



Efecto del glutatión reducido (GSH) sobre la calidad espermática de verraco bajo condiciones de trópico subhúmedo

Nancy P. Abrego Salgado , José Herrera Camacho¹ , Efrén Estrada Paqui² ,
Juan C. Tinoco-Magaña , Miguel Á. Bautista Hernández 

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, Mexico

Effect of reduced glutathione (GSH) on boar sperm quality under sub-humid tropic conditions

Abstract. The effect of reduced glutathione (GSH) on sperm quality of boars under tropic conditions was evaluated on the 40 ejaculates from 4 boars (10 replicates per boar) Yorkshire / Landrace and Pietrain / Duroc (24 and 28 months of age), were collected at 7 day intervals by the gloved hand technique. The ejaculate was diluted 1:10 with 2000 $\times 10^6$ (viable sperm), L-Reduced Glutathione added to the diluent MIII[®]. Three groups were formed, control group without GSH (0GSH) and two with GSH concentrations 1 mM (1GSH) and 2 mM (2GSH), total mobility, integrity of the plasma membrane, osmotic resistance and acrosomal integrity initial and in the semen conserved at 17° C was evaluated at 0, 24, 48, 72 and 96 h. The plasma membrane integrity of boar sperm supplemented with 2GSH was 88.0% and 1GSH of 87.3%, different with respect 0GSH ($P < 0.05$). In total mobility, in 2GSH and 1GSH was 58.9% and 56.9%, respectively, showing differences ($P < 0.05$) with respect to the 0GSH (52.0%). During the conservation period from 72 and to 96 h of storage, total mobility showed a 14% decrease for 0GSH, while that in 1GSH and 2GSH only a decrease of 11 and 6% respectively, was observed. Plasma membrane integrity at 96 h was 87.52%, 85.40% and 80.65% for 2GSH, 1GSH and 0GSH, respectively ($P < 0.05$). The variables osmotic tolerance and acrosomal integrity not show significant differences ($P > 0.05$) in between treatments during the time of conservation. The supplementation with GSH to the dilution medium improvement the quality of spermatozoa of boars maintained in tropical conditions conserved at 17° C.

Keywords: GSH, conserved semen, boar

Resumen: El efecto del Glutatión reducido (GSH) sobre la calidad espermática de verracos bajo condiciones de trópico subhúmedo, se evaluó en 40 eyaculados de 4 verracos (10 réplicas por verraco) Yorkshire/Landrace y Pietrain/Duroc (24 y 28 meses de edad), colectados a intervalos de 7 días por la técnica de mano enguantada. El eyaculado fue diluido 1:10 con 2000 $\times 10^6$ (espermatozoides viables), se utilizó L-Glutatión reducido adicionado al diluyente MIII[®]. Se formaron los grupos, control sin GSH (0GSH) y dos con GSH a concentración 1 Mm (1GSH) y 2 mM (2GSH), se evaluó la movilidad total, integridad de la membrana plasmática, resistencia osmótica e integridad acrosomal en el semen conservado a 17° C a las 0, 24, 48, 72 y 96 h. La integridad de membrana plasmática de los espermatozoides en 2GSH fue 88.0% y en 1GSH de 87.3%, diferentes con respecto a 0GSH ($P < 0.05$). En la movilidad total, en 2GSH y 1GSH fue 58.9% y 56.9%, respectivamente, mostrando diferencias ($P < 0.05$) con respecto al 0GSH (52.0%), la integridad acrosomal y la tolerancia osmótica no mostraron diferencias entre tratamientos. Durante la conservación, a partir de las 72 y hasta 96 h, la movilidad total mostró una disminución del 14% para el grupo 0GSH, mientras que en 1GSH y 2GSH, fue de 11 y 6%, respectivamente. La integridad de membrana la plasmática a las 96 h fue 87.52, 85.40% y 80.65% para 2GSH, 1GSH y 0GSH, respectivamente ($P < 0.05$). Las variables tolerancia osmótica e integridad acrosomal no mostraron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos durante la conservación. La suplementación con GSH al medio de dilución mejora la calidad de espermatozoides de verracos mantenidos condiciones de trópico subhúmedo conservados a 17° C.

Palabras clave: GSH, semen conservado, verraco

¹ Autores para la correspondencia: jose.camacho@umich.mx : cepaqui@hotmail.com

² Universidad Autónoma de Guerrero..

Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na qualidade do esperma suíno em condições tropicais subúmidas

Resumo: O efeito da glutathiona reduzida (GSH) na qualidade do esperma de cachacos foi avaliado em condições tropicais subúmidas. Foram utilizados 40 ejaculados de 4 javalis (10 réplicas por javali) das linhagens comerciais Yorkshire/Landrace e Pietrain/Duroc entre 24 e 28 meses de idade, coletados em intervalos de 7 dias pela técnica da mão enluvada. O ejaculado foi diluído 1:10 com 2000 x10⁶ (esperma viável), L-Glutathiona reduzida (GSH, Sigma-Aldrich®) foi adicionada ao diluente de média duração (MIII®). Foram formados três grupos, um grupo controle sem GSH (0GSH) e dois tratamentos com GSH na concentração de 1 Mm (1GSH) e 2 mM (2GSH), avaliaram-se motilidade total, integridade da membrana plasmática, resistência osmótica e integridade acrossomal inicial .em sêmen armazenado a 17°C nas horas 0, 24, 48, 72 e 96 h. A integridade da membrana plasmática dos espermatozoides em 2GSH foi de 88,0% e em 1GSH de 87,3%, diferente em relação a 0GSH (P<0,05). Na mobilidade total, no 2GSH e 1GSH foi de 58,9% e 56,9%, respectivamente, apresentando diferenças (P<0,05) com relação ao 0GSH (52,0%), integridade acrossomal e tolerância osmótica não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Durante o armazenamento, de 72 e até 96 h, a mobilidade total apresentou queda de 14% para o grupo 0GSH, enquanto no 1GSH e 2GSH foi de 11 e 6%, respectivamente. A integridade da membrana plasmática em 96 h foi de 87,52, 85,40% e 80,65% para 2GSH, 1GSH e 0GSH, respectivamente (P<0,05). As variáveis tolerância osmótica e integridade acrossômica não apresentaram diferenças (P>0,05) entre os tratamentos durante a conservação. A suplementação com GSH ao meio de diluição melhora a qualidade dos espermatozoides de cachacos mantidos em condições tropicais subúmidas mantidas a 17°C.

Palavras-chave: GSH, sêmen armazenado, cachaco

Introducción

La actividad porcina en México posee una gran demanda de carne y la autosuficiencia es de un 60%; actualmente el consumo per cápita es de 18 kg y crece a un ritmo superior del 4%, por lo que cada año se importa más carne de cerdo; el 86% de las importaciones provienen de Estados Unidos (SIAP, 2018). Por otra parte, hay un aumento importante de granjas que destinan su producción a la exportación, en el 2018 las exportaciones superaron las 170 mil toneladas y el 90% de este volumen se destinó a Japón (Confederación de Porcicultores Mexicanos, 2018), por lo tanto, una de las grandes oportunidades es mejorar la productividad de esta especie. En los últimos años se tiene registro que la mayoría de las granjas están por debajo de los 25 lechones destetados por cerda al año (INEGI, 2019).

La producción porcina es intensiva y se basa en el manejo, alimentación, genética, sanidad y reproducción; en cuanto a este último punto, más del 90% de las hembras reproductoras son inseminadas con semen fresco conservado a 17 °C y solo alrededor del 2% con semen criopreservado (Villa *et al.*, 2008). La utilización de la inseminación artificial (IA) con semen conservado a 17 °C se ha extendido por el desarrollo de diluyentes que permiten la conservación del semen con excelentes resultados, pero su limitación radica en la vida útil del semen que varía entre 2-4 días (Trujillo *et al.*, 2017).

Los procesos de refrigeración producen alteraciones de carácter físico y químico sobre las membranas de los espermatozoides, teniendo como consecuencia la reducción de la viabilidad y movilidad celular, y, por lo tanto, de su capacidad fecundante (Obando *et al.*, 2012).

Las alteraciones producidas por el descenso de temperatura están asociadas a estrés oxidativo, que se genera por la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Todas las células vivas producen bajo condiciones aeróbicas ROS, las cuales se originan principalmente de funciones metabólicas normales de la misma célula (Mata-Campuzano *et al.*, 2012). Los ROS son radicales libres que se forman cuando se rompe un enlace covalente entre moléculas y un electrón queda con cada átomo recién formado (Buonocore *et al.*, 2010).

Las células espermáticas presentan en su estructura ácidos grasos poliinsaturados, especialmente la especie porcina contiene un gran número de ellos, y debido a que los lípidos de los espermatozoides son el sustrato principal de los ROS, son los espermatozoides de esta especie especialmente sensibles a la peroxidación lipídica u oxidación; que durante la conservación la vida útil del semen está condicionada por la producción de ROS, debido a su vez al inevitable proceso del metabolismo de los espermatozoides (Yeste, 2017). Bajo este contexto, se hace necesaria la utilización de compuestos antioxidantes, para mejorar la calidad espermática durante la conservación, y por tanto mejorar la capacidad fecundante de los espermatozoides (Membrillo *et al.*, 2003; Hicks *et al.*, 2006). El glutatión reducido (GSH) es un antioxidante que ha demostrado tener efectos positivos como aditivo en el diluyente de conservación a 17 °C, así como, en los medios de criopreservación (Estrada, 2014), actúa como un mecanismo de defensa contra la peroxidación lipídica causado por ROS y manteniendo la calidad espermática (Bucak *et al.*, 2010). Córdova (2010) demostró que el GSH

adicionado al diluyente de conservación a 17 °C, mantuvo de mejor manera las características espermáticas durante cinco días de almacenamiento, en cuanto a movilidad total, integridad de membrana y acrosoma íntegro.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el centro de transferencia genética (CTG) y laboratorio de reproducción porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia No. 1 de la Universidad Autónoma de Guerrero; en la región Tierra Caliente del Estado de Guerrero, que presenta clima de trópico subhúmedo, con temperatura mínima y máxima de 34 y 40 °C, una precipitación promedio de 600 mm anuales y la humedad relativa entre 25% y 50% (INEGI, 2017).

Se utilizaron cuatro verracos de líneas Yorkshire/Landrace y Pietrain/Duroc entre 24 y 28 meses de edad, alojados en corrales individuales de 10 m² sin clima controlado y piso de concreto, recibieron 2 kg de alimento comercial por día (14% de PC y 3.1 Mcal de energía) y agua a libre acceso. Al momento del estudio los análisis serológicos por ELISA y PCR determinaron un estatus negativo al síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS).

Se utilizaron 40 eyaculados (10 réplicas por verraco), se colectaron a intervalos de 7 días por la técnica de mano enguantada de acuerdo a la descrita por Trujillo *et al.* (2017) y se colectó la fracción rica (100 mL). Se evaluaron las características macroscópicas y microscópicas de cada eyaculado, previo a su dilución para determinar los valores de referencia. El análisis macroscópico incluyó volumen y temperatura del eyaculado. El análisis microscópico, incluyó, movilidad total, concentración espermática, viabilidad y morfología (Estrada *et al.*, 2014).

Dilución de eyaculados y adición de GSH. El eyaculado fue diluido 1:10 con 2000 x10⁶ (espermatozoides viables), se utilizó L-Glutación Reducido (GSH C10H17N3O6, Sigma-Aldrich®) (1 y 2 mM) adicionado al diluyente comercial de media duración (MIII®). Los tubos se almacenaron a 16-17 °C y se evaluaron las variables de estudio cada 24 h hasta las 96 h.

Integridad de la membrana plasmática (Viabilidad). Se analizó mediante la sonda de inmunofluorescencia SYBR-14/PI (LIVE/DEAD™ Sperm Viability Kit (L7011), *Invitrogen* by Thermo Fisher Scientific) bajo microscopio de epifluorescencia, de acuerdo al protocolo descrito por Gardner y Johnson (1995), se alicuotó 50 µL de cada tratamiento en 450 µL de Fosfato Buffer Salino 1x (PBS P4417 Sigma-Aldrich®), se adicionaron 0.5 µL del fluorocromo SYBR-14 (100 nM concentración final) y se incubaron en oscuridad a 38°C durante 10 minutos, posteriormente, se adicionaron 2.5 µL del fluorocromo Ioduro de Propidio (10 µM concentración final) y se incubaron en oscuridad a 38°C durante 5 minutos.

El objetivo fue evaluar el efecto del Glutación reducido (GSH) sobre la calidad espermática de verraco bajo condiciones de trópico subhúmedo.

Después 10 µL de cada alicuota se depositaron en portaobjetos, se observó al microscopio con el objetivo 20x y el filtro 1-DAPI/azul. Se clasificaron dos poblaciones espermáticas, en base a la coloración, los espermatozoides viables con membrana plasmática intacta se tiñeron con fluorescencia verde, mientras que los espermatozoides con membrana plasmática dañada (muertos) tomaron una coloración de roja. Se contaron 200 espermatozoides y se expresó en porcentaje.

Ensayo dual de resistencia osmótica (HOST) / integridad acrosomal (Azul de coomassie): Se realizó por medio de la metodología adaptada por Schilling *et al.* (1986). Se colocaron 50 µL de semen en 400 µL del medio hipotónico HOST (150 mOsm), se incubaron a 37 °C durante 30 minutos, se tomaron 10 µL de la muestra y se realizó frotis convencional, se fijó con paraformaldehído al 4% por 15 minutos y se sumergió en una solución azul de Coomassie (0,22 %) por 3 minutos. El frotis se evaluó en microscopio óptico bajo el objetivo de inmersión (100x). En la valoración los espermatozoides con membrana funcional buscan controlar su osmolaridad y al estar en un medio hiposmótico reaccionaron enrollando el flagelo, por lo que espermatozoides con flagelo enrollado, se consideraron viables y funcionales. La tinción de azul de Coomassie es una tinción con gran afinidad por las proteínas, por lo cual las proteínas acrosomales toman una coloración muy intensa, favoreciendo la valoración de la integridad. Se contaron 200 células y el resultado se expresó en porcentaje de espermatozoides con flagelo enrollado (membrana funcional) e integridad acrosomal.

Movilidad total. Se valoró de acuerdo a la técnica descrita por Estrada *et al.* (2014) en donde se alicuotaron 500 µL de cada tratamiento y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos, se tomaron 10 µL y se depositaron en un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos (ambos atemperados a 37 °C), se observó bajo microscopio óptico de luz convencional, el resultado se expresó en porcentaje de acuerdo a la movilidad total observada. Se realizó por duplicado en cada tratamiento.

Análisis estadístico: Se utilizó un diseño factorial 3 x 5 (3 concentraciones de GSH: 0, 1 y 2 mM; 5 mediciones de conservación: 0, 24, 48, 72 y 96 h); los datos obtenidos se analizaron a través de mediciones repetidas de modelo de efectos fijos y las diferencias entre tratamientos se obtuvieron a través de medias de mínimos cuadrados y significancia de P < 0.05 (Littel *et al.*, 1998). Los análisis estadísticos se realizaron en el paquete estadístico JMP (v. 13).

Resultados y Discusión

Los promedios por tratamiento obtenidos en la presente investigación indican que la suplementación de GSH al medio de dilución mejoró ($P<0.05$) los parámetros seminales durante la conservación a 17 °C (Tabla 1), principalmente la integridad de membrana plasmática y la

movilidad total que fue menor en el grupo 0GSH, con respecto a 1GSG y 2GSH. En el caso de las medias en la integridad del acrosoma y tolerancia osmótica no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre tratamientos con GSH y sin adición de GSH.

Tabla 1. Efecto del uso de GSH sobre la calidad de semen de verraco diluido conservado a 17 °C en el trópico subhúmedo durante las 96 h de conservación.

Tratamiento	Integridad de la membrana (%)	Movilidad total (%)	Integridad acrosomal (%)	Tolerancia osmótica (%)
Control	85.2 ± 0.6 ^a	52.0 ± 1.6 ^a	51.1 ± 1.5 ^a	54.7 ± 1.4 ^a
1 mM	87.3 ± 0.6 ^b	56.9 ± 1.6 ^b	49.9 ± 1.5 ^a	54.6 ± 1.4 ^a
2 mM	88.0 ± 0.6 ^b	58.9 ± 1.6 ^b	53.5 ± 1.5 ^a	54.8 ± 1.4 ^a

Literales ^{a,b} en la misma columna indican diferencias ($P<0.05$).

En apoyo a lo anterior Vongpralub *et al.* (2016), recomienda la adición de una dosis de 1 mM de GSH como un componente alternativo del diluyente de semen de verraco para mejorar la movilidad durante el almacenamiento a 17 °C, estos autores observaron una motilidad progresiva de 83.78±4.82 % a las 96 h de evaluación. En contraste, estos resultados fueron inferiores a los reportados por Zhang *et al.* (2016), quienes obtuvieron una movilidad total con 1 mM de GSH de 73.6% durante las 120 h de conservación.

En cuanto a la variable integridad de la membrana plasmática, estos resultados concuerdan parcialmente con Li *et al.* (2016), quienes al probar cuatro concentraciones de GSH (1, 5, 10 y 15 mM), obtuvieron mejores resultados ($P<0.05$) con la adición de 1 mM (66.81%) con respecto a las concentraciones superiores (62.87%, 59.74% y 57.37%, respectivamente), así como con el grupo sin GSH (51.52%). Adicionalmente, observaron que el contenido de radicales libres, principalmente el H₂O₂ fue menor en espermatozoides conservados con 1 mM. En este contexto, Petruška *et al.* (2014), documentan que el GSH al ser un tripéptido de ácido glutámico, cisteína y glicina desempeña un papel importante en la defensa contra el estrés oxidativo a nivel intracelular; por lo que la subunidad cisteína ofrece y expone un grupo sulfhídrido que neutraliza los radicales libres directamente. También, observaron que altas concentraciones de antioxidantes pueden destruir el acrosoma y la integridad de la membrana plasmática. Ante esto, Peruma *et al.* (2013) afirman que altas concentraciones GSH a partir de 5 mM, el espermatozoide no puede mantener sus funciones fisiológicas vitales; es decir, altas cantidades de GSH en el diluyente pueden dañar la función mitocondrial del espermatozoide.

En cuanto a la movilidad total durante el periodo de conservación; a las 24 h los tratamientos 0GSH y 1GSH mostraron diferencias significativas ($P<0.05$), respecto al

grupo 2GSH. A las 96 h de conservación la movilidad total manifestó una disminución del 14% para el grupo control, mientras tanto, los tratamientos con 1 y 2 mM de GSH tuvieron pérdidas del 11 y 6%, respectivamente (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con Vongpralub *et al.* (2016) quienes obtuvieron mejores resultados de movilidad durante un periodo de conservación de 96 h con la adición de 1 mM de GSH (81.72%), con respecto al control, 0.1 y 5 mM (74.33, y 78.94%, respectivamente). Un comportamiento similar fue reportado por Li *et al.* (2017) quienes obtuvieron un descenso de la movilidad en el semen de verraco a 17 °C, obteniendo 45.58% al cuarto día de conservación, dichos autores, establecen una relación en base al descenso de la movilidad con el tiempo efectivo de conservación, considerando valores inferiores al 50% como límite mínimo. Por lo tanto, definieron que el semen de verraco diluido y conservado a 17 °C tiene un periodo de supervivencia de 4 días.

Bajo este contexto, la adición de GSH prolonga el periodo de supervivencia por al menos un día más, donde lo convencional es mantenerlo por 72 h. Cabe mencionar que el tiempo de evaluación en la presente investigación solo fue hasta las 96 h de conservación (4 días). Es decir, que el efecto GSH positivo se pueda deber a la compensación en la producción de ROS durante la conservación. Yeste *et al.* (2014) han sugerido que los ROS afectan la movilidad de los espermatozoides a través de un agotamiento de ATP, mediado por la inhibición de la fosforilación y la glucólisis oxidativa por peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Por su parte, Vyt *et al.* (2008) establecieron una asociación entre la movilidad total y progresiva con la fertilidad del eyaculado, donde, observaron que el mantenimiento de la movilidad en el semen diluido se relaciona con el aumento de 0.14 lechones nacidos por camada.



Tabla 2. Variables seminales en eyaculados de verraco diluidos conservados a 17 °C, adicionados con GSH.

Variable	Hora de conservación	Tratamientos		
		0GSH	1GSH	2GSH
Movilidad Total	0	56.95 ^a	62.50 ^a	63.18 ^a
	24	52.84 ^a	54.88 ^a	61.70 ^b
	48	51.81 ^a	56.47 ^a	57.95 ^a
	72	53.18 ^a	57.95 ^a	53.29 ^a
	96	42.84 ^a	51.81 ^b	56.93 ^b
Integridad de la membrana	0	87.54 ^a	88.52 ^a	89.47 ^a
	24	86.31 ^a	88.04 ^a	88.22 ^a
	48	84.31 ^a	87.18 ^b	87.04 ^b
	72	87.13 ^a	86.97 ^a	87.47 ^a
	96	80.65 ^a	85.40 ^b	87.52 ^c
Tolerancia osmótica (%)	0	58.36	54.81	59.20
	24	52.77	56.81	54.90
	48	54.77	53.86	54.75
	72	52.91	53.18	50.86
	96	54.57	54.07	54.50
Integridad acrosomal (%)	0	51.52	49.65	55.40
	24	52.84	53.29	56.02
	48	50.40	49.88	51.60
	72	50.30	47.61	51.20

Literales ^{a,b} en filas indican diferencias (P<0.05).

Los hallazgos en el presente trabajo con respecto a la integridad de la membrana plasmática (Tabla 2), durante el almacenamiento a 17 °C a las 0 y 24 h no mostraron diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos; fue a partir de las 48 h que los tratamientos con 1GSH y 2GSH comenzaron a comportarse de mejor manera al mantener la integridad de la membrana espermática del espermatozoide (P<0.05) con respecto al control. Hasta ese momento, el tratamiento control había disminuido en 3% la población de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (espermatozoides vivos), seguido del tratamiento con la adición de 2 mM en 2%, finalmente el tratamiento con 1 mM que disminuyó un 1%.

A las 96 h de conservación a 17 °C fue el tratamiento 2 GSH logró mantener un 87.52% de espermatozoides con membrana íntegra, lo que resultó significativamente (P<0.05) diferente con respecto a los grupos 0GSH y 1GSH. Al respecto, Petruška *et al.* (2014) y Li *et al.* (2017) reportaron que los espermatozoides conservan suficientes enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión reductasa, catalasa, entre otras) para resistir el daño oxidativo durante los 3 primeros días; es entonces cuando el GSH actúa, a partir del disulfuro de glutatión que se regenera/reduce por la enzima glutatión reductasa para completar el ciclo, impidiendo el aumento de la formación de ROS que dañan la integridad de la membrana

plasmática. Estos resultados concuerdan parcialmente con Zhang *et al.* (2016) quienes durante un periodo de conservación de 96 h con 1 mM de GSH añadido al diluyente de conservación a 17 °C obtuvieron mejores porcentajes (P<0.05) de espermatozoides con membrana plasmática íntegra (57.73%) en relación al semen que no se añadió GSH (40.32%). Sin embargo, Vongpralub *et al.* (2016), indican diferencias no significativas (P>0.05) en la integridad de la membrana plasmática con la adición de 5mM GSH; sin embargo, estos autores atribuyen sus resultados a las sondas de fluorescencia utilizadas (PI, FITC-PNA y JC-1) así como a la variación de la temperatura de incubación. Cabe destacar que la integridad de la membrana plasmática es uno de los parámetros evaluados con mayor frecuencia durante el análisis seminal de rutina, y su determinación es útil para predecir *in vitro* la capacidad fecundante del espermatozoide. En este contexto, Ariagno y Mormandi (2016) indicaron que la membrana plasmática del espermatozoide es esencial para algunas funciones metabólicas tales como la capacitación, interacción con células del útero, reacción del acrosoma e interacción con la zona pelúcida; por lo tanto, la pérdida de su integridad es considerada como incompatible con la capacidad del espermatozoide de fecundar un ovocito *in vivo*. Por otro lado, en las variables seminales de tolerancia osmótica e



integridad acrosomal de los espermatozoides de verraco durante el periodo de almacenamiento, no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$).

El hecho de no haber encontrado diferencias entre tratamientos en el presente estudio, indica que durante el almacenamiento a 17 ° la funcionalidad bioquímica de la membrana plasmática no se vio afectada; cabe mencionar que los tres grupos mantuvieron valores promedio de 55% en el caso de la tolerancia osmótica y del 50% para la integridad acrosomal. Estos resultados concuerdan con Schulze *et al.* (2017), quienes reportaron que durante la conservación a 17 °C no encontraron diferencias significativas en cuanto a la integridad acrosomal en espermatozoides de verraco.

En este contexto es importante destacar que, en condiciones fisiológicas la fecundación no ocurre si la membrana plasmática del espermatozoide es bioquímicamente alterada, aun cuando permanezca estructuralmente intacta, por lo tanto, la prueba dual HOST/azul de comassie es un indicador más preciso. Ante esto, Yeste *et al.* (2010) resaltan que el espermatozoide

realiza mecanismos de adopción y resistencia a los repentinos cambios en la osmolaridad, involucrando complejas vías metabólicas; por ejemplo, los canales iónicos relacionados a ATPasa – dependientes de iones Na^+/K^+ ; que, en una membrana no funcional bioquímicamente conlleva al choque osmótico que afecta la difusión de fosfolípidos en la bicapa de la membrana espermática.

Riesenbeck (2015) postula que realizar la dilución de semen con alta calidad es crucial para el éxito en la inseminación artificial (IA), donde, ha observado que en dosis de IA la integridad acrosomal se mantiene estable en un máximo de 5 días a 16-18 °C. Por su parte, González-Peña *et al.* (2014) hacen referencia en la tasa de dilución y la eliminación del plasma seminal que se asocian con la reducción de componentes de capacitación espermática; en este contexto, Henning *et al.* (2015), establecen que realizar la dilución de semen de verraco con al menos 10% de plasma seminal residual, desencadena un estado similar a la capacitación, que culmina en reacciones del acrosoma prematuras y por consecuencia muerte celular.

Conclusiones

La suplementación con GSH en concentración 1 o 2 mM al medio de dilución tiene efecto de mejora durante la conservación a la 17 °C de espermatozoide de verracos en condiciones de tóxico subhúmedo. El almacenamiento del semen de 72 a 96 horas a 17 °C suplementado con GSH induce cambios positivos en la integridad

estructural de la membrana plasmática (viabilidad) y movilidad total. La adición de GSH al medio de conservación a 17 °C es una alternativa para conservar la fertilidad del semen de verraco en condiciones de tóxico subhúmedo.

Literatura Citada

- Ariagno, J., E. Mormandi. 2016. Guía práctica para la evaluación del semen. *Guía Práctica ByPC*, 80(3):29-36.
- Bucak, MN, P.B. Tuncer, S. Sariözkan, N. Baspinar, M. Taspinar, K. Cayan, A. Bilgili, P.P. Akalin, S. Büyükleblebici, S. Aydos, A. Ilgaz, A. Sunguroglu, and D. Oztuna. 2010. Effect of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. *Cryobiology*, 61 (3):248-253. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2010.09.001>
- Buonocore, G, S. Perrone, and M.L. Tataranno. 2010. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 15:186-190. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2010.04.003>
- Confederación de Porcicultores Mexicanos A. C. 2018. Compendio estadístico del sector porcícola 2018.
- Córdova, J.C.A. 2010. Control de la peroxidación lipídica de semen refrigerado y criopreservado de verraco mediante antioxidantes (α -Tocoferol / Glutatión reducido), y su repercusión sobre la calidad espermática. *Tesis Doctoral*. Facultad de Veterinaria, Departamento de sanidad animal. Universidad de León, España. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=106440>
- Estrada, P.E. 2014. Efectos del glutatión reducido y la procaina en la resistencia a la criopreservación de semen porcino. Acciones a nivel de la estabilidad nuclear y su efecto en la fertilidad “in vivo”. *Tesis Doctoral*. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España. <https://ddd.uab.cat/record/127114>
- González-Peña D., R.V. Knox, J. Pettigrew, and S.L. Rodríguez-Zas. 2014. Impact of pig insemination technique and semen preparation on profitability. *Journal of Animal Science*, 92:72-84. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6836>
- Henning, H, T.T. Ngo, and D. Waberski. 2015. Centrifugation stress reduces the responsiveness of spermatozoa to a capacitation stimulus in in vitro-aged semen. *Andrology*, 3: 834-842. <https://doi.org/10.1111/andr.12064>

- Hicks, J.J., R.Y. Torres, and V.M. Sierra. 2006. Estrés oxidativo. Concepto y clasificación. *Endocrinología y Nutrición*, 4:223-226. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=11555>
- INEGI, 2019. Encuesta Nacional Agropecuaria. Disponible en: www.inegi.org.mx/programas/ena/default.html#Tabulado
- Li, H., X.G. Zhang, Q. Fang, Q. Liu, R.R. Du, G.S. Yang, L.Q. Wang, and J.H. Hu. 2017. Supplemental effect of different levels of taurine in Modena on boar semen quality during liquid preservation at 17°C. *Animal Science Journal*, 88(11): 1692-1699. <https://doi.org/10.1111/asi.12865>
- Little, R.C., P.R. Henry, and C.B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *Journal Animal Science*, 76:1216-1231. <https://doi.org/10.2527/1998.7641216x>
- Mata-Campuzano, M., M. Alvarez-Rodríguez, E. Del Olmo, M.R. Fernández-Santos, J.J. Garde, and F. Martínez-Pastor. 2012. Quality, oxidative markers and DNA damage (DNA) fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37°C in presence of several antioxidants. *Theriogenology*, 78:1005-1019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.12.018>
- Membrillo, O.A., I.A. Córdova, G.J.J. Hicks, C.I.M. Olivares, T.V.M. Martínez, y M.J.J. Valencia. 2003. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen. Una revisión. *Interciencia*, 28(12):699-704. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001200006
- Obando, P., M. Alfaro, E. Hurtado, y T. Rodríguez. 2012. Respuesta reproductiva de cerdas multíparas a la adición de oxitocina y prostaglandina F2 alfa previo a la inseminación artificial. *Zootecnia Tropical*, 30(2):169-174. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692012000200005&lng=es&tng=es
- Peruma, P., J.K. Chamuah, and C. Rajkhowa. 2013. Effect of catalase on the liquid storage of mithun (*Bos frontalis*) semen. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 2(3): 209-214. [https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60148-7](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60148-7)
- Petruska, P., M. Capcarova, and P. Sutovsky. 2014. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 38:643-652. <https://doi.org/10.3906/vet-1404-61>
- Riesenbeck, A., M. Schulze, K. Rüdiger, H. Henning, and D. Waberski. 2015. Quality control of boar sperm processing: implications from European AI centers and two spermatology reference laboratories. *Reproduction Domestic Animals*, 50:1-4. <https://doi.org/10.1111/rda.12573>
- Schilling, E., M. Vengust, and M.O. Bajt. 1986. The osmotic resistance (ORT) of boar spermatozoa and the relation to pregnancy rate and litter size. *Proc. 9th IPVS Congress. Barcelona*. 77.
- Schulze, M., C. Ammon, J. Schaefer, A.M. Luther, M. Jun, and D. Waberski. 2017. Impact of different dilution techniques on boar sperm quality and sperm distribution of the extended ejaculate. *Animal Reproduction Science*, 182:138-145. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.05.013>
- SIAP, 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, estadísticas 2018. Disponible en: <http://infosiap.siap.gob.mx/gobmx/datosAbiertos.php>
- Trujillo, O.M.E., O.A.J. Contreras, H.S. Espinosa, P. O. Gutiérrez, T.E. Hernández, N.J. Nava, G.R.G. Martínez, R.R. Martínez, C.J.C. Rojas, H.M. Sánchez, V.R.M. Viguera, y S.G.Y. Castellanos. 2017. El Verraco. 1ª ed. ED. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, CU, CDMX.
- Villa, N.A., L.E. Sánchez, y A. Ceballos. 2008. Actividad de glutación peroxidasa y superóxido dismutasa en plasma seminal y sangre en cerdos reproductores. *Veterinaria y Zootecnia*. 3(1). <https://doctoradoagrarias.files.wordpress.com/2015/04/vetzootec-2009.pdf>
- Vongpralub, T., P. Thananurak, C. Sittikasamkit, P. Chuawongboon, M. Duangjinda, W. Boonkum, and V. Chankitisakul. 2016. Comparison of effects of different antioxidants supplemented to long-term extender on boar semen quality following storage at 17°C. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 46(1):119-126. <https://he01.tci-thaijo.org/index.php/tjvm/article/view/49791>
- Vyt, P., D. Maes, C. Quinten, T. Rijsselaere, W. Deley, M. Aarts, A. De Kruif, and A. Van Soom. 2008. Detailed motility evaluation of boar semen and its predictive value for reproductive performance in sows. *Vlaams Dierge Tijds*, 77:291-298. <https://biblio.ugent.be/publication/746864>
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, E. Bussalleu, and S. Bonet. 2010. The osmotic tolerance of boar spermatozoa and its usefulness as sperm quality parameter. *Animal Reproduction Science*, 119:265-274. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.02.011>
- Yeste, M., E. Estrada, E. Pinart, S. Bonet, J. Miró, and J. E. Rodríguez-Gil. 2014. The improving effect of reduced glutathione on boar sperm cryotolerance is related with the intrinsic ejaculate freezability. *Cryobiology*, 68(2):251-261. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.02.004>
- Yeste M. 2017. State of the art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14(1):69-81. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR895>
- Zhang X.G., Q. Liu, L.Q. Wang, G.S. Yang, and J.H. Hu. 2016. Effects of glutathione on sperm quality during liquid storage in boars. *Animal Science Journal*, 87, 1195-1201. <https://doi.org/10.1111/asi.12545>