermia del ovocitos de cerdo. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Durán, R. G., A. M. Rosales, J. J. H. Gómez. 1997. Participation of the follicular fluid in follicular development, oocyte maturation and spermatid function. *Ginecol. Obstet. Mex.* 65:349-356.
- Ehlers, J., M. Behr, H. Bollwein, M. Beyerbach, D. Waberski. 2011. Standardization of computer-assisted semen analysis using an e-learning application. *Theriogenology* 76:448-54.
- Eisenbach, M. 1999. Sperm chemotaxis. *Rev. Reprod.* 4:56-66.

- Esteves, S.C., A. Agarwal. 2011. Novel concepts in male infertility. *International Braz. J. Urol.* 37:5-15.
- Estienne, M. J. 2009. Using Artificial Insemination in swine production: Detecting and synchronizing estrus and using proper insemination technique. Virginia Cooperative extension. [on-line] <[http://pubs.ext.vt.edu/414/414-038/414-038\\_pdf.pdf](http://pubs.ext.vt.edu/414/414-038/414-038_pdf.pdf)> [Acceso: 30 de agosto, 2011].
- Estienne, M. J., A. F Harper, J. L. Day. 2007. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Biol. Reprod.* 7:221-231.
- Fahiminiya, S., N. Gérard. 2010. Le liquide folliculaire chez les mammifères. *Gynecol. Obstet. Fertil.* 38: 402-404.
- Flowers, W. L. 2009. Selection for boar fertility and semen quality--the way ahead. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 66:67-78.
- Fradson, R. D., T. L. Spurgeon. 1995. *Anatomía y Fisiología de los Animales Domésticos*. 5ª edición. Ed. Mc. Graw-Hill. Pp.386-460.
- Gadea, J, E. Selles, M. A. Marco. 2004. The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reprod. Domest. Anim.* 39:303–308.
- Gadea, J. 2003. Los diluyentes de inseminación artificial porcina. *Spanish Journal of Agricultural* 1:17-27.
- Gadea, J. 2005. Sperm factors related to in vitro and in vivo porcine fertility. *Theriogenology* 63:431–444.
- Gadea, M. J. 1997. Predicción de la fertilidad in vivo de los eyaculados de verraco mediante parámetros rutinarios de contrastación seminal, pruebas bioquímicas y el test homólogo de penetración in vitro. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Giorgetti, C., E. Hans, J. L. Spach, P. Auquier, R. Roulier. 1992. In-vitro fertilization in cases with several sperm defect: use of a swim-across technique and medium supplemented with follicular fluid. *Hum. Reprod.* 7:1121-1125.
- Glossop, C. E. 1996. Semen Collection, evaluation and handling. *Proceedings of Swine Reproduction Symposium*. Hastings, Nebraska. Pp. 7-14.
- Gomendio, M., E. R. S. Roldan. 2008. Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Dev. Biol.* 52: 439-447.

- González- Urdiales, R., F Tejerina, J. C. Domínguez, B. Alegre, A. Ferreras, J. Pelaez, S. Bernal, S. Cárdenas. 2006. Técnicas de análisis rutinario de la calidad espermática: motilidad, vitalidad, concentración, resistencia osmótica y morfología espermática. Manual de técnicas de reproducción asistida en porcinos. Ed. Universidad de Girora. Pp. 19-38.
- Jeon, B. G., J. S. Moon, K. C. Kim, H. J. Lee, S. Y. Choe, G. J. Rho. 2001. J. Follicular fluid enhances sperm attraction and its motility in human. Assist. Reprod. Genet. 18:407-412.
- Hafez, E., B. Hafez. 2002. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª edición. Ed. Mc. Graw-Hill. Pp.1-507.
- Hamamah, S., C. Barthélémy, C. Wittemer, M. Lanson, A. Fignon, D. Royére, J. Lansac. 1994. Follicular fluid: role and importance in the preparation of spermatozoa for fertilization. Contracept. Fertil. Sex. 22:325-327.
- Harvey, M., Florman, M. K. Jungnickel and K. A. Sutton. 2008. Regulating the acrosome reaction. Int. J. Dev. Biol. 52: 503-510.
- Ho, H.C., K. A. Granish, S. S. Suarez. 2002. Hiperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by  $Ca^{2+}$  and not cAMP. Dev. Biol. 250:208-217.
- Ho, H. C. and S. S. Suarez. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. Reproduction 122:519–526.
- Hong, C. Y, H. T. Chao, S. L. Lee, Y. H. Wei. 1993. Modification of human sperm function by human follicular fluid: a review. Int. J. Androl. 16:93-96.
- Isobe T., H. Minoura, K. Tanaka, T. Shibahara, N. Hayashi and N. Toyoda. 2002. The effect of rantes on human sperm chemotaxis. Hum. Reprod.17: 1441-1446.
- Jeon, B. G., J. S. Moon, K. C. Kim, H. J. Lee, S. Y. Choe, G. J. Rho. 2001. J. Follicular fluid enhances sperm attraction and its motility in human. Assist. Reprod. Genet. 18:407-412.
- Johnson, L. A., K. F. Weitze, P. Fiser, W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci. 62:143–172.
- Kay, V. J. y L. Robertson. 1998. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. Hum. Reprod. Update 4:776-786.

- Kmenta, I., C. Strohmayr, F. Müller-Schlösser, S. Schäfer-Somi. 2011. Effects of a lecithin and catalase containing semen extender and a second dilution with different enhancing buffers on the quality of cold-stored canine spermatozoa. *Theriogenology*.75:1095-1103.
- Lesur, L. 2007. Manual de Porcinocultura. Ed. Trillas. Pp.1-80.
- Lewis, L. L. 1911. The viability of reproductive cell. *Agri Exp. Sta. Bull Oklahoma Agriculture and Mechanical College. Stillwater*, pp. 96.
- Li, J. P., Y. Zhong, D. Wu, L. Ai, S. Wang, C. Tan, W. Q. Zeng, J. Liu, G. P. Ma. 2006. Relationship among human follicular fluid-induced acrosome reaction, sperm morphology and in vitro fertilization rates. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 12:605-607.
- Martín-Hidalgo, D., F. J. Barón, M. J. Bragado, P. Carmona, A. Robina, L. J. García-Marín, M. C. Gil. 2011. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17°C. *Theriogenology* 75:1550–1560.
- Medrano, A. 2005. Estudio del metabolismo energético de los espermatozoides porcinos y su repercusión en el diseño de diluyentes optimizados para la conservación de semen refrigerado. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Michael, A. J., C. Alexopoulos, E. A. Pontiki, D.J. Hadjipavlou-Litina, P. Saratsis, H.N. Ververidis, C.M. Boscos. 2009. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 112:119-135.
- Molecular Probes, 2001.Live/ dead viability kit (L-7011). Product information [online] <<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07011.pdf>> [Acceso: 29 de agosto, 2011].
- Morrell, M. J. 2011. Artificial insemination: Current and future trends. *Artificial Insemination in Farm Animals*. 1<sup>ra</sup> edición. Ed. Milad Manafi. Pp. 1-14.
- Mortimer, S. T. 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Hum. Reprod. Update*. 3:403–439.
- Nichol, R., R. H. Hunter, E. de Lamirande, C. Gagnon, G. M. Cooke. 1997. Motility of spermatozoa in hydrosalpingeal and follicular fluid of pigs. *J Reprod. Fertil.* 110:79-86.

- Olivera, M., T. Ruíz, A. Z. Tarazona, C. Giraldo. 2006. El espermatozoide desde la eyaculación hasta la fertilización. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19:426-436.
- Perumal, P., S. Selvaraju, S. Selvakumar, A. Barik, D. Mohanty, S. Das, R. Das, P. Mishra. 2010. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reprod. Domest. Anim.* 46:636-641.
- Petrunkina, M., A. R. Günzel-Apel, E. Töpfer-Petersen. 2003. Seeking mathematical strategies in sperm function analysis: between scylla and charybdis? *Reprod. Domest. Anim.* 38:125-133.
- Petrunkina, M., D. Waberski, A. R. Gunzel-Apel and E. Topfer-Petersen. 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species *Reproduction* 134:3–17.
- PIC (Pig Improvement Company, Inc.), 1994. *The swine AI Book. A field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine.* Second edition. PP. 1-158.
- Pursel, V. G., L. A. Johnson, L. L. Schulman. 1973. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 37:528-531.
- Rajasingam, S. J. 2003. *Sperm Collection and Processing Methods: A Practical Guide.* Cambridge University Press. Pp. 1-156. United Kingdom.
- Ralt, D., M. Mira, A. Cohen-Dayag, L. Tur-Kaspa, I. Ben-Shlomo, A. Makler, Y. Izhak, D. Jehoshua, B. Shmaryahu, M. Shlomo, M. Eisenbach. 1994. Chemotaxis and chemokinesis of human spermatozoa to follicular factors. *Biol. Reprod.* 50:771-785.
- Raymond, J., Rodgers and H. F. Irving-Rodgers. 2010. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol. Reprod.* 82:1021–1029.
- Rodríguez, H., C. Torres, X. Valdés, H. Guerra, L. M. Pastor, G. Maccallini, E. Bustos-Obregón. 2001. The acrosomic reaction in stallion spermatozoa: inductive effect of the mare preovulatory follicular fluid. *Biocell.* 25:115-120.
- Rodríguez-Martínez, H. 2007. Role of the oviduct in sperm capacitation. *Theriogenology* 68: 138–146.
- Román, M. T., J. C. Domínguez, M. Abad, J. Peláez. 2007. Efecto del aditivo seminal lechon-Plus sobre la fertilidad y prolificidad de cerdas adultas con dosis seminales conservadas en refrigeración durante 24 y 48 horas.

Congreso XII Jornadas sobre Producción Animal [on-line] <<http://bddoc.csic.es:8080/detalles.html?tabla=docu&bd=ICYT&id=194444>> [Acceso: 30 de agosto, 2011].

- Sansegundo G. M. 2008. Estudios de la capacitación in vitro de espermatozoides epididimarios y eyaculados en la especie porcina. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- SAS, 2004. SAS/STAT user's guide software released 9.12. Cary, NC:SAS Institute Inc.
- Schmidt, H., G. Kamp. 2005. Characterization of hiperactivated boar spermatozoa. *Theriogenology* 63:485-499.
- Schmidt, H., G. Kamp. 2004. Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction* 128:171-179.
- Serrano, H., E. Canchola and M. D. García- Suárez. 2001. Sperm – attracting activity in follicular fluid associated to an 8.6-kDa protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283:782-784.
- Sliwa, L. 2003. Chemotaxis of spermatozoa--an important and little known process accompanying fertilization. *Folia. Med. Cracov.* 44:153-158.
- Suarez, S. S. 2002. Formation of reservoir of sperm in the oviduct. *Reprod. Dom. Anim.* 37:140-143.
- Suarez, S. S., H.C. Ho. 2003. Hyperactivated motility in sperm. *Reprod. Dom. Anim.* 38:119–124.
- Tacconis, P., A. Revelli, M. Massobrio, La Sala G. Battista, J. Tesarik. 2001. Chemotactic responsiveness of human spermatozoa to follicular fluid is enhanced by capacitation but is impaired in dyspermic semen. *J. Assist. Reprod. Genet.*18:36-44.
- Tejerina, F., K. Buranaamnuay, F. Saravia, M. Wallgren, H. Rodríguez-Martinez. 2008. Assessment of motility of ejaculated, liquid-stored boar spermatozoa using computerized instruments. *Theriogenology* 69:1129–1138.
- Tourmente, M., M. Gomendio, E. R. S. Roldan. 2011. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC. Evol. Biol.* 13:11-12.
- Turner, R. M. 2006. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reprod. Fert. Develop* 18: 25-38.



- Varner D. D., 2008. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology* 70 :448–462.
- Vázquez, J. M., E. A. Martínez, J. Roca, M. A. Gil, I. Parrilla, C. Cuello, G. Carvajal, X. Lucas, J. L. Vázquez. 2005. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology* 63: 536–547.
- Villanueva-Diaz, C., F. Vadillo-Ortega, A. Kably-Ambe, M. A. Diaz-Pérez, S. K. Krivitzky. 1990. Evidence that human follicular fluid contains a chemo attractant for spermatozoa. *Fertil. Steril.* 54:1180-1182.
- Waberski, D., E. Schapmann, H. Henning, A. Riesenbeck, H. Brandt. 2011. Sperm chromatin structural integrity in normospermic boars is not related to semen storage and fertility after routine AI. *Theriogenology.* 75:337–345.
- Waberski, F., F Magnus, M. Ferreira, A. M. Petrunkina, K. F. Weitze, E. Topfer-Petersen. 2005. Importance of sperm-binding assays for fertility prognosis of porcine spermatozoa. *Theriogenology.* 63:470–484.
- Wang, Y., R. Storeg, P. Dale, T. Abyholm, T. Tanbo. 2001. Effects of follicular fluid and steroid hormones on chemotaxis and motility of human spermatozoa in vitro. *Gynecol. Endocrinol.* 15:286-292.
- White, I. G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 5:639-658.
- Yeste O. M. 2008. New insights into boar sperm function and survival from integrated laboratory and field studies. Doctoral Thesis. University of Girona.
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. -Gil García, E. Badia, J. Bassols, A. Pruneda, E. Bussalleu, I. Casa, S Bonet. 2008a. Boar spermatozoa and prostaglandin F<sub>2</sub> quality of boar sperm after the addition of prostaglandin F<sub>2</sub> to the short-term extender over cooling time. *Anim. Reprod. Sci.* 108:108-195.
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. -Gil García, E. Badia, J. Bassols, A. Pruneda, E. Bussalleu, I. Casas, S. Bonet. 2008b. Hyaluronic acid delays boar sperm capacitation after 3 day of storage at 15°C. *Anim. Reprod. Sci.* 109:236-250.

Yao, Y. Q., P. C. Ho and W. S. Yeung. 2000. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* 73:680-686.